5º Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

Science and Technological Innovation:
A Strategy for Well-Being

Ciencia e Innovación Tecnológica:
Estrategia para el Bienestar



José Luis Zavala Aguirre
Juan Villafaña Rojas
Miguel J. Beltrán García
Editores

Editorial Universidad Autónoma de Guadalajara

80 años UAG
COMPROMETIDOS CON LA EDUCACIÓN

La información compendiada en este libro digital proviene de los trabajos presentados durante el 5to Congreso Internacional de Biología, Química y Agronomía de la Universidad Autónoma de Guadalajara el cual fue celebrado del 31 de septiembre al 2 de octubre de 2015 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: 978-607-719-005-9

EDITORIAL: Universidad Autónoma de Guadalajara, A.C. Av. Patria 1201. Lomas del Valle, Zapopan, Jalisco, 45129. México. Primera edición: 2016

Comité Científico:

Agrobiotecnología	Dr. Miguel J. Beltrán García
Biocombustibles	Dr. Froylan Mario Espinosa Escalante
Biología de Recursos Naturales	Dr. José Luis Zavala Aguirre
Biología Molecular	MC. Aurora Huerta Robles / MC Marcela de la Mora Amutio
Biología y Química del estrés oxidativo	Dr. Miguel J. Beltrán García
Biomateriales	Dr. Tito E. Herrera Larrasilla
Biorremediación	Dr. José A. Lomelí Sención
Biotecnología Alimentaria	MC. Gloria M. Macedo Raygoza / Biól. Claudia I. Cisneros Reyes
Biotecnología Clínica	MC. Araceli Escobedo Magallón
Biotecnología Farmacéutica	MC. Carlos Alberto Manuel Cabrera
Conservación de ecosistemas	Dr. José Luis Zavala Aguirre
Control Biológico	Dr. David Ortiz Mendoza
Ecotoxicología	Dr. José Luis Zavala Aguirre
Fermentaciones	Dr. Juan Villafaña Rojas
Fitopatología	MC. Laura Marcela Meixner Rojas
Ingeniería Química	Dr. Efrén Aguilar Garnica
Procesos Químicos	Dr. Efrén Aguilar Garnica
Q. Alimentos	Dra. Lourdes Contreras Pacheco
Q. Analítica	MC. Gloria Macedo Raygoza
Q. Bioorgánica	IQ. Ma. Lourdes Rivera Castro
Q. Clínica	MC. Araceli Escobedo Magallón
Q. Farmacéutica	MC. Carlos Alberto Manuel Cabrera
Q. Productos Naturales	IQ. Ma. Lourdes Rivera Castro
Química Agronómica	IA. Lydia Olvera Avila

CONTENIDO

Portada i

Hoja Legal y Comité Científico ii

Contenido iii

PRÓLOGO xliv

AGROBIOTECNOLOGÍA

Jackeline Lizzeta Arvizu-Gómez[a*+], Alejandro Hernández-Morales[b], Carlos Rubén Carbajal-Cazola[c], Juan Ramiro Pacheco-Aguilar[d], Jesús Bernardino Velázquez-Fernández[a], Jennifer Alexis Rojas-Morales[e], Norma Angélica Pérez-Dueñas[e]. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF PLANT GROWTH PROMOTING BACTERIA (PGPR) FROM THE RHIZOSPHERE OF MAIZE (*Zea mays L.*) WITH POTENTIAL TO BE USED AS BIOFERTILIZERS. (Aislamiento y caracterización de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV) a partir de la rizósfera de maíz (*Zea mays L.*) con potencial de ser empleadas como biofertilizantes) 1

Nancy Gabriela Camarena-Rangel[a*], María del Socorro Santos-Díaz[a+], Ana Paulina Barba-de la Rosa[b]. EVALUATION OF THE EFFECT OF BIOTIC AND ABIOTIC STRESS IN THE PRODUCTION OF ANTIOXIDANT COMPOUNDS IN CALLUS OF *Opuntia spp*. (Evaluación del efecto de estrés biótico y abiótico en la producción de compuestos antioxidantes en callos de *Opuntia spp*.)..... 2

Huitzimengari Campos[a*+], Carlos Trejo[b], Cecilia B. Peña-Valdivia[b], Rodolfo García-Nava[b]. PROMPT CHLOROPHYLL *A* FLUORESCENCE AS A TOOL TO FOLLOW VARIATIONS OF PHOTOSYNTHESIS DURING WATER-STRESS IN *Capsicum annuum* L. PLANTS. (Aumento rápido de la fluorescencia de clorofila *a* como una herramienta para monitorear las variaciones de la fotosíntesis en plantas de *Capsicum annuum* L. durante estrés hídrico) 3

Ana Patricia Raygoza Martínez[a]*, Luis Patricio Guevara Acevedo[b+], Gilberto Rodríguez Pérez[b], Juan Gabriel Ramírez Pimentel[b], Francisco Cervantes Ortiz[b], Mariano Mendoza Elos[b]. ELICITOR EFECT IN PERUANO BEAN SEED QUALITY. (Efecto de elicitores en calidad de semilla de frijol peruano)..... 4

Jesús A. López-Guzmán[a*+], Juan A. Aguilar-Castillo[b], J. Jesús García-Zavala[c], Ricardo Lobato-Ortiz[c], Antonio Rojas-Polanco[b], Víctor Valenzuela-Herrera[a]. STABILITY OF MAIZE OF THE JALA RACE DEPENDING ON ITS EAR LENGTH. (Estabilidad de maíz de la raza jala en función de su longitud de mazorca)..... 5

Claudia I. Cisneros-Reyes[a*+], Julia del Carmen Martínez-Rodríguez[b], Marcela De la Mora-Amutio[b], Miguel J. Beltrán-García[b], Tetsuya Ogura[b]. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF POTATO ENDOPHYTES (*Solanum tuberosum)* VAR. FIANA AS PLANT GROWTH PROMOTERS. (Aislamiento y caracterización de endófitos de papa (*Solanum tuberosum*) var. Fiana como promotores del crecimiento vegetal) 11

Edgar Esteban Bustos-Barrera[a*+], María Myrna Solís-Oba[a], Vanesa Chicatto-Gasperín[a], Joseph Israel Hernández-Rivadeneyra[a], Julieth Andrea Peña-Burgos[b], Aida Solís-Oba[c]. EVALUATION OF THE

GERMINATION INDEX IN LETTUCE USING LIQUID DIGESTATES FROM DIFFERENT ANAEROBIC DIGESTION CONDITIONS. (Evaluación del índice de germinación en lechuga usando digestatos líquidos de diferentes condiciones de digestión anaeróbica) 12

Dumas Oviedo-Pereira[a]*, Silvana Alvarenga Venutolo[b], Silvia Evangelista Lozano[a], Gabriela Sepúlveda Jiménez[a], Mario Rodríguez-Monroy[a+]. TEMPORARY IMMERSION BIOREACTOR SYSTEM (TIBS) FOR MICROPROPAGATION OF *Stevia rebaudiana* BERTONI. (Sistema de Biorreactor de Inmersión Temporal (BIT) para la micropropagación de *Stevia rebaudiana* Bertoni)..... 19

Diana Andrea Arroyo Moreno [a]*, Andrea Gutiérrez-Santa Ana[b], Gloria Macedo-Raygoza[c], Aurora Huerta-Valle[d], Miguel J. Beltrán García[e]. MALDI-TOF MASS SPECTROMETRY IDENTIFICATION OF SECONDARY METABOLITES AND SECRETED ENZYMES DURING *Colletotrichum gloesporoides* INTERACTION WITH *Trichoderma* SPECIES: A PROPOSAL 26

Arlet Torres Chimes[a*], Luis Patricio Guevara Acevedo[b+] Francisco Cervantes Ortiz[b], Julio Cesar León Vargas[c], Enrique Andrio Enriquez[b], Hugo Cesar Cisneros López[b], Daniel Rodríguez Mercado[b]. EFFECT OF THE SALICYLIC ACID IN THE BROCCOLI (*Brassica oleracea* VAR. *italica*) SEEDLINGS PRODUCTION. [Efecto del ácido salicílico en la producción de plántula de brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica*)] 27

María de los Angeles Aquiahuatl Ramos*[a], Lorenzo Wilfrido Rodríguez Pérez[b]. CULTURE OF RHIZOSPHERE MICROORGANISMS AS BIOFERTILIZERS. (Cultivo de microorganismos rizosféricos como biofertilizantes) 38

Leticia Escobedo Bocardo[a*], Hermila Trinidad García-Osuna[a+], Adalberto Benavides Mendoza[a], Francisca Ramírez Godina[a]. MICROPROPAGATION OF SOTOL (*Dasylirion cedrosanum* Trel.). [Micropropagación de sotol (*Dasylirion cedrosanum* Trel)] 47

Hermila Trinidad García-Osuna[a*], Leticia Escobedo Bocardo[a], Francisca Ramírez Godina[a], Adalberto Benavides Mendoza[a+]. MICROPROPAGATION OF THREES VARIETIES OF NOPAL (*Opuntia ficus-indica* L.). [Micropropagación de tres variedades de nopal (*Opuntia ficus-indica* L.)]..... 53

Mónica Guadalupe Lozano-Contreras[+]*[a], Genovevo Ramírez-Jaramilo[b], Rodrigo Cauich-Cauich[a]. EFFECT OF THE INTERACTION BETWEEN ORGANIC FERTILIZER AND MYCORRHIZAL INIFAP IN GROWING *Stevia rebaudiana*. (Efecto de la interacción entre abonos orgánicos y micorriza INIFAP en el crecimiento de S*tevia rebaudiana*) 59

Marisol Hernández[a*+], José Ángel Robles Cervantes[b], Hugo Cesar Cisneros López[b], Silvano Ochoa Galaz[b], Julio Cesar León Vargas, Raúl René Robles Lacayo[b]. Luis Patricio Guevara Acevedo[b]. SALICYLIC ACID AND CHITOSAN EFFECT ON SEEDLING PRODUCTION OF POBLANO PEPPER (*Capsicum annuum* L.) 65

Cynthia Lizeth Jocobi-Aguilar[a*], María Carolina Ceballos-Bernal[a+], Miguel Ángel Sánchez-Rodríguez[a], Virginia Guadalupe Ramírez-Lizarraga[a]. EVALUATION OF AN ORGANIC FERTILIZER PRODUCED IN CIAD MAZATLAN PERFORMANCE ON CULTIVATION Zinnia (*Zinnia elegans*). [Evaluación de un abono orgánico producido en CIAD Mazatlán sobre el rendimiento en el cultivo de Zinnia (*Zinnia elegans*)]..... 66

Gloria M. Macedo Raygoza[a*], Miguel J. Beltrán García[b]. EVALUATION OF THE COLONIZATION PROCESS AND DETERMINATION OF THE BENIFICIAL EFFECTS OF THE BANANA ENDOPHYTIC BACTERIA. (Evaluación del proceso de colonización y determinación de los efectos benéficos de bacterias endófitas de banano) 73

Yanett Ivett Gallegos Diaz[a+]. DEVELOPMENT OF A SOLUBILIZING PHOSPHATE PRODUCT AND A PLANT GROWTH PROMOTER BASED ON A MICROBIAL CONSORTIUM WITH IMPACT ON THE BIOFERTILIZERS INDUSTRY. (Desarrollo de un producto solubilizador de fosfatos y promotor de crecimiento vegetal basado en un consorcio microbiano con impacto en la industria de biofertilizantes) 74

Andrea Gutiérrez-Santa Ana[a*], Alexis Preciado[a], Ileana Reyes[a], Miguel J. Beltrán-García[a+]. OPTIMIZATION OF A LIQUID MEDIA FROM WORM LEACHATE FOR FUNGAL BIOMASS PRODUCTION..... 75

Saúl Alejandro Medina Salazar[a*], Emmanuel Martínez Castro[a], Gisela Aguilar Benítez[a], Juan Manuel Pinos Rodríguez[b], José Pablo Lara Ávila[a+]. MOLECULAR AND METABOLOMIC CHARACTERIZATION OF *Pseudomonas* STRAINS ISOLATED FROM SOILS AND PLANTS. (Caracterización molecular y metabolómica de cepas de *Pseudomonas* aisladas de suelos y plantas) 76

Diana Marcela Arias-Moreno[a*], María de la Luz Guerrero-González[a], Laura Yáñez-Espinosa[b], Juan Francisco Jiménez-Bremont[c], Pablo Delgado-Sánchez[a+]. ABA REGULATES CHLOROPLASTS MOVEMENT IN PLANTS OF *Opuntia streptacantha*. (ABA regula el movimiento de cloroplastos en plantas de *Opuntia streptacantha*)..... 77

Saúl Josué Ramírez-Picón[a*], Marcela de la Mora-Amutio[a], Tesuya Ogura[a], Julia del Carmen Martínez-Rodríguez [a], Miguel Juan Beltrán-García [a+]. EXTRACTION OF ANTIMICROBIAL COMPOUNDS PRODUCED BY STRAINS OF *Trichoderma* (*T. asperellum, T. hamatun y T. tawa*) AND EVALUATION OF THE ANTIBIOTIC EFFECT AGAINST ENTERIC BACTERIA. (Extracción de compuestos antimicrobianos producidos por cepas de *Trichoderma* (*T. asperellum, T. hamatun* y *T. tawa*) y la evaluación de su efecto antibiótico contra bacterias entéricas) 78

David Rodríguez Rodríguez[*a], Miguel J. Beltrán-García[a]. SOLUBILISATION OF INSOLUBLE INORGANIC PHOSPHATE BY ENDOPHYTIC BACTERIA. (Solubilización de fosfato inorgánico por bacterias endófitas) 79

Emmanuel Martínez-Castro [a*], Saúl Alejandro Medina-Salazar [a], Ana Luz Romero-García [b], Mayra Janeth Esparza-Araiza [b], Ramón Jarquin-Gálvez [a], Juan Gualberto Colli-Mull [c], Ángel Gabriel Alpuche-Solís [b], José Pablo Lara-Ávila [a+]. MICROBIAL BIOSYNTHETIC POTENTIAL OF FROM FOREST SOILS AND COMPOSTS. (Potencial biosintético microbiano de suelos forestales y compostas) 80

Ma. Yessenia Neri Muñoz[a*+], Juan Alberto Osuna Castro[b], Martín Eduardo Ávila Miranda[a], Carlos Arias Castro[a], Martha Alicia Rodríguez Mendiola[a], Norma Alejandra Mancilla Margalli[a]. DYNAMIC OF STORAGE COMPOUNDS DURING THE MATURATION OF "CHAN" SEED (*Hyptis suaveolens* L. POIT). [Dinámica de los compuestos de reserva durante la maduración de la semilla de chan (*Hyptis suaveolens* L. Poit)]..... 81

Leslie Yael Carbajal Huerta[a*], Miguel Juan Beltrán-García[a], Gloria Margarita Macedo-Raygoza[b], Aurora Xihuitl Huerta Robles[c], Paolo Di Mascio[d]. ENDOPHYTIC BACTERIA ISOLATED FROM WILD *A. vilmoriniana* COLLECTED IN THE JALISCO STATE: EVALUATION AS PLANT GROWTH PROMOTERS FOR *A. tequilana*.

(Bacterias endófitas de *A. vilmoriniana* del Estado de Jalisco: Evaluación como promotoras de crecimiento de *A. tequilana*)..... 82

Erick Martínez Ojeda*[a], Claudia Santacruz Vázquez[b], Verónica Santacruz Vázquez[b], Roberto Ruiz Medrano[c], Beatriz Xoconostle Cázares [c], J. Jesús Hinojosa Moya[a+]. ABIOTIC STRESS IMPACT ON DEVELOPMENT AND PHYSIOLOGY OF TOMATO (*Solanum lycopersicum*). [Impacto del estrés abiótico sobre el desarrollo y fisiología del jitomate *(Solanum lycopersicum)*] 83

Efraín López Esteves *[a], Sofía Gámez Rojas [a], Claudia Santacruz Vázquez [b], Verónica Santacruz Vázquez[b], Roberto Ruiz Medrano[c], Beatriz Xoconostle Cázares, J. Jesús Hinojosa Moya[a+]. *Solanum lycopersicum* WT, A POTENTIAL CANDIDATE TO GENERATE TOLERANT PLANTS AT ADVERSE CONDITIONS. (*Solanum lycopersicum* WT, un candidato potencial para generar plantas tolerantes a condiciones adversas) 93

Alejandro Rubio Melgarejo[ab]*, Moisés Cortés-Cruz[a+], María Luisa Machuca Sánchez[b], Leticia Mónica Sánchez Herrera[b], Yolotzin Apatzingan Palomino Hermosillo[b]. GENETIC DIVERSITY ANALYSIS IN VARIETIES OF ROSELLE (*Hibiscus sabdariffa* L.) BY CYP450 MARKERS. (Análisis de Diversidad Genética de Variedades de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) Mediante Marcadores CYP450)..... 104

Brigitte Estefanía Lew Sánchez[a*], Itzayana Becerra Fuentes[a*], Miguel J. Beltrán García[a+], Gloria Margarita Macedo Raygoza[b], Claudia Ivette Cisneros Reyes[c]. ENDOPHYTIC BACTERIA FROM DIFFERENT MAIZE VARIETIES AND EVALUATION OF ITS AGRONONOMIC PROPERTIES. (Bacterias endófitas de diferentes variedades de maíz y evaluación de sus propiedades agronómicas)..... 111

Esteban Beltrán-Gracia[a]*, Gloria Macedo-Raygoza[b], Aurora X. Huerta Robles[b], Juan Villafaña-Rojas[a], Miguel J. Beltrán-García[a+]. CHARACTERIZATION OF BACTERIAL LIPOPEPTIDE EXPRESSION OF ENDOPHYTIC BACTERIAL STRAINS USING MALDI-TOF AND GENE SEQUENCIATION. (Caracterización de la expresión de lipopéptidos bacterianos de cepas nativas usando MALDI-TOF y secuenciación de genes relacionados)..... 112

Evelyn Yuritssy Garcia Ochoa[*a], Andrea Gutierrez Santa Ana[a], Gloria Macedo-Raygoza[b], Claudia Cisneros-Reyes [b], Miguel J. Beltrán-García[a+]. A SEED–TRANSMITTED BACTERIA FROM *Agave tequilana* WEBER. (Bacterias trasmitidas de semilla de *Agave tequilana Weber*) 113

Jorge Alberto Peralta-Mendoza[a]*, Ana Leticia Trewartha-Humarán[a], Gloria Macedo-Raygoza[b], Claudia Ivette Cisneros Reyes[c], Paolo Di Mascio[d], Miguel Juan Beltrán García[a+]. ASSOCIATED-SEED MICROORGANISMS IN *Agave* SPECIES: COMPARATIVE OF DIFFERENT MEXICAN AGAVES, ISOLATION, IDENTIFICATION AND BACTERIAL AGRONOMIC PROPERTIES. (Análisis de microbiota de semilla: comparativo de distintos agaves mexicanos, aislamiento, identificación y propiedades agronómicas bacterianas) 114

José Manuel Rodríguez-Domínguez[a]*, Sebastián González-Pérez[b], Rodrigo Barba-González[a], Ernesto Tapia-Campos[a+]. A COMPARISON OF THREE METHODS TO OBTAIN MITOTIC METAPHASE CHROMOSOME PREPARATIONS IN *Polianthes tuberosa* L. VAR. 'SINGLE'. (Comparación de tres métodos para la obtención de preparaciones cromosómicas metafásicas en *Polianthes tuberosa* Var. 'Simple')..... 115

Juana Suhey Ponce-Hernández[a+], Adriana Obregón-Cárdenas[a], Blanca Delia Muñoz-Gutiérrez[a], Juan José Ledezma[b], José Giovanni Aguirre Pérez[a*]. ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND BIOCOMPOUNDS ON NON-VOLATILE FRACTION OF ESSENTIAL OILS FROM ORANGE AND LEMON. (Actividad antioxidante, antimicrobiana y biocompuestos en la fracción no volátil de aceites esenciales de naranja y limón)..... 120

Lourdes Bautista Aguilar[a]*, Andrea García Quezada[a]*, Marcela De la Mora Amutio[a], Tetsuya Ogura[a], Julia del Carmen Martínez Rodríguez[a+]. DEVELOPMENT OF A MICROENCAPSULATED BIOFERTILIZER BASED ON AN ENDOPHYTIC BACTERIA CONSORTIUM OF AGAVE (*Agave tequilana* WEBER VAR. AZUL). (Desarrollo de un biofertilizante microencapsulado a base de un consorcio bacteriano endofítico de Agave) 128

María Isabel Cardoso Abonce[a], Pedro Eduardo Moreno-Zacarías[b*+]. DIAGNOSTIC STUDY OF PRODUCTION UNITS UNDER GREENHOUSE CONDITIONS, AT SALVATIERRA MUNICIPALITY, GUANAJUATO, MÉXICO. (Estudio de diagnóstico de las unidades de producción en condiciones de invernadero, en el Municipio de Salvatierra, Guanajuato. México) 129

Nicasio D. Sánchez-Cruz[a*], Juan Carlos Meza Contreras, Eduardo Salcedo Pérez, Yolanda González García[b+]. ISOLATION OF PLANT GROWTH PROMOTING BACTERIA IMPORTANT IN FORESTRY. (Aislamiento de bacterias promotoras del crecimiento vegetal de importancia en el área forestal) 137

Norma Danitzia Hernández Cervantes[a]*, Miguel Juan Beltrán García[a+]. DIAZOTROPHS APPLIED TO WHEAT CROPS AS AN ALTERNATIVE OF NITROGEN FERTILIZERS TO AVOID DEGRADATION SOIL 146

Ali Abdelmoteleb[a], Benjamin Valdez-Salas[b], Daniel González-Mendoza[a*+]. PHYTOSYNTHESIS OF SILVER NANOPARTICLES USING *Pluchea sericea* LEAF EXTRACTS AND THEIR ANTIMICROBIAL PROPERTIES. (Fotosíntesis de nanopartículas de plata usando extractos de *Pluchea sericea* y sus propiedades antimicrobianas) 147

Erick García Uribe[a]*, Julieta S. Veloz Rendon[a], Gloria M. Macedo Raygoza[c], Miguel Juan Beltrán García[b+]. DEVELOPMENT OF A BIO MICROBIAL FORMULATION FOR AGRICULTURAL APPLICATION IN CORN AND WHEAT, WITH AN IMPACT ON OVEREXPLOITED SOILS. (Desarrollo de una bioformulación microbiana para aplicación agrícola en maíz y trigo, con impacto en suelos sobre explotados) 148

Ileana Guadalupe Reyes Sepúlveda[a]*, Aurora Huerta[b], Gloria Margarita Macedo Raygoza[b], Claudia Ivette Cisneros Reyes[c], Miguel J. Beltrán García[a+]. MALDI-TOF MASS SPECTROMETRY VERSUS TRADITIONAL ITS SEQUENCING FOR IDENTIFICATION OF ENDOPHYTIC FUNGY FROM *Agave tequilana* WEBER WITH CAPACITY TO TRANSFER ORGANIC NITROGEN. (Identificación por espectrometría de masas MALDI-TOF contra secuencias ITS de hongos endófitos de *Agave tequilana* weber con potencial para transferir N.) 149

Mariana Checa Pastrana[a]*, Layna Gabriela Osuna Camacho[a], Miguel Juan Beltrán García[a+]. ENDOPHYTES DIVERSITY OF GROWTH PROMOTING BACTERIA ASSOCIATED WITH ROOTS OF CORN (*Zea mays*) AND GROWTH TRAITS FOR THE DEVELOPMENT OF THE PLANT. (Diversidad de bacterias endófitas promotoras de crecimiento asociadas a raíces de *Zea mays* y factores de crecimiento para el desarrollo de la planta) 150

Angeles Itchel Vázquez Fernández[a*], Norma Hernández[a], Gloria Macedo Raygoza[a], Claudia Cisneros-Reyes[a], Miguel J. Beltrán-García[a+]. WHEAT ENDOPHYTES ISOLATION AND IDENTIFICATION BY MALDI-TOF OF SEED BACTERIA. (Aislamiento de endófitos de trigo e identificación de bacterias por MALDI-TOF) . 151

Óscar De Jesús Flores Delgadillo[a*], Gloria Margarita Macedo Raygoza[a], Aurora Xihutil Huerta Roblesa[a], Rafael Villa angulo[a], Layna Gabriela Ozuna Camacho[a], Miguel J. Beltrán García[a+]. THE POTENTIAL OF SIMBIOTIC BACTERIA FROM CORN SEEDS AS BIOFERTILIZERS AGENTS. (El potencial de bacterias endófitas extraidas de semillas del maíz como agentes biofertilizantes) 152

Layna Gabriela Osuna Camacho[a]*, Mariana Checa Pastrana[a], Miguel Beltrán García[a+], Gloria Macedo[a], Claudia Cisneros[a]. ORGANIC NITROGEN TRANSFER TROUGH A DESIGNED BACTERIAL SYMBIOSIS AS A STRATEGY TO AVOID SOIL DEGRADATION CAUSED BY NITROGEN FERTILIZERS. (Transferencia de nitrógeno orgánico a través de una simbiosis bacteriana diseñada para evitar la degradación de suelos causada por fertilizantes nitrogenados) 153

Jesús Francisco Echaide-Aquino[a]*, Gloria Margarita Macedo-Raygoza[a], Claudia Ivette Cisneros Reyes[a], Miguel Juan Beltran-Garcia[a+]. CORN ENDOPHITIC BACTERIA SELECTION FOR ORGANIC NITROGEN TRANSFER. (Selección de endófitos de maíz para transferencia de nitrógeno orgánico) 154

AGROPECUARIA

Elizabeth Zendejas Aguilar[a]*, Ofelia Iñiguez Gómez[b], Laura Gómez de la Torre[b], José Manuel Palma García[c], Carlos Urban Häubi Segura[d], José de Jesús Olmos Colmenero[b+]. EVALUATION OF YIELD AND QUALITY OF FORAGE MAIZE HYBRIDS IN HIGH NORTHERN OF JALISCO FOR MILK PRODUCTION. (Evaluación de rendimiento y calidad de híbridos de maíz para forraje en Altos Norte de Jalisco para la producción láctea)..... 155

Milagros Ramírez-Soto*[a+], Víctor Valenzuela-Herrera[a]. EVALUATION OF KABULI CHICKPEA CULTIVARS ON THREE PLANTING DATES IN SINALOA, MEXICO. (Evaluación de variedades de garbanzo tipo kabuli en tres fechas de siembra en Sinaloa, México) 162

Luis Peinado Fuentes[*a], Genny Llaven Valencia[a], Ricardo Preciado Ortiz[b], Alberto Borbón Gracia[a]. EVALUATION OF EXPERIMENTAL CROSSES DOUBLE HAPLOID LINES CORN HIGH OIL IN NORTHERN SINALOA. (Evaluación de cruzas experimentales de líneas doble haploides de maíz con alto contenido de aceite en el norte de Sinaloa) 168

Susana García-Téllez[a,b], Gabriel Rincón-Enríquez[a], LuísLópez-Pérez[b], Evangelina Esmeralda Quiñones-Aguilar[a]*[+]. MYCORRHIZAL AND ORGANIC MATTER IN PROMOTING PLANT GROWTH AXIHUITL UNDER GREENHOUSE. (Micorrización y materia orgánica en la promoción del crecimiento vegetal del axihuitl bajo condiciones de invernadero)..... 175

Guillermo Fuentes-Dávila[a+], Pedro Figueroa-López[a], Miguel Alfonso Camacho-Casas[a], Pedro Félix-Valencia[a], José Luis Félix-Fuentes[a], Gabriela Chávez-Villalba[a], Javier Ireta-Moreno[b]*. EVALUATION OF THE REACTION OF DURUM WHEAT CULTIVARS AND LINES TO BLACK POINT, *Alternaria* sp., DURING THE CROP SEASON 2012-2013. **(**Evaluación de la reacción a la punta negra, *Alternaria* sp., en variedades y líneas de trigo cristalino en el ciclo 2012-13) 182

Guillermo Fuentes-Dávila[a+], Pedro Figueroa-López[a], Miguel Alfonso Camacho-Casas[a], Pedro Félix-Valencia [a], José Luis Félix-Fuentes [a], Gabriela Chávez-Villalba[a], Javier Ireta-Moreno[b]*. REACTION OF DURUM WHEAT CULTIVARS AND LINES TO PARTIAL BUNT, *Tilletia indica*, DURING THE CROP SEASON 2012-2013. (Reacción al carbón parcial (*Tilletia indica*) de variedades y líneas de trigo cristalino en el ciclo agrícola 2012-13)..... 190

Víctor Valenzuela-Herrera[a*+], Sixto Velarde-Félix[a], Gustavo A. Fierros-Leyva[b], Pedro F. Ortega-Murrieta, Isidoro Padilla-Valenzuela[e], J. Acosta-Gallegos[c], Milagros Ramírez-Soto[a], Erasmo Gutiérres-Perez[d], Raúl H. Sauceda-Acosta[e]. CHICKPEA CROP IMPROVEMENT FOR NORTHWEST OF MEXICO. (Mejoramiento Genético de Garbanzo para el Noroeste de México) 198

BIOCOMBUSTIBLES

José Guadalupe Estrella de los Santos[a*], Alvarado Rivera María Guadalupe[a], Alejandro Brena-Becerril[a+]. HOMOLOGY F420-DEPENDENT METHYLENE TETRAHIDROMETANOPTERINA DEHYDROGENASE OF *Methanopyrus kandleri* IN METHANOGENIC ARCHAEA. (Homología de la f420-dependent methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase de *Methanopyrus kandleri* en arqueas metanógenas) 204

Nayeli Quiñones-Islas[a*+], Karina García-Mariscal[a], Mario Orozco-Santos[a], Fabricio Lazcano-Escobar[b], Nadia Martínez-Ramírez[a]. EVALUATION OF OIL YIELD IN ECOTYPES OF *Jatropha curcas* AS AN ALTERNATIVE FOR BIOFUELS PRODUCTION IN COLIMA STATE, MÉXICO. (Evaluación del rendimiento de aceite en ecotipos de *Jatropha curcas* como alternativa de producción de biocombustibles en el estado de Colima, México)..... 205

José Marcos Vargas Sánchez[a*], Xochitl Niehus[a], Ayala-Mendivil[a], Leticia Casa-Godoy[a], Georgina Sandoval[a+]. SCREENING OF FUNGAL STRAINS FROM CIATEJ'S COLLETION TO SEARCH HYDROLASES. (Cribado de hongos de la colección de cepas de CIATEJ para la búsqueda de hidrolasas) 209

Stephany Magaly Mora-Juárez[a], Carolina Rodríguez-Pineda[a*], María de Jesús Perea-Flores[b1+], Sergio Odin Flores-Valle[a], Israel Arzate-Vázquez[b2], Juan Vicente Méndez-Méndez[b2], Daniel Arrieta-Báez[b3]. INTEGRAL STUDY OF *Ricinus communis* SEED: EFFECT OF DRYING PROCESS ON THE MICROSTRUCTURE, YIELD AND QUALITY OIL AND BIODIESEL. (Estudio integral de la semilla de *Ricinus communis*: effecto del proceso de secado sobre la microestructura, rendimiento y calidad del aceite y biodiesel)..... 210

BIOLOGÍA MOLECULAR

Saúl Uriel Corona Bautista[a*], Norma Ramírez Ramírez[a], Mario Pedraza Reyes[a+]. OVEREXPRESSION, PRODUCTION AND SECRETION OF *Myxobacter* sp. AL-1 GLICOSILHIDROLASE Cel48 IN *Bacillus subtilis*. (Sobreexpresión, producción y secreción de la glicosilhidrolasa Cel48 de *Myxobacter* sp. AL-1 en *Bacillus subtilis*)..... 211

Abner Julián Márquez-Fernández[a*+], Angel Ramos-Ligonio[a,b], Enrique Méndez-Bolaina[a,b], Aracely López-Monteon[a,b]. EXPLORATIVE AND RETROSPECTIVE STUDY OF A TEST FOR THE EARLY DIAGNOSIS OF

DENGUE VIRUS INFECTION. (Estudio exploratorio y retrospectivo de una prueba para el diagnóstico temprano de la infección por virus dengue)..... 219

María de Lourdes Valenzuela-Ponce[a*+], Misael Odín Vega-García[a], Karen Virginia Pineda-Hidalgo[a], Nancy Yareli Salazar-Salas[a], Jeanett Chávez-Ontiveros[a], José Angel López-Valenzuela[a]. IDENTIFICATION OF PROTEINS ASSOCIATED WITH CHILLING INJURY TOLERANCE INDUCED BY HYDROTHERMAL TREATMENT IN TOMATO FRUIT. (Identificación de proteínas asociadas con tolerancia al daño por frío inducida por tratamiento hidrotérmico en frutos de tomate)..... 226

Eugenia Aguilera, Brenda[a]*, Gabriela Chávez-Calvillo[b], Darwin Elizondo-Quiroga[a], Mónica Noemí Jiménez-García[c], Mauricio Carrillo-Tripp[c], Laura Silva-Rosales[b], Rodolfo Hernández-Gutiérrez[a], Abel Gutiérrez-Ortega[a+]. IMMUNOGENICITY OF PAPAYA RINGSPOT VIRUS-LIKE PARTICLES DISPLAYING A PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 2 EPITOPE. (Inmunogenicidad de partículas pseudovirales del virus de la mancha anular de la papaya que presentan un epítope del circovirus porcino tipo 2)..... 227

Tania Diaz Vidal[a,b]*, Georgina Sandoval[a+]. CLONING, EXPRESSION AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF LIPASES FROM *Carica papaya* IN *Pichia pastoris*. (Clonación, expresión y caracterización bioquímica de lipasas de *Carica papaya* en *Pichia pastoris*)..... 234

Gladys Guadalupe López Avalos [a*+], Martín López Rodríguez [b], Gustavo Mora Aguilera[c], Manuel Sandoval Díaz[b], Carlos Villanueva Arias[b], David Ulises Miranda Hernández[a], Carlos Arturo Vazquez Chacón[d], Ikuri Alvarez Maya[a]. MOLECULAR ANALYSIS OF THE STRAINS VARIABILITY IN DRUG-RESISTANT *M. Tuberculosis* IN POPULATION OF JALISCO STATE. (Análisis molecular de la variabilidad de cepas de *M. Tuberculosis* farmacorresistente en población del estado de Jalisco)..... 235

Karen García-Alejandro[a*+], Adolfo Romero-Cruz Víctor[a], Angel Ramos-Ligonio[a,b], Aracely López-Monteon[a,b]. EVALUATION OF CLONAL ANERGY AND APOPTOSIS IN MURINE SPLENOCYTES IMMUNIZED WITH THE RECOMBINANT PROTEIN GST-NS3 OF DENGUE VIRUS. (Evaluación de anergia clonal y apoptosis en esplenocitos murinos inmunizados con la proteína recombinante GST-NS3 del virus dengue)..... 242

Patricia Berenice Ramírez Rodríguez[a*], Rodrigo Rosario Cruz[b], Rodolfo Hernández Gutiérrez[a], Sara Elisa Herrera Rodríguez, Daniel Ortuño Sahagún[c], Delia Inés Domínguez García[a], Darwin Elizondo[a], Moisés Martínez Velázquez[a+]. IDENTIFICATION OF IMMUNOGENIC PROTEINS FROM OVARIAN TISSUES OF THE CATTLE TICK *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* BY AN IMMUNOPROTEOMIC APPROACH. (Identificación de proteínas inmunogénicas de tejido de ovarios de la garrapata de ganado *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* mediante un enfoque inmunoproteómico)..... 248

Bernardo Sachman-Ruiz[a*+], Raquel Cossio-Bayugar[a], Estefhan Miranda-Miranda[a], Juan Diego Peréz de la Rosa[b], José Javier Pérez de la Rosa [b], Luis Lozano[c]. ANALYSIS AND PROSPECTS FOR GENOME SEQUENCING *Paenibacillus larvae* LARVAE MEX14 ISOLATED FROM HONEY BEE IN MEXICO CITY. (Análisis y perspectivas de la secuenciación del genoma de *Paenibacillus larvae* MEX14 aislado de larvas de abeja de la miel en la ciudad de México)..... 256

Flor de Fátima Rosas-Cárdenas[a,b*], Rocío Escobar-Guzmán [a], Andrés Cruz-Hernández[c] , Nayelli Marsch-Martínez[d], Stefan de Folter[a+]. MiRNA DETECTION AND LOCALIZATION IN CROP PLANTS. (Detección y localización de miRNAs en plantas de interés agronómico)..... 259

Eduardo Catarino Téllez Valerio[a], Marco Antonio Sánchez Olaya[a], Eduardo Vázquez Portillo[a], Saraí López Maldonado[a], Silvia Luna Suárez[a], Flor de Fátima Rosas Cárdenas[a*+]. CLONING AND OVEREXPRESSION OF LOW ABUNDANCE MiRNAS IN *Arabidopsis*. (Clonación y sobreexpresión de miRNAs de baja abundancia en *Arabidopsis*)..... 265

Rosa Elena Ponce Ramos[a]*, Luis Gonzalo Higareda de Sales[b], Sara Elisa Herrera Rodríguez[a+]. MOLECULAR IDENTIFICATION OF CYTOKINE PROFILE, IN BOVINE COLOSTRUM FROM: REACTORS AND NON-REACTORS, IN CATTLE NATURALLY EXPOSED TO *Mycobacterium bovis*. (Identificación molecular del perfil de citocinas en calostro de bovinos reactores y no reactores, naturalmente expuestos a *Mycobacterium bovis*) 271

Ana Laura Arenas-Navarro[a]*; Ramón Ignacio Arteaga-Garibay[b+]; Marcos Daniel Martínez-Peña[b]; Jorge David Cadena- Zamudio[b]; Porfirio Gutiérrez-Martínez[a]. DESIGN OF PRIMERS FOR AMPLIFICATION OF GENES ASSOCIATED WITH THE BIOSYNTHESIS OF SIDEROPHORE PSEUDOMONINE. (Diseño de iniciadores para la amplificación de genes asociados a la biosíntesis del sideróforo pseudomonina) 279

María del Carmen Espitia Carlos[a*+], Fernando Santacruz Ruvalcaba[a], José Pedro Castruita Domínguez[a], Juan Florencio Gómez Leyva[b], Carla Vanessa Sánchez Hernández[a], Gil Virgen Calleros[a], Lucila Méndez Morán[a]. (Expresión genética de una quitinasa en callos de *Agave tequilana* Weber variedad azul en respuesta a *Fusarium* spp.)..... 285

Isaura Méndez-Rodríguez[a], Socorro Hernández-Arteaga[a*+], Milagros González-Hernández[a], Fernando Muñoz-Tenería[a]. MOLECULAR IDENTIFICATION OF BOVINE FIBROPAPILLOMATOSIS IN CATTLE OF SAN LUIS POTOSÍ. (Identificación molecular de fibropapilomatosis bovina en ganado de San Luis Potosí) ... 286

Galdy Hernández-Zárate[a+], Tanya Amanda Camacho-Villegas[b*], Jorge Zamora-Castro[a], Jorge Jaime Juárez-Lucero[a], Pavel Hayl Lugo-Fabres[c], Liliana M. Alzate-Gaviria[d], Carlos Lezama-Cervantes[e]. IMMUNO DIAGNOSTICS OF *Vibrio harveyi* BASED ON CHICKEN ANTIBODY FRAGMENT. (Inmunodiagnóstico de *Vibrio harveyi* basado en fragmentos de anticuerpo de gallina) 287

Pedro Luis Vargas-Arias[a]*, Victor Manuel Ayala-García[a], Mario Pedraza-Reyes[a]. ROLE OF DNA POL-I AND DNA POL-III IN ALTERNATIVE EXCISION REPAIR (AER) OF DEAMINATED DNA BASES IN *Bacillus subtilis*. (Papel de DNA Pol-I y DNA Pol-III en la remoción de bases desaminadas mediante la ruta de reparación por escisión alternativa (AER) de *Bacillus subtilis*)..... 296

María Fernanda Guerrero Benítez[b], Concepción Sosa García[b], Itzel Amaro Estrada[a*+], Rosa Estela Quiroz Castañeda[a], Sergio D. Rodríguez Camarillo[a]. CLONING AND HETEROLOGOUS EXPRESSION OF A NOVEL AND DIVERSE PROTEIN FROM THE RICKETTSIA *Anaplasma marginale*. (Clonación y expresión heteróloga de una proteína nueva y diversa de la rickettsia *Anaplasma marginale*) 304

Claudia Desireé Norzagaray-Valenzuela[b*], Karla Denisse Luna-Avelar[a], Jorge Milán-Carillo[a,b], Cuauhtémoc Reyes-Moreno[a,b], Angel Valdez-Ortiz[a,b], Lourdes Janeth Germán-Báez[b+]. TRANSIENT EXPRESSION OF *GUS* REPORTER GENE IN GREEN MICROALGAE *Dunaliella tertiolecta* MEDIATED BY *Agrobacterium tumefaciens*. (Expresión transitoria del gen reportero *GUS* en la microalga verde *Dunaliella tertiolecta* mediada por *Agrobacterium tumefaciens*)..... 311

Ma Guadalupe González-Palomar[a]*, Gustavo Mora-Aguilera[b], Gladys López-Avalos[a], Martin López-Rodríguez[c], Manuel Sandoval-Díaz[c], Juan Carlos Villanueva-Arias[c] , Ikuri Álvarez-Maya[a+]. GEOSPATIAL STUDY USING A MODEL FOR ANALYSIS OF DRUG RESISTANCE PATTERNS OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* STRAINS IN JALISCO STATE MEXICO. (Estudio geoespacial usando un modelo para el análisis de patrones de resistencia a drogas en cepas de M*ycobacterium tuberculosis* del estado de Jalisco; México) 318

Marcos Daniel Martínez-Peña[*a+], Ramón Ignacio Arteaga-Garibay[a], Alba Margarita Hernández-Ibáñez[c], Yolanda Salinas-Moreno[b], Samuel Gaytán-Ramírez[c], María Dolores Méndez-Robles[d]. GENETIC IDENTIFICATION OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM ADOBERA CHEESE. (Identificación genética de bacterias ácido lácticas aisladas de queso adobera) 325

Francisco Alejandro Lagunas Rangel[a]*, Carlos Cortés Penagos[a,b+]. COMPARATIVE DETECTION OF FLT3-ITD MUTATION IN ACUTE MYELOID LEUKEMIA. (Detección comparativa de la mutación FLT3-ITD en pacientes con leucemia mieloide aguda) 326

Alexia Mejía-del Río[a] *, Aurora Huerta-Valle[b], Miguel Beltrán-García[a+]. ACC DEAMINASE ACTIVITY AND EVALUATING ACDS GENE IN ENDOPHYTIC AND SOIL MICROORGANISMS. (Actividad de ACC desaminasa y evaluación del gen acdS en microorganismos endófitos y de suelo) 332

Aurora X. Huerta Robles[*a], Rafael Villa Angulo[a], Miguel J. Beltrán García[b+]. BIOINFORMATIC ANALYSIS OF ASSOCIATED GENES IN THE PLANT-ENDOPHYTE BACTERIA INTERACTION AND ORGANIC NITROGEN TRANSFER IN BANANA (*Musa acuminata*). [Análisis bioinformático de genes asociados en la interacción planta-endófito y en transferencia de nitrógeno en banano (*Musa acuminata)*] 333

Miguel Ángel González-Reyes[a]*, Hilda Eréndira Ramos-Aboites[a], Rafael Montiel[a+]. PROTEOMIC ANALYSIS OF ENTOMOPATHOGENIC NEMATODE *Steinernema carpocapsae* (RHABDITIDA: STEINERNEMATIDAE) INDUCED IN HAEMOLYMPH AND GUT OF *Galleria mellonella* (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE). (Análisis proteómico del nematodo entomopatógeno *Steinernema carpocapsae* [Rhabditida: Steinernematidae] inducido en hemolinfa e intestino de *Galleria mellonella* [Lepidoptera: Pyralidae]) 334

Javier Cuauhtémoc Fragoso Jiménez[a*+], Rodrigo Barba González[a], Patricia Dupre[a], Ma. Claudia Castañeda Saucedo[b], Ernesto Tapia Campos[a]. GENETIC DIVERSITY IN WILD SPECIES OF THE GENUS *Polianthes*. (Diversidad genética en especies silvestres del género *Polianthes*) 343

María Carola De la Torre- Becerra[a]*, Jorge Alberto López -Carlos[a], Guadalupe Gálvez- Barbosa[a], Marcela de la Mora-Amutio[a], Tetsuya Ogura[a], Julia Del Carmen Rodríguez- Martínez[a]. SELECTION OF ENDOPHYTIC DIAZOTROPHIC BACTERIA BY THE MOLECULAR ANALYSIS OF GENE *NIF-H* USING NESTED PCR OF ISOLATED SEEDS AGAVE (*A. tequilana* WEBER VAR. AZUL). [Selección de bacterias diazotróficas endófitas por el análisis molecular del gen *nif-H* mediante PCR anidada aisladas de semillas de agave (*A. tequilana* Weber var. azul)] 349

Prisiliana Velázquez Bernardino[a*], Antonio De León Rodríguez[a+]. THE ANTI-ANGIOGENIC PEPTIDE Vs30 DOES NOT INCREASE PROLIFERATION OF THE CANCER CELL LINES HeLa AND Jurkat. (El péptido antiangiogénico Vs30 no incrementa la proliferación de las lineas celulares de cáncer HeLa y Jurkat) .. 350

Graciela López Guzmán[a*], Juan F. Gómez Leyva[b+], Pablo G. Ruelas Hernández[a], Ivonne Carrillo Basañez[a*], Mónica L. Sánchez Herrera[a] , Apatzingán Palomino Hermosillo[a]. MOLECULAR CHARACTERIZATION OF CREOLE AVOCADO (*Persea americana* Mill.) DETERMINED BY ISSRs. [Caracterización molecular de aguacate criollo (*Persea americana* Mill.) determinada por ISSRs] 351

Luis Felipe Guzmán Rodríguez[a*+], Manuel de Jesús Bermúdez Guzmán[b], José Joaquín Velázquez Monreal[b], Mario Orozco Santos[b]. DETECTION OF *Candidatus Liberibacter asiaticus* IN CITRUS PLANTS BY REAL-TIME PCR. (Detección de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en cítricos mediante PCR tiempo real) 357

Karen Eunise Luna-Enríquez[a*]; Guadalupe Gálvez-Barbosa[a], Edwin Antonio Santiago-Martínez[a], Fernando Ramírez-Bobadilla[a] Enrique Tinajero-Cortés[b], Miguel Juan Beltrán-García[a], Julia del Carmen Martínez-Rodriguez[a+]. EVALUATION OF GENE EXPRESSION (nifH) ON ENDOPHYTIC NITROGEN-FIXING BACTERIA OF BANANA ENANA GIGANTE CAVENDISH. (Evaluación de la expresión del gen nifH en bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno de banano enano gigante subgrupo cavendish) 363

BIOMATERIALES

Carlos E. Torres-Cerna*[a], Martha Bermejo-Jambrina[b], Ignacio Poblete-Castro[c], Alma Y. Alanís[a], Esteban A. Hernandez-Vargas[b]. MATHEMATICAL MODELING FOR BIOPOLYMER PRODUCTION BY *Pseudomonas putida* CULTURES. (Modelado Matemático para la Producción de Biopolímeros Mediante Cultivos de *Pseudomonas putida*) 364

Claudia Andrea Romero-Bastida[ac]*, Delia Rita Tapia-Blácido[b], Luis Arturo Bello-Pérez[a], Ma. Guadalupe Méndez-Montelavo[c], Gonzalo Velazquez[c]. CHARACTERIZATION OF STARCH-MMT NANOCOMPOSITES BY SEM, FTIR AND TGA USING TWO METHODOLOGIES. (Caracterización de nanocompositos almidón/MMT POR SEM, FTIR y TGA usando dos metodologías) 371

Cecilia Sánchez-Jiménez[a]*, José Guadalupe Quiñones[b], Gregorio Guadalupe Carbajal-Arízaga[a]. SYNTHETIC CLAYS SYNTHESIS AND STUDY OF THEIR OPTICAL PROPERTIES. (Síntesis de arcillas sintéticas y estudio de sus propiedades ópticas) 377

María Guadalupe Iniestra Galindo[a*], Francisco Rodríguez González[b], Benjamín Marcos Marín Santibáñez[a,+], José Pérez González[c]. EVALUATION OF PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF NATURAL FIBERS REINFORCED THERMOPLASTIC STARCH FILMS. (Evaluación de propiedades fisicoquímicas de películas de almidón termoplástico reforzadas con fibras naturales) 386

Jorge Eduardo Zamora-Castro[a*], Ángel Leal-Rodríguez[b], Galdy Hernández-Zárate[a+], Carlos Lezama-Cervantes[c], Juan Zacarías Lorenzo-Gregorio[b], Noé Trinidad-Marcos[b], Liliana María Álzate-Gaviria[d], Ricardo Herbé Cruz-Estrada[e]. NATURAL SORBENTS FOR WASTEWATER TREATMENT IMPACTED BY PATHOGENIC BACTERIA. (Sorbentes naturales para el tratamiento de aguas residuales impactadas con bacterias patógenas) 387

Carlos F. De la Peña C.[a]*, Tito E. Herrera L.[a+], Roberto Ibarra W[b]. MICROENCAPSULATION OF CURING AGENT FOR THE FORMULATION OF EPOXY ADHESIVES. (Microencapsulación de un agente de curado para la formulación de adhesivos epóxicos)..... 395

Francisco José Aranda-García[a*+], Rubén González-Nuñez[a], Carlos Federico Jasso-Gastinel[a], Martín Rabelero Velazco[a], J. Felix Armando Soltero Martínez[a], Eduardo Mendizabal Mijares[a]. MECHANODYNAMIC PROPERTIES OF COMPOSITES BASED ON THERMOPLASTIC STARCH/POLY(LACTIC ACID)/AGAVE BAGGASE FIBER. (Absorción de agua y propiedades mecanodinámicas de compositos con base en el almidón termoplástico/Poli (ácido láctico)/ Fibra de Bagazo de Agave) 396

Nely Ríos Donato[a], Martha Patricia Macías Pérez[a*], José Antonio Rivera Mayorga[a], Eduardo Mendizábal Mijares[a*+]. REMOVAL MECHANISM OF CADMIUM ION BY CHITOSAN SULFATE. (Mecanismo de remoción del ión cadmio por sulfato de quitosana)..... 407

Gilberto Velázquez-Juárez[a*+], Gregorio Carbajal Arizaga[a]. LAYERED DOUBLE HYDROXIDES (LDH) FOR THE IMMOBILIZATION BY METAL AFFINITY OF GENETIC ENGINEERED ENZYMES FOR THE DEVELOPMENT OF BIOSENSORS. (Hidróxidos dobles lamelares (HDL) para la inmovilización por afinidad a metales de enzimas modificadas genéticamente para el desarrollo de biosensores)..... 412

María de Jesús Palacios Sánchez[a*+], Eduardo Mendizábal Mijares[a] y Maite Renteria Urquiza[a]. POLY(ETHYLCIANOACRYLATE-CO-ETHYLENGLICOL) NANOPARTICLES SYNTHETIZED BY SEMICONTINUOUS HETEROGENEOUS POLYMERIZATION FOR RELEASING ZERANOL. (Nanoparticulas de poli (etilcianoacrilato-co-etilenglicol) (PECA-PEG) por síntesis de polimerización semicontinuaheterogenea para la liberación de Zeranol) 413

Othon Sanchez R.[a]*, Victor Padilla F.[a], Tito E. Herrera L.[a+], Roberto Ibarra W [b]. PREFORMULATED EPOXY ADHESIVE STABLE TO ROOM TEMPERATURE AND UV CURABLE. (Adhesivo epoxico preformulado estable a temperatura ambiente y curable por UV)..... 423

Luis Octavio Ponce de León García[a]*, Erika Roxana Larios Duran[a], Gilberto Velázquez Juárez[b]. GENERATION OF AN AMPEROMETRIC BIOSENSOR FOR TYPE 6X-HISTAG-DEHYDROGENAS ENZYMES IMMOBILIZED BY MODIFIED GOLD ELECTRODE AFFINITY. (Generación de un biosensor amperométrico para enzimas tipo 6x-histag-deshidrogenasas inmovilizadas por afinidad en electrodo modificado de oro) 424

Jessica Badillo-Camacho[a]*, Sergio Gómez-Salazar[b+]. EGGSHELLS AND MEMBRANES FOR REMOVAL OF Cr (VI) FROM AQUEOUS SOLUTIONS. (Cascarones de huevo y sus membranas para remoción de Cr (VI) de soluciones acuosas)..... 429

Erika Vianey Torres Tello[a*], Jorge Ramón Robledo Ortíz[b], Yolanda González García[b+], Eduardo Mendizábal Mijares[a]. PRODUCTION OF BIOPOLYESTERS FROM SUGAR BY FERMENTATION WITH *Burkholderia sacchari*. (Producción de biopoliésteres a partir de azúcar por fermentación con *Burkholderia sacchari*) 434

BIORREMEDIACIÓN

Roberto Carlos Martínez-Hernández[a]*, Ma. Del Socorro Santos-Díaz[a+]. COMPARISON OF LEAD REMOVAL EFFICIENCY BY *Scirpus americanus* PLANTS TRANSFORMED GENETICALLY AND NOT TRANSFORMED. (Comparación de la eficiencia de remoción de plomo por plantas de *Scirpus americanus* (tule) transformadas genéticamente y no transformadas)..... 441

Brenda Montañez Barragán[a], Paulina Gutiérrez Macías*[b], Lourdes Hernández De Jesús[b], Blanca Estela Barragán Huerta[b+]. BIODEGRADATION IN TWO STAGES OF BLACK REACTIVE 5 DYE BY *Halomonas sp*. AT ALKALINE AND HIGH SALINITY CONDITIONS. (Biodegradación en dos etapas del colorante Negro Reactivo 5 por *Halomonas* sp. en condiciones alcalinas y de alta salinidad) 448

José Roberto Zúñiga-Silva[a*+], Octavio Loera-Corral[b], Ricardo Aguilar-López[a], Refugio Rodríguez-Vázquez[a]. EFFECT OF CO-INOCULATION OF ARBUSCULAR MYCORRHIZA AND PHOSPHATE SOLUBILIZING FUNGI ON THE ACCUMULATION OF CADMIUM (Cd^{2+}) IN *Phragmites australis*. (Efecto de la co-inoculación de micorrizas arbusculares y hongos solubilizadores de fosfato en la acumulación de cadmio (Cd^{2+}) en *Phragmites australis*)..... 455

Karina de la Paz García-Mariscal[a*+], Nayeli Sarahi Quiñones-Islas[a], Manuel de Jesús Bermúdez-Guzmán[a]. BIODEGRADATION OF TOTAL PHENOLS IN WASTE PULPING PROCESS LIQUIDS ORGANOSOLV. (Biodegradación de fenoles totales en líquidos residuales del proceso de pulpeo Organosolv) 462

Luz Adriana Vizcaíno Rodríguez[a]*+, Daniela Ivett Villavicencio[a], Alejandro Brena Becerril[a], Juan Luis Caro Becerra[a], Ramiro Lujan Godínez[a], María Eugenia Mosqueda Ochoa[a]. IN SEARCH OF HEALTHY ALTERNATIVES CAJITITLÁN LAKE, USING AS A BIOLOGICAL INDICATOR *Escherichia coli*. (En búsqueda de alternativas saludables para la Laguna de Cajititlán, empleando como indicador biológico: *Escherichia coli*) 471

Dianyss Linares Ramírez[a]*, José Roberto Zuñiga Silva[b +], Sebastián González Manrique[c], Martha Barajas Aceves [b], Ma. del Carmen Fajardo Ortíz[a], Refugio Rodríguez Vázquez[b]. CADMIUM REMOVAL BY DEAD AND ACTIVE BIOMASS OF *Trichoderma atroviride*. (Remoción de Cadmio por biomasa inactiva y activa de *Trichoderma atroviride*) 472

Víctor Carpanta Capistrán[a*], Alexis Joavany Rodríguez Solís[b], Ma. Lourdes Acosta-Urdapilleta[b], Elba Cristina Villegas Villarreal[b+]. DEGRADATION OF AMPICILLIN AND CHLORAMPHENICOL BY BASIDIOMYCETES FUNGI. (Degradación de ampicilina y cloramfenicol por hongos basidiomicetes)..... 481

Sergio Hernández Martínez[a*+], Lidia Olvera Ávila[b]. FLUORINE REMOVAL BY CHEMISTRY COPRECIPITATION. (Remoción de flúor por coprecipitación química) 482

Valeria Figueroa Velarde[a*], Mayra García Sánchez[b], Orfil González Reynoso[a], Jorge Robledo Ortiz[b], Luis Carlos Rosales Rivera[a+]. ENZYMATIC ACTIVITY MEASUREMENT AND CHARACTERIZATION OF PHYSICALLY ADSORBED HRP ENZYME ON HDPE/AGAVE FIBER COMPOSITES. (Medición y caracterización de la actividad enzimática de la enzima HRP adsorbida físicamente sobre composites espumados de HDPE/fibra de agave) 483

BIOLOGÍA DE RECURSOS NATURALES

Wilberth Chan-Cupul*[a+], Gabriela Heredia-Abarca[b], Refugio Rodríguez-Vázquez[c]. SCREENING OF FUNGAL LIGNINOLYTIC ENZYMES IN NATIVE MACROMYCETES FROM VERACRUZ, MEXICO. (Screening de enzimas ligninolíticas fúngicas en macromicetos nativos de Veracruz, México) 490

Wilberth Chan-Cupul*[a+], Gabriela Heredia-Abarca[b], Refugio Rodríguez-Vázquez[c]. MYCOREMEDIATION OF A CONTAMINATED SOIL WITH ATRAZINE USING LIGNINOLYTIC ENZYMES. (Micorremediación de un suelo contaminado con atrazina usando enzimas ligninolíticas) 491

María de los Dolores Martínez Martínez[a*], Sofía Loza Cornejo[a+], Hilda Julieta Arreola Nava[b]. MORPHOLOGICAL VARIATION OF VEGETATIVE AND REPRODUCTIVE CHARACTERS OF SOME GLOBOSE SPECIES OF CACTACEAE. (Variación morfológica de caracteres vegetativos y reproductivos de algunas especies globosas de cactaceae) 492

Andrés Fierro Álvarez[a*+], María Magdalena González López[a], Carlos Alberto Monsalvo Castillo[b]. THE PROPAGATION OF TWO CULTIVARS of *Tradescantia zebrina* Heynh. Ex Bosse (MATALI), IN MEXICO CITY. (La propagación de dos cultivares de *Tradescantia zebrina* Heynh. ex Bosse (MATALÍ), en el D.F.) 493

Andrés Fierro Álvarez[a*+], María Magdalena González López[a], Carlos Alberto Monsalvo Castillo[b]. DEVELOPMENT AND TAKING ROOT OF CUTTINGS OF *Mentha piperita* L., LEMON CULTIVAR WITH DIFFERENT CONCENTRATIONS OF AUXINS IN MEXICO CITY. (Prendimiento y desarrollo de esquejes de *Mentha piperita* L., cultivar limón, con diferentes concentraciones de auxinas, en EL D.F.) 494

María Magdalena González López[a*], Andrés Fierro Álvarez[a], Carlos Alberto Monsalvo Castillo[b]. DEVELOPMENT AND TAKING ROOT OF *Tropaeolum majus* L., IN MEXICO, CITY. (Prendimiento y desarrollo de esquejes de *Tropaeolum majus* L., en el D. F.) 495

María Magdalena González López[a*], Andrés Fierro Álvarez[a+], Carlos Alberto Monsalvo Castillo[b]. DEVELOPMENT AND TAKING ROOT OF *Plectanthus oloroso (Vaporub)* IN MEXICO CITY. (Prendimiento y desarrollo de *Plectanthus oloroso* (Vaporub) en el D. F.) 496

Diana Elena Aguirre Cavazos[a]*, Sergio Salcedo Martínez[a], Sergio Moreno Limón[b]. CURRENT STATE OF KNOWLEDGE OF FRESHWATER ALGAE IN THE SANTA CATARINA RIVER, MONTERREY, N.L. (Estado del conocimiento de las algas del lecho del río Santa Catariana, Monterrey N.L.) 497

Miguel Ángel Sánchez-Rodríguez[a+], Cynthia Lizeth Jocobi-Aguilar[a*], Omar Calvario Martínez[a]. EVALUATION OF THE TROPHIC STATE BY MEANS OF THE TRIX INDEX IN THE URIAS ESTUARY, MAZATLAN, SINALOA. (Evaluación del estado trófico mediante el índice TRIX en el estero de Urías en Mazatlán, Sinaloa) 504

Adrian Leyte Manrique[a]*+, Aurelio Ramírez Bautista[b]. CURRENT STATUS OF LIZARDS OF THE GENUS *SCELOPORUS* IN TWO NATURAL PROTECTED AREAS OF THE STATE OF HIDALGO, MEXICO. (Situación actual de las lagartijas del género S*celoporus* en dos áreas naturales protegidas del Estado de Hidalgo, México) 512

Laura González Ortiz[a+], Jesús Ángel de León González[a], Jesús E. Mendieta Castillo[a]*. POLYCHAETES BURROWS OF THE CLAM LION'S HAND IN THE LAGUNA OJO DE LIEBRE, GUERRERO NEGRO, BAJA CALIFORNIA SUR, MEXICO. (Poliquetos perforadores de la almeja mano de león en la LAGUNA Ojo de Liebre, Guerrero Negro, Baja California Sur, México) 521

Diana Elena Aguirre Cavazos[a], Sanjuana Cecilia Galicia Campos[a], Rossana Desaili Bonilla Parra[a], Regina Olvido Martínez Verduzco[a], Sergio Moreno Limón[a], Sergio Salcedo Martínez[a*+]. NUEVO LEON ALGAE: NEW RECORDS IN THE MONTERREY CONURBATION. (Algas de Nuevo León: nuevos registros en el área conurbana de Monterrey) 522

Oscar Eduardo Sepúlveda Salazar[a], Laura Fernanda González Martínez[a], Diana Marcela Arias Moreno[a], Zaida Zarely Ojeda Pérez[a*+]. GENETIC DIVERSITY OF *Espeletia paipana*, ENDEMIC SPECIES TO THE COLOMBIAN BOYACÁ PÁRAMO. (Diversidad genética de *Espeletia paipana*, especie endémica del Páramo Boyacense Colombiano) 523

Zarely Ojeda-Pérez Zaida[ab]*, Juan Francisco Jiménez-Bremont[c], Margarita Rodríguez-Kessler[d], Federico Villarreal-Guerrero[e], Pablo Delgado-Sánchez[a+]. EFFECT OF EXTREMES TEMPERATURE ON PHOTOSYNTHETIC EFFICIENCY CACTUS PLANTS. (Efecto de temperaturas extremas en la eficiencia fotosintética de plantas de nopal) 524

Manuel GarcíaUlloa Gómez[a*+], Andrés Martín Góngora Gómez[a], Brenda Paulina Villanueva Fonseca[a], María Isabel Sotelo Gonzalez[a]. EFFECT OF THE STOCKING DENSITY ON GROWTH AND SURVIVAL OF THE JAPANESE OYSTER *Crassostrea gigas* IN NAVOLATO, SINALOA. (Efecto de la densidad en el crecimiento y supervivencia del ostión japonés *Crassostrea gigas* en Navolato, Sinaloa) 525

Manuel GarcíaUlloa Gómez[a*+], Andrés Martín Góngora Gómez[a], Ana Laura Domínguez Orozco[a], Manuel García Ulloa Jr[b]. ASPECTS OF THE HOST-COMMENSAL RELATIONSHIP BETWEEN A PALAEMONID SHRIMP (*Pontonia margarita*) IN THE PEN SHELL (*Atrina tuberculosa*). [Aspectos de la relación huésped-comensal entre el camarón Palaemonido (*Pontonia margarita*) en el callo de hacha (*Atrina tuberculosa*)]..... 526

Andrés Martín Góngora Gómez[a*+], Lizeth Carolina Villanueva Fonseca[a], Manuel García Ulloa[a], Ana Laura Domínguez Orozco. INFECTION OF THE PROTOZOAN *Perkinsus* sp. TO THE CALLISTA CLAM *Megapitaria squalida* IN THE ESTERO BACOREHUIS, AHOME, SINALOA. (Infección del protozoario *Perkinsus* sp. en la almeja chocolata *Megapitaria squalida* en el Estero Bacorehuis, Ahome, Sinaloa) 527

Andrés Martín Góngora Gómez*[a], Manuel García Ulloa Gómez[a], Ana Laura Domínguez Orozco[a], Lizeth CarolinaVillanueva Fonseca[a]. REPRODUCTIVE CYCLE OF THE PEN SHELL *Atrina maura* (MOLLUSCA: PINNIDAE) IN ISLA LOS REDOS, NAVOLATO, SINALOA. (Ciclo reproductivo del molusco callo de hacha *Atrina maura* (Mollusca: Pinnidae) en Isla Los Redos, Navolato, Sinaloa) 531

Juan Antonio Hernández Sepúlveda[a]*, Andrés Martín Góngora Gómez[a+], Brenda Paulina Villanueva Fonseca[a], Manuel GarcíaUlloa Gómez[a]. HEAVY METALS CONCENTRATIONS (COPPER, CADMIUM, LEAD, ZINC AND MERCURY) IN *Atrina maura* CULTURED IN THE ESTERO ALPATAGUA, GUASAVE, SINALOA. (Concentración de metales (cobre, cadmio, plomo, zinc y mercurio) en *Atrina maura* cultivado en el Estero Alpatagua, Guasave, Sinaloa) 532

Juan Antonio Hernández Sepúlveda[a]* Andrés Martín Góngora Gómez[a+], María Isabel Sotelo Gonzalez[a], Manuel GarcíaUlloa Gómez[a]. NEW DISTRIBUTION OF THE SIPHON CLAM *Panopea globose* IN THE NORTHWEST OF MEXICO. (Nueva distribución de la almeja sifón *Panopea globosa* en el noroeste de México) 533

Ana Florencia Ayala-Jauregui[a]*, Eduardo Sahagun- Godinez[a,+] Oscar David Cibrian-Ornelas[b], Roberto Conejo-Camargo[b]. POPULATION STRUCTURE AND REPRODUCTIVE POTENTIAL OF *Arachnothryx jaliscensis* BORHIDI ET E MARTINEZ (RUBIACEAE) IN THE SANTIAGO RIVER CANYON. (Estructura poblacional y potencial reproductivo de *Arachnothryx jaliscensis* Borhidi et E Martinez (Rubiaceae) en la Barranca del Río Santiago) 534

BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA

Victoria Martínez Acebedo[a*+], Leticia Mónica Sánchez-Herrera[a], María Teresa Sumaya-Martínez[a], Edgar Iván Jiménez-Ruiz[a], Leticia Guerrero Rosales[a], Mónica Elizabeth Martínez González[a], Rosendo Balois-Morales[a], Yolotzin Apatzingan Palomino-Hermosillo[a]. EVALUATION OF THE ACTIVITY OF LIPOLYTIC COMPLEX IDENTIFIED IN LATEX JACA, *Artocarpus heterophyllus* L. (Evaluación de la actividad del complejo lipolítico identificado en el látex de jaca, *Artocarpus heterophyllus* L.) 547

Marcos Antonio Godoy Zaragoza[a*+], Jesús Cervantes Martínez[a], Jorge Alberto García Fajardo[a]. DETERMINATION OF THE INFLUENCE OF THREE PROCESS VARIABLES IN OSMOTIC DEHYDRATION OF *Granny Smith* APPLE CUBES. (Determinación de la influencia de tres variables de proceso en la deshidratación osmótica de cubos de manzana *Granny Smith*) 554

María Fernanda Quintero-Soto[a*+], José Ángel López-Valenzuela[a,b], José Antonio Garzón-Tiznado[a,b], Ana Glenda Saracho-Peña[b], Nancy Yareli Salazar- Salas[a,b], Karen Virginia Pineda-Hidalgo[a,b], Héctor Samuel López-Moreno[b], Jeanett Chávez-Ontiveros[a,b]. MOLECULAR GENETIC DIVERSITY AND ITS ASSOCIATION WITH PROTEIN AND STARCH CONTENT IN CHICKPEA (*Cicer arietinum* L.) GENOTYPES. [Diversidad genética molecular y su asociación con el contenido de proteína y almidón en genotipos de garbanzo (*Cicer arietinum* L.)] 569

Ana Maria Bañuelos Piña[a]*, Dra. Edith Oliva Cuevas Rodríguez[a,b+], Dr. Cuauhtémoc Reyes Moreno[a,b], Yudith Escobar Zuñiga[c], Dra Liliana León López[b], Dra. Saraid Mora Rochín[a,b], Dr. Luis Martin Sanchez Magaña[b]. OPTIMIZATION OF THE GERMINATION PROCESS OF MORINGA (*Moringa oleifera)* SEEDS TO IMPROVE THEIR NUTRITIONAL AND NUTRACEUTICAL VALUE. (Optimización del proceso de germinación de Moringa (*Moringa oleifera*) para obtener una harina con valor nutricional y nutracéutico alto) 570

Brenda Karely Bon Padilla [a,]*, Roberto Gutiérrez Dorado[a, b, +], Jorge Milán Carrillo[a, b], J. Xiomara K. Perales Sánchez[b], Edith O. Cuevas Rodríguez[a, b], Angel Valdez Ortiz[a, b], Cuauhtémoc Reyes Moreno[a, b]. INCREASE OF ANTIOXIDANT ACTIVITY AND TOTAL PHENOLIC COMPOUNDS OF CHICKPEA BY OPTIMIZING THE SOLID STATE FERMENTATION PROCESS. (Incremento de actividad antioxidante y compuestos fenólicos totales de garbanzo mediante la optimización del proceso de fermentación en estado sólido) 571

Marisol Isabel Jiménez Canales[a*]; Gabriela Carvajal del Aguila[a*], Marcela de la Mora Amutio[a], Julia del Carmen Martinez-Rodriguez[a+], Tetsuya Ogura[a]. SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF

EXOPOLYSACCHARIDES BY LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM AGAVE (*AGAVE TEQUILANA* WEBER VAR. *AZUL*). (Síntesis y caracterización de exapolisacáridos de bacterias acido lácticas aisladas de agave (*Agave tequilana* Weber var*. azul*)..... 582

María Dolores García-Parra[a*], Amairani Ozuna-Valente[a], Gabriela Villalpando Castellanos[a]. EFFECT OF THE PRESENCE OF THREE NATIVE IMPAIRED LAB, IN THE PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF VACUUM PACKED FRESH BREAST CHICKEN. (Efecto de la presencia de tres BAL nativas deterioradoras, en las propiedades fisicoquímicas de pechuga de pollo fresco envasado al vacío)..... 583

Rogelio Prado-Ramírez[a], Mariana de los Angeles Mendoza Rivera[a*], Santos Noé Luiz[a]. SEPARATION OF COMPOUNDS WITH ANTIOXIDANT CAPACITY FROM RASPBERRY (*Rubus idaeus*) CULTIVATED IN JALISCO. (Separación de compuestos con capacidad antioxidante a partir de frambuesa cultivada en el estado de Jalisco) 590

María Dolores García-Parra[a+], Kenia Castañeda-Morales[a*], Norma Morales-Hernández[a]. EFFECT AND APPLICATION OF A PROBIOTIC HEAT-RESISTANT ENCAPSULATED BACTERIA (*B. coagulans*), OVER THE PHYSICOCHEMICAL AND THE TEXTURE PROPERTIES IN A FOOD MODEL (BREAD BUN). [(Efecto de la aplicación de una bacteria probiótica termorresistente encapsulada (*B. coagulans*), sobre las propiedades fisicoquímica y de textura en un alimento modelo (pan tipo bollo)]..... 596

Jorge Rodolfo León Murillo[a,*], Roberto Gutiérrez Dorado[a,b], Luis M. Sánchez Magaña[b], Jorge Milán Carrillo[a,b], Saraid M. Rochín[a,b], Cuauhtémoc Reyes Moreno[a,b,+]. OPTIMIZING OF SOLID STATE BIOCONVERSION CONDITIONS OF COMMON BEAN (*Phaseolus vulgaris* L) VAR AZUFRADO HIGUERA TO PRODUCE A FUNCTIONAL FLOUR WITH ENHANCED ANTIOXIDANT POTENTIAL. (Optimización de las Condiciones de Bioconversión en Estado Solido de Frijol Común (*Phaseolus vulgaris* L) var. Azufrado Higuera para Producir una Harina Funcional con Potencial Antioxidante Incrementado) 604

Maria Azucena Figueroa Pérez[a]*, Marithza Guadalupe Ramírez Gerardo[a], Zaira Yunuén García Carvajal[b], Estefania Lazcano Díaz[b], Yanet Karina Gutiérrez Mercado[b], Eduardo Padilla Camberos[b]. DEVELOPMENT OF A FILM CONTAINING ESSENTIAL OIL OF OREGANO (*Lippia graveolens*) AS AN ANTIMICROBIAL AGENT AND ITS APPLICATION IN STRAWBERRY. (Desarrollo de una película que contiene aceite esencial de orégano (*Lippia graveolens*) como agente antimicrobiano y su aplicación en fresa) 614

Jose Daniel Padilla de la Rosa[a]*, Jorge Alberto García Fajardo[a], Leticia Casas[b], Georgina Sandoval[b+]. ENZYMATIC ACYLATION OF HESPERIDIN. (Acilación enzimática de hesperidina) 621

Claudia D. Norzagaray-Valenzuela[a,b*], Marco A. Valdez-Flores[b], Roberto Gutiérrez-Dorado[a,b], Cuauhtémoc Reyes-Moreno[a,b], Angel Valdez-Ortiz [a,b+], Lourdes J. Germán-Báez[b]. CHARACTERIZATION OF THE RESIDUAL BIOMASS OF THE GREEN MICROALGAE: *Dunaliella tertiolecta*, *Tetraselmis suecica* AND *Nannochloropsis* sp. (Caracterización de la biomasa residual de las microalgas verdes: *Dunaliella tertiolecta*, *Tetraselmis suecica* y *Nannochloropsis* sp.) 622

Gloria Cristina Rodríguez Cárdenas[a*], Joel Edmundo López Meza[b], Pedro Damián Loeza Lara[c+]. *IN VITRO* ANTIBACTERIAL EFFECT FROM ETHANOLIC EXTRACT OF PROPOLIS ON *Staphylococcus aureus* ASSOCIATE TO BOVINE MASTITIS. (Efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de propóleo sobre *Staphylococcus aureus* asociado a mastitis bovina)..... 629

Edgar Espinosa Hernández[a]*, Flor de Fátima Rosas Cárdenas[a], Silvia Luna Suárez[a+]. EFFECT OF SIMULATED GASTROINTESTINAL DIGESTION OF PROTEIN FRACTIONS OF CHIA (*Salvia hispanica* L.) SEEDS, ON THE ANTIOXIDANT ACTIVITY. (Efecto de la simulación de la digestión gastrointestinal de fracciones proteicas de chia (*Salvia hispanica* L.), en la actividad antioxidante)..... 635

Jocksan Ismael Morales Camacho[a], Flor de Fátima Rosas Cárdenas[a], Silvia Luna Suárez[a*+]. OBTAINING PROTEIN FRACTIONS WITH ANTIOXIDANT ACTIVITY FROM AMARANTH. (Obtención de fracciones proteicas con actividad antioxidante de amaranto) 641

Lourdes J. Germán-Báez[b*], Claudia D. Norzagaray-Valenzuela[b], David U. Santos-Ballardo[b], Roberto Gutiérrez-Dorado[a,b], Cuauhtémoc Reyes-Moreno[a,b], Angel Valdez-Ortiz[a,b+]. BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION AND ANTIOXIDANT CAPACITY FROM RESIDUAL BIOMASS OF THE MICROALGA *Dunaliella tertiolecta*. (Caracterización bioquímica y capacidad antioxidante de la biomasa residual de la microalga *Dunaliella tertiolecta*)..... 648

Lourdes J. Germán-Báez[b*], Claudia D. Norzagaray-Valenzuela[b], David U. Santos-Ballardo[b], Roberto Gutiérrez-Dorado[a,b], Cuauhtémoc Reyes-Moreno[a,b], Angel Valdez-Ortiza,[b+]. ANTIOXIDANT CAPACITY AND CONTENT OF PHENOLIC COMPOUNDS OF THE BIOMASS PRODUCED BY THE MICROALGA *Phaeodactylum tricornutum*. (Capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos de la biomasa producida por la microalga *Phaeodactylum tricornutum*) 656

Jaime Tonatiuh Nava- Del Real[a]*, Luz Adriana Vizcaíno Rodríguez[a], Alejandro Brena-Becerril[a+]. IMPORTANCE OF CHIA SEED (*Salvia hispanica*) AS TRIGLYCERIDE LOWERING NUTRACEUTICAL. (Importancia de la semilla de la chia (*Salvia hispanica)* como nutracéutico la disminución de triglicéridos) 663

Deyla Azucena Barranco Montesinos[a*+], Annaliese K. Franz[b], Andrew Burch[b], Juan Rodríguez Ramírez[a]. MICROPLATE ASSAY FOR QUANTITATION OF NEUTRAL LIPIDS IN EXTRACTS FROM *Nannochloropsis salina*. (Ensayo de microplaca con rojo de Nilo para la cuantificación de lípidos neutros en extractos de *Nannochloropsis salina*)..... 664

Emmanuel Ulíbarri Navarro[a*], Marcela De la Mora Amutio[a], Julia Del Carmen Martínez-Rodríguez[a+], Tetsuya Oguraa. COMPARATIVE ANALYSIS OF AGAVE INULIN AND OTHER PREBIOTICS ON GROWTH OF DIFFERENT Bifidobacterium AND Lactobacillus STRAINS. (Análisis comparativo del efecto de la inulina de agave y otros prebióticos sobre el crecimiento de diferentes cepas de *Bifidobacterium y lactobacillus*) 665

Rafael Ortiz-Alvarado[a+], Itzirherhi Carol Molina-Cuadros[b*], Carmen Víctor Meza[a]. GENE EXPRESSION tph-1 IN CELL ENTERIC FROM MOUSE, BY ADMINISTERING DIETARY FIBER FROM BLACKBERRY, *Rubus fruticosus*. (Expresión relativa del gen tph-1 en células entéricas de ratón, por la administración de fibra dietética de *Rubus fruticosus*)..... 666

Rafael Ortiz Alvarado[a+], Alvaro[a] Rodríguez-Barron, José Silva-Avalos[b*]. MAP FOR OBTAINING NUTRACEUTICALS FROM SPECIES OF THE GENUS *Rubus spp* . AND RELATIONSHIP IN THE PREVENTION

OF CHRONIC DISEASES. (Mapa de ruta para la obtención de nutraceuticos de las especies del genero *Rubus spp*. y su relación en la prevención de enfermedades crónicas) 667

Mayvi Nallely Chico-Castillo*[a], Blanca Flor Figueroa[a], Alejandra Sánchez-Quiroz[a]; Francisco Javier Perez Martínez[b], Rogelio Ramírez-Prado[b]; Ángela Suárez-Jacobo[a+]. COMPARATIVE STUDY BETWEEN ULTRA-HIGH PRESSURE HOMOGENIZATION AND PASTEURIZATION TREATMENTS OF ALMOND MILK AND AGAVE FRUCTANS FUNCTIONAL BEVERAGE. (Estudio comparativo entre la homogeneización a ultra-alta presión y la pasteurización de una bebida funcional a base de la leche de almendra y fructanos de agave)..... 668

Ángela Suárez-Jacobo[a+], Alejandra Sánchez-Quiroz[a*], Jorge Alberto García-Fajardo[a]. INNOVATIVE PROCESS TO OBTAIN A RED-PURPLE PRICKLY PEAR-BASED FUNCTIONAL BEVERAGE STABILIZED BY ULTRA-HIGH PRESSURE HOMOGENIZATION. (Desarrollo de un proceso innovador para la obtención de una bebida funcional a base de tuna estabilizada por homogeneización a alta presión)..... 669

Leticia Casas-Godo[a*], Laura E. Cerón-Modragón [a], Javier Arrizon[a], Daniel Arrieta[b], Francisco J.P lou[c], Georgina Sandoval[a+*]. FEASABILITY OF THE PRODUCTION OF NUTRACEUTICS BY ENZYMATIC ACYLATION. (Viabilidad de la producción de nutraceuticos por acilación enzimática) 670

William Hernando Suarez Quintana [a*+], Fanny Consuelo Herrera Arias[b]. ISOLATION OF *Aeromonas* spp. IN FRESH FISH SAMPLES MARKETED IN PAMPLONA (NORTE DE SANTANDER). (Aislamiento de *Aeromonas* spp., en muestras de pescado fresco comercializado en Pamplona, Norte de Santander) 671

William Hernando Suarez Quintana [a*+], Fanny Consuelo Herrera Arias[b]. DETERMINATION OF VIRULENCE FACTORS IN STRAINS OF *Aeromonas* spp, ISOLATED FROM FISH. (Determinación de factores de virulencia en cepas de *Aeromonas* spp, aisladas a partir de pescado) 681

Fanny Consuelo Herrera Arias[a+], William Hernando Suarez Quintana[b*]. ISOLATION AND IDENTIFICATION OF *Listeria* spp. FROM FRESH FISH SAMPLES, MARKETED IN PAMPLONA (North of Santander). [Aislamiento e identificación de *Listeria* spp. a partir de muestras de pescado fresco expendido en pamplona (norte de Santander)] 689

BIOTECNOLOGÍA CLÍNICA

Sabina A. Ferrari-Palacios[a*+], Abel Gutiérrez-Ortega[a], Sara E. Herrera-Rodríguez [a], Angel H. Alvarez-Herrera[a]. GENERATION OF A HYBRID GENE THAT ENCODES A RECOMBINANT FUSION PROTEIN OF VIRULENCE ANTIGENS ESAT-6 AND CFP-10 FROM *Mycobacterium bovis*. (Generación de un gen híbrido que codifica para una proteína de fusión recombinante de los antígenos de virulencia ESAT-6 y CFP-10 de *Mycobacterium bovis*) 690

Carlos Enrique Hirales Casillas[a]*, Rodolfo Hernández Gutiérrez[a], Ernesto Prado Montes de Oca[a], Moisés Martínez Velázquez[a]. IDENTIFICATION OF AUTOANTIBODIES AGAINST CYTOKERATIN-19 AND CYFRA-21.1 IN PATIENT'S SERUM WITH LUNG CANCER AS POTENTIAL DIAGNOSTIC MARKERS FOR THE DISEASE. (Identificación de autoanticuerpos contra Citoqueratina-19 y Cyfra-21.1 en suero de pacientes con cáncer de pulmón como marcadores potenciales de la enfermedad)..... 691

Estefhan Miranda-Miranda[a], Raquel Cossío-Bayúgar[a], Juan Diego Pérez-De la Rosa[b], Bernardo Sachman-

Ruiz[a*+]. DETOXIFICATION ENZYMES INVOLVED IN TRICLABENDAZOLE RESISTANCE IN *Fasciola hepatica*. (Enzimas detoxificantes involucradas en la resistencia de *Fasciola hepatica* al triclabendazol)..... 699

María Del Rosario Díaz Rodríguez[a*], Luz Adriana Vizcaíno-Rodríguez[a], Vania S. Farías Cervantes[a], Alejandro Brena-Becerril[a+]. HOMOLOGIES PHYLOGENETIC 3 BETA-HYDROXYSTEROID DEHYDROGENASE, IN FINDING OTHER SOURCES TO CLINICAL TREATMENT. (Homologías filogenéticas de la 3 beta-hidroxiesteroide dehydrogenasa, en la búsqueda de otras fuentes para tratamiento clínico) 705

Daniela Rivera Martinez[a], Jorge Isaac Castro Aldrete[b], Carlos Ordoñez Sánchez[b], Abel Gutierrez Ortega[c], José Carlos Vega Sánchez[c], Deyanira Berenice López Dimas[c], Jorge Bravo Madrigal[c]. COMPARISION OF SPECIFICITY AND SENSITIVITY OF SECUNDARY ANTIBODIES DEVELOPED IN EGG AND GOAT FOR INMUNOLOGICAL APPLICATIONS. (Comparación de la especificidad y sensibilidad de anticuerpos secundarios desarrollados en huevo y cabra para aplicaciones inmunológicas)..... 706

David Luna Orea[a]*, Minarda De la O Arciniega[b], Claudia Velázquez González[b], Mariano Martínez Vázquez[a]. HYPOGLYCEMIC EFFECT OF AN ETHYL ACETATE EXTRACT FROM THE ROOT OF *Ibervillea sonorae* (S.Watson) Greene. (Efecto hipoglucémico de un extracto de acetato de etilo de la raíz de *Ibervillea sonorae* (S.Watson) Greene)..... 707

Irene Mendoza-Lujambio[a*+], Eleazar Lara-Padilla[a], Guadalupe Cleva Villanueva-López[a], Gerardo Abraham Encinas-Almirudis[a], Iván Bazán-De Santillana[a], Rosaura Palma Orozco[b]. *KCNH2* POTENTIAL NEW BIOMARKER OF PROSTATE CANCER. (*KCNH2* potential nuevo biomarcador de cáncer de próstata) 715

BIOTECNOLOGÍA FARMACÉUTICA

Alma Rosa Oaxaca-Camacho*[a], Alexis Jazmín Preciado Pelayo[a], Vivechana Agarwal[b], Luis Felipe Jave-Suarez[c], Adriana Aguilar-Lemarroy[c], Arturo González Robles[d], Francisco Muñoz-Valle[c], Pedro Mondragon[a], Rodolfo Hernández Gutiérrez[a]. DESING AND DEVELOPMENT OF AN IMMUNE-NANOCONJUGATE WITH POTENTIAL UTILITY FOR TREATMENT OF HER2 POSITIVE BREAST CANCER. (Diseño y desarrollo de un Inmune-Nanoconjugado con uso potencial en el tratamiento de cáncer de mama HER2 positivo) 721

Carlos Alberto Manuel-Cabrera [a]*, Eduardo Padilla-Camberos [a], Rodolfo Hernández-Gutiérrez [a], Carla Sánchez-Hernández [b], Sara Elisa Herrera-Rodríguez [a], Abel Gutiérrez-Ortega [a+]. HEXAHISTIDINE-TAGGED TOBACCO ETCH VIRUS VIRUS-LIKE PARTICLES ELICIT ANTIBODY RESPONSE AGAINST A CHIMERIC PROTEIN. (Las partículas pseudovirales del virus del jaspeado del tabaco etiquetadas con seis histidinas inducen la respuesta de anticuerpos contra una proteína quimérica) 728

José Alberto Uribe Flores [a]*, Daniela Padilla Novelo [a], Jesús Hernández Barrera [a], Enrique Jaime Herrera López [a], Atalo Candido Martínez Lara [b], Fernando Diosdado Vargas [b], José Francisco Rivera Benítez [b], Luis Gómez Núñez [b], Abel Gutiérrez Ortega [a+]. EVALUATION OF THE ANTIGENIC POTENTIAL OF A CHIMERIC PROTEIN CONTAINING EPITOPES OF PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME VIRUS GP3, GP4, GP5 AND M PROTEINS. (Evaluación del potencial antigénico de una proteína quimérica que contiene epítopes de los antígenos GP3, GP4, GP5 Y M del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino)..... 735

Lérida Liss Flores-Villavicencio[a*], Pablo Cardoso-Ávila[b], Juan Luis Pichardo- Molina[b], José Pedro Castruita-Domínguez[c], Gloria Barbosa-Sabanero[d], Myrna Sabanero-López[a+]. NANOTOXICOLOGY IN HeLa cells: GOLD NANOPARTICLES COATED WITH ORGANIC MOLECULES. (Nanotoxicología en células HeLa: Nanoparticulas de oro recubiertas con moléculas orgánicas) 742

Alexis Joavany Rodríguez Solís[a]*, Yareli Morales Guzmán[b], Elba Cristina Villegas Villarreal[a], Gerardo Alfonso Corzo Burguete[c+]. EVALUATION OF THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF SYNTHETIC PEPTIDES OVER MULTIDRUG RESISTANT BACTERIA ISOLATED FROM DIABETIC FOOT ULCERS. (Evaluación de la actividad antimicrobiana de péptidos sintéticos sobre bacterias multirresistentes aisladas de úlceras de pie diabético) 748

Katia Esmeralda Jiménez Sánchez[1a], Gerardo Corzo Burguete[b], Alexis Joavany Rodríguez Solís[2a], Elba Cristina Villegas Villarreal[2a*+]. IMPROVING COMMERCIAL ANTIBIOTICS FOR THE TREATMENT OF DIABETIC FOOT ULCER USING ANTIMICROBIAL PEPTIDES. (Potenciación de antibióticos comerciales para el tratamiento de úlcera del pie diabético usando péptidos antimicrobianos) 756

Elsa Leticia Ramírez Cerda[*a], David Ulises Miranda Hernández [b], Ciro Estrada Chávez[b+]. BCG VACCINATION SCHEME-CONTAINING PRIME AND PERIODIC SUBUNIT BOOST SELECTS AND ACTIVATES TEM AND Th17CD4+ SUBSETS IN NATURALLY PREINFECTED DAIRY CATTLE. (La vacunación con BCG al nacimiento y refuerzos subunitarios anuales seleccionan y activan subpoblaciones Tem y Th17CD4+ en ganado lechero) 757

Isabel C. Velásquez de la Cruz*[a], Josefina Herrera Santoyo[b], Enrique Roberto Llanos Romero[b], Octavio González Caballero[a], Victor Manuel Chávez Avila[a+]. PHYTOCHEMICAL ANALYSIS OF NUTRITIVE MEDIUM FROM SOMATIC EMBRYOS OF *Ceratozamia hildae*, AN ENDANGERED SPECIES. (Estudio fitoquímico del medio nutritivo de embriones somáticos de *Ceratozamia hildae*, especie en peligro de extinción) 765

Tonatiuh Abimael Baltazar Díaz[a]*, Alejandro Brena Becerril[a+], Luz Adriana Vizcaíno Rodríguez[a]. HUMAN ALPHA 1-ANTITRYPSIN HOMOLOGY IN HIGHER MAMMALS. (Homología de alfa 1-antitripsina en mamíferos superiores) 766

CONSERVACIÓN DE ECOSISTEMAS

Andrea Buendía-Aguirre[a*], America Martínez-Rodriguez[a], Miguel J. Beltran-Garcia[b+], Gloria Macedo-Raygoza[c], Claudia Cisneros-Reyes[d], Paolo Di Mascio[e]. MALDI-TOF MASS SPECTROMETRY IDENTIFICATION OF ASSOCIATED BACTERIA OF *Agave marmorata* SEEDS: AN OPPORTUNITY TO KNOW THE ECOLOGY OF MICROBIAL ENDOPHYTES IN THE *Agave* GENUS. (Identificación por espectrometría de masas MALDI-TOF de bacterias asociadas a semillas de *Agave marmorata*: una oportunidad de conocer la ecología de endófitos del género *Agave*)..... 775

Mayra Isabel Morales Rodriguez[a]; María Elena Pérez-López[a*], María Adriana Martínez Prado[b], María Maura Margarita Teutli-León[c]. OPTIMIZATION PLAN FOR THE USE OF DETERGENT IN A LACTEAL INDUSTRY. (Plan de optimización del uso de detergentes en el área de lavado de mantas de una industria láctea) 776

Alejo Javier Lungo Rodríguez*[a], Luz Patricia Ávila-Caballero[b+], Jorge Alberto Melgoza Ortega[a], Orfanel Parral Rivera[a]. POTENTIAL MEDICINAL PLANTS BACKYARD OF THE TOWN OF EL PERICÓN MUNICIPALITY OF GRO TECOANAPA. (Potencial de las plantas medicinal de traspatio de la localidad de El Pericón municipio de Tecoanapa Gro.) 777

Germán Melo Quintana[a*+], Paulo Germán García Murillo[b], Juan Manuel Martínez Troya[c], Jesika Natali Valencia González[d]. ECOLOGICAL RETROSPECTIVE HIGH WATERSHED THE QUEBRADA GRANDE, MUNICIPIO DE SAN ANTONIO DE TEQUENDAMA CUNDINAMARCA – COLOMBIA. (Retrospectiva ecológica de la microcuenca alta de la Quebrada Grande, Municipio de San Antonio de Tequendama Cundinamarca-Colombia) 778

José Germán Flores Garnica[a*+]. FOREST LAND COVER CLASSIFICATION BASED ON OBJECTS DEFINITION. (Clasificación de coberturas de suelo forestal basadas en la definición de objetos) 794

José Germán Flores Garnica[a*+]. ESTIMATION OF FOREST FUELS SPATIAL DISTRIBUTION BASED ON CLASSIFICATION AND REGRESSION TREES (CART). (Estimación de la distribución espacial de combustibles forestales basada en arboles de clasificación y regresión) 795

José Germán Flores Garnica[a*+]. MONITORING OF FOREST RESOURCES BASED ON GEOESTATISTIC ESTRATEGIES. (Monitoreo de recursos forestales a través de estrategias de geoestadística) 796

Ramiro Luján Godínez[a*+],Adolfo Preciado Quiroz[a], Luz Adriana Vizcaíno Rodríguez[a], Alejandro Brena Becerril[a], Juan Luis Caro Becerra[a]. ENVIRONMENTAL GOVERNANCE ACTIONS TO RECOVER THE CAJITITLAN WETLAND. (Acciones de gobernanza ambiental para rescate del humedal de Cajititlán).... 797

Esteban Gottfried Burguett[a], Desiree Guzmán Gómez*[a], Laura L. Ramírez Godínez[a], Violeta B. Castañeda Robles[a], Miguel Ángel Velarde Flores[a], J. Francisco Echaide Aquino[a], Jessica G. Lamas Hernández[a], José Luis Zavala Aguirre[b+]. AUTOTROPHIC INDEX EVALUATION IN DIFFERENT NICHES AT LAS ANIMAS CREEK IN NATURAL PARK LA PRIMAVERA, JALISCO, MEXICO. (Evaluación del índice autotrófico en diferentes nichos en el arroyo Las Ánimas en el APFF Bosque La Primavera, Jalisco, México) 806

Diana Marcela Arias-Moreno[a*], Maria de la Luz Guerrero-González[a], Juan Francisco Jiménez-Bremont[b], Pablo Delgado-Sánchez[a+]. VEGETAL GROWTH PROMOTION IN NOPAL SEEDLINGS THROUGH FUNGI APPLICATION. (Promoción de crecimiento vegetal en plántulas de nopal mediante la aplicación de hongos) 807

Lorenzo W. P. Rodríguez Pérez*[a], María de los Ángeles Aquiahuatl Ramos[b], Nancy Edith Bautista Martínez[a]. ISOLATION AND PROPAGATION OF EDIBLE ECTOMYCORRHIZAL MUSHROOM MYCELIUM IN "EL FARO" FOREST SCHOOL. (Aislamiento y propagación de micelio de hongos ectomicorricicos comestibles en "El Faro" bosque escuela) 808

Raúl Arcos Ramos[a*+], Monserrat L. Portillo Ojeda[a], Jafet Reyes Cardoso[a]. TROPHIC BEHAVIOR OF COASTAL LAGOON COYUCA DE BENITEZ, EDO. GRO. MEXICO. (Comportamiento Trófico de la Laguna Costera de Coyuca de Benítez Edo. de Gro. México) 809

Violeta B. Castañeda Robles*[a], Ana Karen Reyes Salazar[a*], Ubaldo Zaragoza Araujo[a], J. Germán Flores Garnica[b], José Luis Zavala Aguirre[c+]. ZONING BY DENSITY AND BASAL AREA IN A NANOBASIN IN THE "LAS ANIMAS" RIVER WITHIN THE PROTECTION AREA OF FLORA AND FAUNA "LA PRIMAVERA", JALISCO (MEXICO) BY USING gvSIG. (Zonificación por densidad y área basal en nanocuenca del Arroyo Las Ánimas dentro del APFF La Primavera, Jalisco (México) mediante el uso de gvSIG) 819

Sergio Olvera[a*], Moisés Cortés-Cruz[a+], Aremi Contreras-Toledo[a], Simitrio Ortiz Curiel[b], Carlos Avendaño-Arrazate[b], Aída Olivera de los Santos[b], Jorge Canul Ku[c] and Manuel Grajales Solis[b]. GENETIC DIVERSITY ANALYSIS IN NATIVE HELICONIAS FROM THE SOUTHEAST REGION OF MEXICO. (Análisis de diversidad genética en heliconias nativas del sureste de México) 820

Alejandro Brena Becerril[a, b*], Luz Adriana Vizcaíno Rodríguez[a,b], Juan Luis Caro Becerra[a,b], Ramiro Lujan Godinez[a,b], Luis Manuel Martínez, José Guadalupe Michel Parra[b], Irma Guadalupe López Muraira[b], Felipe de Jesús Iñiguez[a,b]. THE CURRENT ECOLOGICAL FRAGILITY OF THE WATERSHED OF LAKE CAJITITLAN AND ITS RELATION TO LAKE CHAPALA. (La fragilidad ecológica actual de la microcuenca del Lago de Cajititlán y su relación con Lago de Chapala) 821

María Guadalupe Sánchez-Martínez [a], María Elena Pérez-López[a*+], Araceli Loredo Treviño[a], María Guadalupe Vicencio de la Rosa[a]. RELATION BETWEEN EUTROPHICATION LEVELS AND MICROALGAE PRESENCE IN EL TUNAL AND DURANGO RIVERS. (Relación entre niveles de eutrofización y presencia de microalgas en los ríos el Tunal y Durango) 822

CONTROL BIOLÓGICO

Edgardo Cortez-Mondaca[a], José Isabel López-Arroyo[b], Mara Patricia Partida-Valenzuela[c], Jesús Pérez-Márquez[c+*]. CAPACITY OF DEPREDATION OF CHRYSOPIDAE SPECIES ASSOCIATED TO *Diaphorina citri* KUWAYAMA IN CITRUS IN SINALOA, MEXICO. (Capacidad de depredación de especies de Chrysopidae asociadas a *Diaphorina citri* Kuwayama en cítricos en Sinaloa, México) 823

Venus Jiménez Castañeda[a*+], Miguel Santos Flores Valderrama[a], Ignacio Garza Lombó[a], José Carlos López García[a], Augusto Martínez Villalobos[a], Michelle Villanueva Martínez[a], José Luis Sanchez Rios[a]. EVALUATION OF THE EFFECTS OF BIOFERTILIZER ENERBAC IN THE GROWTH AND DEVELOPMENT OF *Lactuca sativa* L. IN CIBAC UAM-X. (Evaluación de los efectos del biofertilizante ENERBAC en el desarrollo de *Lactuca sativa* L. en el CIBAC UAM-X)..... 830

Estefania Lazcano-Díaz[a*], Eduardo Padilla- Camberos[a+], Moisés Martínez-Velázquez[a], Gustavo Castillo-Herrera[a]. ACARICIDAL EFFECT OF ESSENTIAL OIL FROM *Cuminum cyminum* AGAINST CATTLE TICK *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. [Evaluación del efecto acaricida *in vitro* del aceite esencial de comino (*Cuminum cyminum*) contra la garrapata del bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*]..... 839

Juan Daniel Arellano-Vazquez[a*], Ma. del Carmen Rocha-Granados[a+], Salvador Ochoa-Ascencio[a], Gustavo Santoyo-Pizano[b]. ANTAGONISM OF *Pseudomonas fluorescens* STRAINS AGAINST PATHOGENIC FUNGUS FROM BLUEBERRY. (Antagonismo de cepas de *Pseudomonas fluorescens* contra hongos fitopatógenos de arándano)..... 845

Martha Salinas-Sandoval[a], Luis Fernando Ceja-Torres[a*+], Sigifredo López-Díaz[a], Gildardo Rivera-Sánchez[b]. ANTIFUNGAL EFFECT IN VITRO OF EXTRACTS FROM POMEGRANATE AND JARA METHANOL. (Efecto antifúngico *in vitro* de extractos metanólicos de granada y jara)..... 846

Bernardo Sachman-Ruiz[a*+], Estefhan Miranda-Miranda, Enrique Reynaud[b] and Raquel Cossio-Bayugar[a]. BACTERIAL ISOLATES OBTAINED DURING INFECTION OF THE TICK *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* WITH POTENTIAL USE AS BIO-ACARICIDES. (Aislados bacterianos obtenidos durante la infección de la garrapata del ganado *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* con uso potencial como bio-acaricida) 852

Christian Jesús Flores Bahena[1ab], Ramón Suárez Rodríguez[b], Verónica Obregón Barbosa[b], Laura Patricia Lina García[b], Elba Cristina Villegas Villarreal[ab*+]. ISOLATION AND IDENTIFICATION OF ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES OF *Diatraea magnifactella* FROM SOIL OF SUGARCANE CROPS OF MORELOS STATE. (Aislamiento e identificación de nematodos entomopatógenas a *Diatraea magnifactella* en cultivos de suelos de caña de azúcar del estado de morelos) 853

Rafael de Jesus Mendoza Gómez [a]*, Evangelina Quiñones-Aguilar [a], Joaquín Qui-Zapata [a], Gabriel Rincón Enríquez[a]. USE OF BACTERIOPHAGES AS BIOLOGICAL CONTROL AGENTS OF BEAN HALO BLIGHT CAUSED BY *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola*. (Uso de bacteriófagos como agentes de control biológico del tizón de halo del frijol causado por *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*)..... 854

Jaime Alberto Madrigal Pulido*[a+], Olga Avalos García[a], Melesio Gutiérrez Lomelí[a], Carmen Lizette Del Toro Sánchez[a]. USE OF *Trichoderma sp.*, ISOLATES FOR BIOLOGICAL CONTROL OF *Alternaria alternata* IN AVOCADO FRUIT (*Persea americana* Mill). [Uso de cepas de *Trichoderma sp.*, como control biológico de *Alternaria alternata* en fruto de aguacate (*Persea americana* Mill)]..... 855

Enrique Tinajero-Cortés[a]*, Julia del Carmen Martínez-Rodríguez[b], Marcela De la Mora-Amutio[b], Tetsuya Ogura[b]. A POTATO-ISOLATED ENDOPHYTIC BIOFORMULATION AS BIOCONTROL AGENT AGAINST *Rhizoctonia solani, Fusarium oxysporum* AND *Phytophthora infestans*. (Elaboración de una bioformulación de bacterias endófitas de papa (*Solanum tuberosum*) como control biológico contra *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* y *Phytophthora infestans*)..... 861

Olga Avalos García*[a], Jaime Alberto Madrigal Pulido[a+], Carmen Lizette Del Toro Sánchez[a], Melesio Gutiérrez Lomelí[a]. BIOLOGICAL CONTROL OF *Cladosporium sp.,* IN PITAHAYA (*Hylocereus* sp.) FRUITS THROUGH OF ISOLATED OF *Trichoderma* sp. (Control biológico de *Cladosporium sp.* en frutos de Pitahaya (*Hylocereus* sp.) mediante el uso de aislados de *Trichoderma sp*.) 862

Jesús Rocha Ramírez [a]*, Guadalupe Oyoque Salcedo [b+], María Valentina Angoa Pérez, Hortencia G. Mena Violante[b], Ernesto Oregel Zamudio[b], Aida Isabel Leal Robles[a]. CONTROL *in vitro* OF *Rhizoctonia sp.* WITH *Bacillus sp*. VOLATILE. (Control *in vitro* de *Rhizoctonia sp.* con volátiles de *Bacillus sp*.)..... 868

Adriana Pérez Díaz[a], Karla Nallely Rivera Hernández[a], Maria del Sugeyrol Villa Ramirez[a] y Miguel Angel Plascencia Espinosa[a*+]. ISOLATION OF YEASTS WITH ANTAGONISTIC ACTIVITY AGAINST PHATHOGENIC FUNGI OF CITRUS. (Aislamiento de levaduras antagonistas de hongos patógenos de cítricos)..... 876

María Arias Mendoza[a+], Alejandra Vázquez Camacho[b]*, Marcela De la Mora Amutio[b], Julia Martínez del Carmen[b], Tetsuya Ogura[b]. STRATEGIC DEFENSE OF PLANTS BY SECRETION OF PROMOTER-INHIBITOR

COMPLEX OVER ENDOPHYTES AND PATHOGENS EVALUATED IN AGAVE (*Agave tequilana* Weber var. Azul) AND POTATO (*Solanum tuberosum*). [Defensa estratégica de plantas mediante la secreción del complejo promotor-inhibidor de endófitos y patógenos evaluado en agave (*Agave tequilana* Weber var. *Azul*) y papa (*Solanum tuberosum*)] 877

ECOTOXICOLOGÍA

Liliana Angelica Cruz-De-Julian[a], José Roberto Zúñiga- Silva[b*+], Refugio Rodríguez-Vázquez[b], Enriqueta Amora-Lazcano[a]. TRICALCIUM PHOSPHATE SOLUBILIZATION ABILITY OF FUNGI MICROORGANISMS GROWN IN LIGNOCELLULOSE MATERIALS IN THE PRESENCE OF ALUMINIUM. (Habilidad de solubilización de fosfato tricálcico por microorganismos crecidos en materiales lignocelulósicos en presencia de aluminio) 878

Luis Patricio Guevara Acevedo *[a], Enrique Andrio Enriquez[a], Davino Pérez Mendoza[a], Silvano Ochoa Galaz[a], Julio Cesar León Vargas, Raúl René Robles Lacayo[a], José Eduardo Ruíz Escobar[a]. BIOINSECTICIDE EFFECT OF ETHANOLIC EXTRACT OF YOUNG AND MATURE LEAVES OF CASTOR OIL PLANT (*Ricinus communis* L.) ON WHITEFLY IN TOMATO. (Efecto bioinsecticida de extracto etanólico de hojas jóvenes y maduras de higuerilla (*Ricinus communis* L.) sobre mosca blanca en tomate) 879

Raúl Simeón Michi Flores[a]*, Rodolfo Figueroa Brito[a], Kalina Bermúdez Torres[a+]. EFFECT OF ALKALOIDS QUINOLIZIDINE SEEDS OF *Lupinus campestris* ON *Aedes aegypti*. (Efectos de los alcaloides quinolizidínicos de semillas de *Lupinus campestris* sobre *Aedes aegypti*) 880

Esteban Gottfried Burguett[a], Desiree Guzmán Gómez[a], Laura L. Ramírez Godínez[a], Violeta B. Castañeda Robles[a], K. Paola Martínez Viramontes[a], José Luis Zavala Aguirre[b+]. EVALUATION OF DIFFERENT SOURCES OF ORGANIC MATTER ON *Eisenia fetida* (Annelida: Lumbricidade) GROWTH. [Evaluación de diferentes fuentes de materia orgánica sobre el cercimiento DE *Eisenia fetida* (Annelida: Lumbricidade)]..... 886

Nubia Ivette Amaya Olivas[a]*, Juan Guillermo Ayala Soto[b], David Chávez Flores[b], Erika Salas Muñoz[b], León Raúl Hernández Ochoa[a]. STUDY OF THE PRECIPITATION OF RICIN OBTAINED FROM CASTOR SEEDS WITH POLYPHENOLS EXTRACTED FROM GRAPE. (Estudio de la precipitación de ricina obtenida de las semillas de Higuerilla con polifenoles extraidos del orujo de uva) 887

Livier Nataly Medrano Sánchez[a]*, Guadalupe Zavala Cerna[b], Olivia Torres Bugarin[b+]. GENOTOXICITY EVALUATION IN URBAN AND HAZARDOUS SOLID WASTE COLLECTORS WITH MICRONUCLEUS TEST. (Evaluación de genotóxicidad en recolectores de residuos sólidos urbanos y peligrosos con la prueba de micronúcleos)..... 888

BIOLOGÍA Y QUÍMICA DEL ESTRÉS OXIDATIVO

Alejandro Guerrero-Zavala[a*+], Fernando Ramírez-Guadiana[a], Mario Pedraza-Reyes[a]. TRANSCRIPTIONAL COUPLING (Mfd) OF BASE EXCISION REPAIR (BER) IN SPORULATING *Bacillus subtilis* CELLS. (Reparación por escisión de bases acoplada a la transcripción en células esporulantes de *Bacillus subtilis*) 895

Antonio Reyes-Martínez[a*], María del Socorro Santos-Díaz[a+], María del Carmen González-Castillo[a]. ESTABLISHMENT OF CELL SUSPENSIONS OF *Turbinicarpus laui* (CACTACEAE) AND QUANTIFICATION OF ANTIOXIDANT COMPOUNDS CONTENT. (Establecimiento de suspensiones celulares de *Turbinicarpus laui* (cactácea) y cuantificación del contenido de compuestos antioxidantes) 902

Leonardo Daniel Molina Noyola[a*], Olivia Torres Bugarín[b+], Penélope Valdez Aburto[a], Livier Nataly Medrano Sánchez[a], María Guadalupe Zavala Cerna[b]. EXPLORATORY STUDY OF THE FREQUENCY OF MICRONUCLEI AND OTHER NUCLEAR ABNORMALITIES IN BUCCAL MUCOSA OF RELATIVES AND PATIENTS WITH MARFAN SYNDROME. (Estudio exploratorio de la frecuencia de micronúcleos y otras anormalidades nucleares en mucosa bucal de familiares y pacientes con Síndrome de Marfan) 903

Julia Esperanza Torres-Mena[a], Noemí Salazar Villegas[a], Ricardo Sánchez Rodríguez[a], Jose Luis Cruz Colin[a] Belem Gabiño Lopez[a], Julio Isael Pérez-Carreón[a*+]. OVEREXPRESSION OF ALDEHYDE AND KETONE REDUCTASES IN THE LIVER CARCINOGENESIS: NEW INSIGHTS INTO LIVER TRANSCRIPTOME. (Sobreexpresión de aldehído/cetona reductasas en la carcinogénesis del hígado: Nuevos conocimientos sobre el transcriptoma hepático) 913

FERMENTACIONES

Rosa Isela López Orozco[a]*, MirnaEstarrón Espinosa[b], Julia del Carmen Martínez Rodríguez[a], Juan Villafaña Rojas[a +]. IDENTIFICATION OF ISOLATED BACTERIA FROM ALCOHOLIC FERMENTED AGAVE WORT ABLE TO MODIFY ORGANOLEPTIC FEATURES OF TEQUILA. (Identificación de bacterias aisladas de mosto alcohólico fermentado de agave capaces de modificar las propiedades organolépticas del tequila) 914

Patricia Araceli Santiago- García[a*+], Mercedes G. López Pérez[b]. SHORT CHAIN FATTY ACIDS IN THE GUT OF MICE AFTER A SUPPLEMENTATION OF DIETS WITH AGAVINS FROM *Agave angustifolia* HAW. (Ácidos grasos de cadena corta en el colon de ratones alimentados con dietas suplementadas con agavinas de *Agave angustifolia* Haw) 921

Patricia A. Santiago García[a*+], Mercedes G. López[b]. PREBIOTIC EFFECT OF AGAVINS WITH DIFFERENT DEGREES OF POLYMERIZATION FROM *Agave angustifolia* HAW. (Efecto prebiótico de las agavinas de *Agave angustifolia* Haw. con diferente grado de polimerización) 922

Gerardo Díaz-Godínez[c*], Maura Téllez-Téllez[b], Alexis Joavany Rodríguez-Solís[a], Pedro Cervantes-Muñoz[c], José de Jesús Hernández-Perez[a], Ma de Lourdes Acosta-Urdapilleta[b], Elba Cristina Villegas-Villarreal[a+]. EVALUATION OF LACCASES AND HYDROLASES OF *Pycnoporus cinnabarinus* GROWN IN AIRLIFT REACTOR. (Evaluación de lacasas e hidrolasas de *Pycnoporus cinnabarinus* cultivado en reactor airlift) 926

Rosa Mariela Hernández-Nava[a,b], Marlen Mendoza-García[a,b], Gerardo Díaz-Godínez[c], Maricarmen Jaime-Salinas[a,d], Ma de Lourdes Acosta-Urdapilleta[a], Elba C. Villegas-Villarreal[e], Maura Téllez-Téllez[a*+]. ACTIVITY AND ISOFORMS OF LACCASES OF *Lentinula boryana* GROWN IN SOLID-STATE FERMENTATION. (Actividad e isoformas de lacasas de *Lentinula boryana* crecido en fermentación en medio sólido) 931

Fatima Ortega-Enríquez[a]*, Neydeli Ayala-Mendivil[a], Georgina Sandoval[a+]. PRODUCTION OF ENZYME EXTRACTS BY FERMENTATION IN SOLID STATE. (Producción de extractos enzimáticos por fermentación en medio sólido) 937

Rosa Mariela Hernández-Nava[a,b], Marlen Mendoza-García[a,b], Gerardo Díaz-Godínez[c], Ma de Lourdes Acosta-Urdapilleta[a], Elba Cristina Villegas-Villarreal[d], Maura Téllez-Téllez[a*+]. QUANTIFICATION OF LACCASES OF *Lentinula boryana* GROWN IN THREE DIFFERENT CULTURE MEDIA. (Cuantificación de lacasas de *Lentinula boryana* crecido en tres diferentes medios de cultivo) 938

Marlen Mendoza-García[a,b], Rosa Mariela Hernández-Nava[a,b] ,Gerardo Díaz-Godínez[c], Elba Cristina Villegas-Villarreal[d], Ma de Lourdes Acosta Urdapilleta[a], Maura Téllez-Téllez[a*+]. EVALUATION OF LACCASE ACTIVITY OF *Pycnoporus sanguineus* GROWN IN SOLID AND LIQUID CULTURES. (Evaluación de la actividad de lacasas de *Pycnoporus sanguineus* crecido en cultivo sólido y líquido) 943

Oscar Abraham Flores Amaro[*a], Pamela Romo Rodríguez[a], Alma Rosa Corrales Escobosa[b], Kazimierz Wrobel[b], Katarzyna Wrobel[b], Julio Cesar Villagómez Castro[a], J. Félix Gutiérrez Corona [a+]. PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF THE SECRETABLE GOX ENZYME FROM Ed8 STRAIN OF *A. tubingensis*. (Purificación y caracterización de la enzima GOX secretable de la cepa Ed8 de *A. tubingensis*) 948

Miguel Ángel Ruiz Medina[a*+], Guillermo Arzate Martínez[a], Liliana Reynoso Cuevas[b], Arturo Salinas-Martínez[a]. INFLUENCE OF PHOTOBIOREACTOR TYPE ON THE KINETIC PARAMETERS IN A MICROALGAE CONSORTIUM CULTURE AT LABORATORY SCALE (5L). [Influencia del tipo de fotobiorreactor sobre los parámetros cinéticos de un cultivo mixto de microalgas a escala laboratorio (5 L)] 956

FITOPATOLOGÍA

Lidia Elena Ayón-Reyna[a*], Carlos Andrés Soltero-Sánchez[b], Martha Edith López-López[a], Claudia Barraza-Elenes[c], Patricia García-Cervantes[d], Ana María López-López[d], María Elena Báez-Flores[d], José Guadalupe Rendón-Maldonado[d], Misael Odín Vega-García[ac+]. APPLICATION OF A HYDROTHERMAL TREATMENT COMBINED WITH CALCIUM CHLORIDE TO INHIBIT THE ANTHRACNOSE PRESENCE IN PAPAYA. (Aplicación de un tratamiento hidrotérmico combinado con cloruro de calcio para inhibir la presencia de antracnosis en papaya) 963

Edgar Obed Mejia Yáñez[*a], Guillermo Erik Membrila Lorenzo [a], Ana Victoria Barrios Reyna[a], Gabriela Silvestre Gómez[a], Paola López Cedillo[a], Venus Jiménez Castañeda[a+]. DIAGNOSIS OF PLAGUES AND DISEASES IN NOPAL (*Opuntia ficus-indica* Berg.) IN MILPA ALTA, MEXICO CITY. (Diagnóstico de plagas y enfermedades en nopal (*Opuntia ficus-indica* Berg.) en Milpa Alta D.F.) 976

Cristóbal Fonseca-Sepúlveda[a*], Gloria Macedo-Raygoza[a], Claudia Cisneros-Reyes[a], Miguel Juan Beltrán-García[a+]. IDENTIFICATION OF ASSOCIATED BACTERIA TO SOFT ROT SYMPTOMS IN *A. tequilana* by MALDI-TOF-MS AND 16S ADNr ANALYSIS. (Identificación de bacterias asociadas a los síntomas de la pudrición de cogollo en *A. tequilana* por MALDI-TOF-MS y 16S ADNr análisis)..... 984

Alfredo Reyes-Tena[a,b], Gabriel Rincón-Enríquez[a], Sylvia Patricia Fernández-Pavía[b], Luís López-Pérez[b], Evangelina Esmeralda Quiñones-Aguilar[a]*. DEVELOPMENT OF A SCALE OF SEVERITY OF WILT CAUSED BY *Phytophthora capsici* L. IN POBLANO CHILI PLANTS. (Desarrollo de una escala de severidad de la marchitez causada por *Phytophthora capsici* L. en plantas de chile poblano) 985

Carlos Patricio Sauceda-Acosta*[a], Raúl Hipólito Sauceda-Acosta[b], Jose Guadalupe Quintana-Quiroz[a], Francelia Acosta-Cota[c], Alberto Borbón-Gracia[b], Bardo Heleodoro Sánchez-Soto[c+]. RUST SEVERITY (*Uromyces ciceri arietini* Grognon) IN CHICKPEA LEAVES. (Severidad de la roya (*Uromyces ciceri arietini* Grognon) en hojas de garbanzo) 992

Pedro Posos Ponce[a], Adrian Montoya Ramos[b], Benito Monroy Reyes[a], Omar Alejandro Posos Parra[c] Gustavo Enciso Cabral[a]. EVALUATION OF BIOLOGY EFECTIVINESS ON RESCATE 20 S INSECTICIDE FOR CONTROLLING WHITE FLY (*Bemisia tabaci)* ON JALAPEÑO PEPPER (*Capsicum annuum*) IN ZAMORA, MICHOACAN. (Evaluación de la efectividad biológica del insecticida rescate 20 ps (acetamiprid) para el control de mosca blanca (*Bemisia tabaci*) en chile jalapeño en Zamora, Michoacán) 998

Gloria Cristina Rodríguez-Cárdenas[a*+]. ISOLATION OF *Fusarium spp*. IN THE PRODUCTION OF PRE-BASIC SEED OF POTATO (*Solanum tuberosum*). (Aislamiento de *Fusarium spp.* en la producción de semilla prebásica de papa *Solanum tuberosum*) 1006

María del Consuelo de Jesús López-Vielma[a], Evangelina Esmeralda Quiñones-Aguilar[a], Gabriel Rincón-Enríquez[a*+]. BACTERIOPHAGES: A POTENTIAL ALTERNATIVE FOR THE BIOLOGICAL CONTROL OF BACTERIAL SPOT IN THE CULTIVATION OF *Capsicum annuum* L. (Bacteriófagos: una alternativa potencial para el control biológico de la mancha bacteriana en el cultivo de *Capsicum annum* L.)..... 1012

Beatriz Genoveva Guardado-Fierros[a], Gabriel Rincón-Enríquez[a], Evangelina Esmeralda Quiñones-Aguilar[a*+]. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF *Pseudomonas aeruginosa,* CAUSAL AGENT OF SOFT ROT IN *Polianthes tuberosa*. (Aislamiento y caracterización de *Pseudomonas aeruginosa,* agente causal de pudrición blanda en *Polianthes tuberosa*) 1019

Susana García-Téllez[a,b], Evangelina Esmeralda Quiñones-Aguilar[a], Luís López-Pérez[b], Sylvia Patricia Fernández-Pavía[b], Gabriel Rincón-Enríquez[a*+]. PRODUCTION OF BACTERICIDAL SUBSTANCES IN AXIHUITL BY EFFECT OF MYCORRHIZATION AND ORGANIC MATTER. (Producción de sustancias bactericidas del axihuitl por efecto de la micorrización y materia orgánica) 1026

Viviana Montaño-Becerra[a]*, Martín Eduardo Ávila- Miranda[a+], Norma Alejandra Mancilla-Margalli[a], Pedro Posos-Ponce[b]. GENETIC VARIABILITY OF STRAINS OF *Fusarium solani* ISOLATED FROM STEM ROT OFAGAVE (*Agave tequilana* WEBER var. Azul) PLANTS WITH WILT SYMPTOMS. (Variabilidad genética de aislados de *Fusarium solani* obtenidos de pudriciones de tallo de plantas de agave (*Agave tequilana* Weber var. azul) con síntomas de marchitez) 1033

Alberto Margarito García-Munguía[a*+], Gonzalo Espinosa-Vásquez[b], Nicolás Maldonado-Moreno[b], Guillermo Ascencio-Lucian [b], Marcelo Acosta-Ramos[c], Carlos Alberto García Munguía[d], Mario Alberto Franco Sánchez[c], Argelia García Munguía [c], Hugo González de Jesús[e]. EVALUATION OF *Peronospora manshurica* ON SOYBEAN GENOTYPES IN CYCLE SPRING-SUMMER 2014 IN SOUTH TAMAULIPAS. (Evaluación de *Peronospora manshurica* en genotipos de soya en el ciclo Primavera-Verano de 2014 en el sur de Tamaulipas)..... 1041

Yur Yenova Chávez- Castrillón[a*], Miguel Juan Beltrán- García[a+], Paolo Di Mascio[b], Marisa H.G. Medeiros[b]. DO LACCASES ARE IMPORTANT FOR THE VIABILITY OF THE FUNGUS *Mycosphaerella fijensis*? (¿Las lacasas son importantes para la viabilidad del hongo *Mycosphaerella fijensis*?) 1042

Adrián Héctor Palacios-Arriaga[a], Gabriel Rincón-Enríquez[a]*, Evangelina Esmeralda Quiñones-Aguilar[a+]. STRATEGIES TO ISOLATE RHIZOSPHERE ACTINOMYCETES TO CONTROL SOFT ROT OF *Polianthes tuberosa* OF MORELOS. (Estrategias para aislar actinomicetos de rizosfera para el control de la pudrición blanda de *Polianthes tuberosa* del estado de Morelos) 1043

Venus Jiménez Castañeda[a*+], Sergio Avila Vargas[a], Oscar Espinosa García[a], Diana Hurtado López[a], Gisela Irineo Luis[a], Fernando Reyes León[a], José Luis Sánchez Rios[a]. PHYTOPATHOLOGICAL DIAGNOSIS OF PITAYO *Stenocereus spp*., IN SAN PEDRO YELOIXTLAHUACA, PUEBLA, MÉXICO. **(**Diagnóstico fitopatológico de pitayo *Stenocereus spp.* en San Pedro Yeloixtlahuaca, Puebla) 1044

Ana Patricia Raygoza Martínez[a]*, Luis Patricio Guevara Acevedo[b+], Gilberto Rodríguez Pérez[b], Juan Gabriel Ramírez Pimentel[b], Francisco Cervantes Ortiz[b], Mariano Mendoza Elos[b]. *Eucalyptus globulus* AND *Tagetes erecta* VEGETABLE POWDER EVALUATION FOR *Zabrotes subfasciatus* CONTROL IN PERUANO BEAN. (Evaluación de polvos vegetales de eucalipto y cempasúchitl para control de gorgojo pinto en frijol peruano) 1051

Alba Margarita Hernández-Ibáñez[a*+], Ramón Ignacio Arteaga-Garibay[a], Luis Felipe Guzmán-Rodríguez[a], Hugo Alberto Zaldívar-López[a], María Micaela Gómez-Estrada[a], María de Jesús Gómez-Lizardi[a]. FUNCTIONAL DIVERSITY EVALUATION OF MICROBIAL COMMUNITIES ASSOCIATED WITH RHIZOSPHERE SOIL FROM TWO RACES OF MAIZE. (Evaluación de la Diversidad funcional de las comunidades microbianas asociadas a suelo rizosférico de dos razas de maíz) 1052

Maharshi Ledezma Rodríguez[a]*, Moisés Cortés-Cruz[a+], Víctor Coria Ávalos[b] and Luis Guzmán Rodríguez[a]. GENETIC DIVERSITY ANALYSIS IN VARIETIES OF AVOCADO RESISTANT AND SUSCEPTIBLE TO MISTLETOE ATTACK. (Análisis de Diversidad Genética en Variedades de Aguacate Resistentes y Susceptibles al Ataque del Muérdago) 1059

Jonathan Madueña Soto[a]*, Sixto Velarde Félix[b+], Oscar Enrique Arvizu Fuentes[c], José Pablo Meza Castro[a], Moisés Barajas Ortiz[a], José Antonio Garzón Tiznado[d]. MOLECULAR IDENTIFICATION BY ENZYMATIC SEQUENCING OF *Fusarium spp*., ISOLATES OF THE "MANGO MALFORMATION" OF MANGO IN SOUTH SINALOA. (Identificación molecular mediante secuenciación enzimática de *Fusarium spp*., aislados de la "Escoba de Bruja" de mango en el sur de Sinaloa) 1060

Oscar Enrique Arvizu Fuentes[a*], Sixto Velarde Félix[b+], Jonathan Madueña Soto[c], José Pablo Meza Castro[c], Víctor Valenzuela Herrera[b], Franklin Gerardo Rodríguez Cota[d], Gustavo Adolfo Fierros Leyva [e], Pedro Francisco Ortega Murrieta[e], Claudia María Melgoza Villagómez[f], Raúl Hipólito Sauceda Acosta[d], Gutiérrez Giovanna Sánchez Ilse[a]. GENETIC RESISTANCE OF CHICKPEA TO YELLOWING CAUSED BY RACE 0 OF *Foc* UNDER CONTROLLED CONDITIONS. (Resistencia genética de garbanzo a la amarillez ocasionada por la raza 0 de *Foc* bajo condiciones controladas) 1066

Zilia Yanira Muñoz-Ramírez[*a], Tania Lorena Murillo-Ibarra[a], Laila Nayzzel Muñoz-Castellanos[a], Leonides Bernardo Fernández-Licón[b], León Raúl Hernández-Ochoa[a]. BACTERICIDAL ACTIVITY OF TERPENIC MOLECULES OF ESSENTIAL OILS AGAINST *Erwinia amylovora*. (Actividad bactericida de moléculas terpénicas de aceites esenciales contra *Erwinia amylovora*) 1071

Alberto Margarito García-Munguía*[a], Gonzalo Espinosa-Vásquez[b], Nicolás Maldonado-Moreno[b], Guillermo Ascencio-Luciano[b], Enrique Garza-Urbina[b], Cristóbal Ervi Bautista-Pérez[b], Carlos Alberto García Munguía[c], Wendy Karina Gastelum Ferro[c], Alma Morfin Morfin Arriaga[e]. POPULATION FLUCTUATION OF *Anticarsia gemmatalis* IN SOYBEAN GENOTYPES IN THE PERIOD SPRING-SUMMER 2014 IN THE SOUTH OF TAMAULIPAS. (Fluctuación poblacional de *Anticarsia gemmatalis* en genotipos de soya en el ciclo Primavera-Verano 2014 en el sur de Tamaulipas) 1072

INGENIERÍA QUÍMICA

Paulina Gutiérrez Macías[a*], Yanelly González Nolasco[a], Lourdes Hernández De Jesús[a], Blanca Estela Barragán Huerta [a+]. EFFECT OF SALINITY AND pH ON THE ADSORPTION OF BRILLIANT VIOLET DYE USING ACTIVATED CARBON. (Efecto de la salinidad y del pH sobre la adsorción del colorante Violeta Brillante usando carbón activado) 1073

Indira Yarely López Cortés[a]*, Mariana Ramos Estrada[a+], Gustavo Iglesias Silva[b], Fernando Pérez Villaseñor[c]. DENSITY OF PURE AND BINARY MIXTURES OF IONIC LIQUIDS BASED ON SULFONIUM, IMIDAZOLIUM AND PYRROLODINIUM CATIONS AND BIS(TRIFLUOROMETHYLSULFONYL)IMIDE ANION WITH 1-PROPANOL. (Densidades de líquidos iónicos puros y sus mezclas con 1-propanol, basados en los cationes imidazolium, sulfonium y pyrrolidinium y el anión bis[trifluoromethylsulfonyl]imide) 1080

Juan Carlos Tapia Picazo[a+],Tito Enrique Herrera Larrasilla[b], Karen Analy Campos Santana[a*]. DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF POLYACRYLONITRILE FIBERS WITH ANTIBACTERIAL AND AROMATIC PROPERTIES. (Desarrollo y caracterización de fibras de poliacrilonitrilo con propiedades antibacteriales y aromáticas) 1088

Juan Carlos Tapia Picazo [a], Cesar Arturo Muñoz Gallegos [a*+]. EVALUATION OF AN ACRYLONITRILE-BASED POLYMER IN A WET EXTRUSION SYSTEM TO OBTAIN CARBON FIBER PRECURSORS. (Evaluación de un polímero a base de acrilonitrilo en un sistema de hilatura en húmedo para la obtención de precursoras de fibra de carbón) 1093

Oswaldo Andrés Martínez[ab]*, José Daniel Padilla de la Rosa[b], Juan Paulo García Sandoval[a+]. ANALYSIS AND SIMULATION OF A STEAM DISTILLATION PROCESS FOR PERSIAN LIME ESSENTIAL OIL EXTRACTION. (Análisis y simulación de un proceso de destilación por arrastre de vapor para la extracción de aceite esencial de limón persa) 1101

Oswaldo Andrés Martínez[ab]*, José Daniel Padilla de la Rosa[b]. FREE SOFTWARE FOR RESEARCH AND EDUCATION IN CHEMICAL ENGINEERING: GNU OCTAVE AND SCILAB. (Software libre para investigación y educación en ingeniería química: GNU Octave y Scilab) 1108

Rogelio Prado-Ramírez[a], Dafnne Monserrat Gudiño García[a,*], Gonzalo E. Jacques Fajardo[a], Enrique Arriola-Guevara[b], Rosa Isela Corona Gonzalez[b], Guadalupe M. Guatemala-Morales[a,+]. STUDY OF THE FRYING PROCESS PARAMETERS ON THE PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF A SNACK MADE FROM CORNFLOUR ADDED WITH YELLOW PEA FLOUR AND OAT BRAN. (Estudio de los parámetros del proceso de freído sobre las propiedades fisicoquímicas de un alimento tipo botana a base de harina de maíz adicionada con harina de chícharo entero y salvado de avena) 1116

PROCESOS QUÍMICOS

Patricia Araceli Santiago García[a*+], Mercedes G. López[b]. EFFECT OF SPRAY-DRYING CONDITIONS ON PHYSICAL PROPERTIES OF AGAVINS FROM *Agave potatorum* Zucc. (Efecto de las condiciones del secado por aspersión sobre las propiedades físicas de las agavinas de *Agave potatorum* Zucc) 1117

Rafael Rodríguez-Cortés[a*], Marcela de la Mora-Amutio[a], Julia del C. Martínez-Rodríguez[a], Tetsuya Ogura[a]. PROTOTYPE DESIGN TO SIMPLIFY THE EXTRACTION OF SAPONINS *Agave tequilana* WEBER VAR. AZUL. (Diseño de prototipo para la simplificación de la extracción de saponinas de *Agave tequilana* Weber var. azul) 1120

Gustavo Adolfo Castillo-Herrera[a+*], Rodrigo Mejía-Mancilla[a], Marcos Godoy-Zaragoza[a]. EVALUATION OF EXTRACTION PROCESS OF CAPSAICINOIDS IN SERRANO PEPPER (*Capsicum annuum*) BY SUPERCRITICAL FLUID EXTRACTION. (Evaluación del proceso de extracción de capsaicinoides de chile serrano (*Capsicum annuum*) mediante CO_2 en condiciones supercríticas) 1121

Jorge Alberto García Fajardo[a+], Jaime Robles Cota[a], Mirna Estarrón Espinosa[a], Gustavo Adolfo Castillo-Herrera[a*]. EFFECT OF PRESSURE AND TEMPERATURE OVER CAPSAICINOIDS CONTENT IN A SUPERCRITICAL FLUID EXTRACT OF CHILE DE ARBOL (*Capsicum annuum* LINNAEUS). [Efecto de presión y temperatura sobre el contenido de capsaicinoides en un extracto supercrítico de chile de árbol (*Capsicum annuum* Linnaeus)] 1122

Jorge Alberto García Fajardo[a+], Karent Magdalena Labrador Felix[a], Mirna Estarrón Espinosa[a], Gustavo Adolfo Castillo-Herrera[a*]. SUPERCRITICAL FLUID EXTRACTION OF CHILCUAGUE (*Heliopsis longipes*). [Extracción mediante CO_2 en condiciones supercríticas de chilcuague (*Heliopsis longipes*)] 1123

Efrén Aguilar Garnica[a*+], Juan Paulo García Sandoval[b]. DESIGN AND IMPLEMENTATION OF FUZZY OBSERVERS FOR THE ESTIMATION OF FREE FATTY ACIDS CONCENTRATION IN AN ESTERIFICATION PROCESS. (Diseño e implementación de observadores difusos para la estimación de la concentración de Ácidos Grasos Libres en un proceso de esterificación) 1124

Sinuhé César Castelo Esparragoza[a*], Efrén Aguilar Garnica[a+], Froylán Mario Espinoza Escalante[a]. OPTIMIZATION OF OPERATING CONDITIONS IN PET'S CRYSTALLIZATION WITH A COMBINED DESIGN OF EXPERIMENTS. (Optimización de las condiciones de operación para la cristalización de PET usando un diseño de experimentos combinado) 1125

Raúl Ricardo Quiñonez-López[a*+], Sara Angélica Cortés-Llamas[a], Irma Idalia Rangel-Salas[a]. SYNTHESIS OF N-HETEROCYCLIC CARBENES DERIVED FROM AMINO ACIDS AND THEIR APPLICATION IN THE FORMATION OF RHODIUM COMPLEXES. (Síntesis de carbenos N-heterocíclicos derivados de aminoácidos y su aplicación en la formación de complejos de rodio) 1126

QUÍMICA AGRONÓMICA

Vanesa Chicatto Gasperín[a]*, Myrna Solís Oba[a], Aida Solís Oba[b], Edgar Bustos Barrera[a], Joseph Hernandez Rivadeneyra [a]. METHODS FOR INDOLE 3-ACETIC ACID AND GIBBERELLIC ACID EXTRACTION AND

DETECTION IN DIGESTATES. (Métodos para extracción y detección de ácido 3-indol acético y ácido giberélico en digestatos)..... 1132

Alberto Borbón-Gracia*[a+], Héctor Eduardo Villaseñor-Mir[c], Jesús Alejandra García-Encinas[b], Luis Alberto Peinado-Fuentes[a], Jaime Macías-Cervantes[a]. EVALUATION OF FOUR WHEAT GENOTYPES IN THREE PLANTING DATES IN NORTHERN SINALOA. (Evaluación de cuatro genotipos de trigo harinero en tres fechas de siembra en el norte de Sinaloa)..... 1138

Christian Marely Rodriguez Salazar[a*], Silvia Evangelista Lozano[a]. INDUCTION TO CALLOGENESIS OF *Bougainvillea glabra* CHOISE. (Inducción a callogénesis de of *Bougainvillea glabra* Choise) 1142

Edith Gutiérrez-Fernández[a]*, Ana Aguilar-Chama[b], Roger Guevara-Hernandez[b+]. THE EFFECT OF TWO POLYMERS WITH POTENTIAL FOR THE RETENTION OF SOIL ON HERBACEOUS PLANTS GERMINATION. (Efecto de dos polímeros con potencial para la retención del suelo en la germinación de plantas herbáceas) 1146

Francisca Ramírez Godina[a*], Fabián Fernández Luqueño[b], Valentín Robledo Torres[a], Leticia Escobedo Bocardo[a], Hermila Trinidad García Osuna[a]. MICROMORPHOLOGY OF STEM AND ROOT OF MAIZE PLANTS TREATED WITH NANOPARTICLES OF IRON, TITANIUM AND ZINC, IN GREENHOUSE. (Micromorfología de tallo y raíz de plantas de maíz tratadas con nanopartículas de hierro, titanio y zinc, bajo invernadero) 1147

Julio César León Vargas*[+a], Luis Patricio Guevara Acevedo[b], Enrique AndrioEnriquez[b], Raúl René Robles Lacayo[b], Davino Pérez Mendoza[b,] Hugo Cesar Cisneros López[b]. EVALUATION OF FOLIAR FERTILIZERS IN PEANUT YIELDS (*Arachis hypogaea* L.). [(Evaluación de fertilizantes foliares en el rendimiento de cacahuate (*Arachis hypogaea L.*)] 1155

José Guadalupe Quintana Quiroz[a]*, Gabriel Antonio Lugo García[b+], Álvaro Reyes Olivas[b], Bardo Heleodoro Sánchez Soto[b], Carlos Patricio Sauceda Acosta[b]. REFLECTANCE IN LEAVES AND ITS RELATIONSHIP WITH NITROGEN IN CORN CROP. (Reflectancia en hojas y su relación con el nitrógeno en el cultivo de maíz). 1156

María Isabel Martínez Rodríguez[a*+], José Ángel Robles Cervantes[b], Marisol Hernández Ortíz[b], Manuel Ortega González, Gerardo Martínez Mendoza, Daniel Rodríguez Mercado[b]. ORGANIC ROOTINGS ON *Stevia rebaudiana* Bertoni 1163

José Ángel Robles Cervantes[a*+], Marisol Hernández Ortíz[b], Julio César León Vargas[b], Enrique Andrio Enriquez[b], Raúl René Robles Lacayo[b], Hugo Cesar Cisneros López[b]. ELICITOR EFFECT ON PEPPER PRODUCTION (*Capsicum annuum* L.) 1164

Maritza Vega-Petlacalco[a*+], Patricia Romero-Arellano[a], Norma Robledo[a], René Arzuffi [a]. ATTRACTIVENESS OF THE VOLATILES RELEASED BY *Polianthes tuberosa* TO *Scyphophorus acupunctatus*. [Compuestos volátiles de nardo (*Polianthes tuberosa*) con efecto atrayente sobre el picudo del nardo (*Scyphophorus acupunctatus*)] 1165

Valentín Robledo Torres[a*+], Rosalinda Mendoza Villarreal[a], Francisca Ramírez Godina[b], Luis Alonso[a] Valdez Aguilar, Gibran Jaciel Alejandro Rojas[c]. FORMATION OF HYBRIDS IN CHILI PROTRUDING IN YIELD AND NUTRITIONAL QUALITY. (Formación de híbridos en chile, sobresalientes en rendimiento y calidad nutricional)..... 1166

Karina de la Paz García Mariscal[+*a], José Anzaldo Hernandez[b], Rubén Sanjuán Dueñas[b]. CHEMICAL CHARACTERIZATION BAGASSE SUGARCANE (*Saccharum officinarum*), WASTE OF SUGAR INDUSTRY STATE OF COLIMA, MEXICO. (Caracterización química del bagazo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), residuo de la industria azucarera del Estado de Colima, México) 1174

Q. ALIMENTOS

Pamela Celeste Flores-Silva[a]*, Sandra Leticia Rodriguez-Ambriz[a], Luis Arturo Bello-Pérez[a+]. FIBER RICH SNACKS FROM PLANTAIN, CHICKPEA AND MAIZE BLENDS: CHEMICAL COMPOSITION, TEXTURE AND OVERALL ACCEPTANCE. (Botanas con alto contenido de fibra a partir de la mezcla de plátano, garbanzo y maíz: composición química, textura y aceptabilidad) 1175

Pamela Celeste Flores-Silva[a]*, Sandra Leticia Rodriguez-Ambriz[a], Luis Arturo Bello-Pérez[a+]. DIGESTIBLE AND INDIGESTIBLE CARBOHYDRATES OF GLUTEN-FREE SNACKS. (Estudio de los carbohidratos digeribles y no digeribles de botanas sin gluten)..... 1176

Sandra Berenice Araujo Díaz[a], Rosa Eréndida Fosado Quiroz[b], Claudia Álvarez Salas[c], Ana Lourdes López Pablos[ab], María Zenaida Saavedra Leos[b*+]. FOOD TECHNOLOGY APPLICATION OF MALTODEXTRIN AND ITS ASSESSMENT AS A WALL MATERIAL IN THE SPRAY DRYING PROCESS. (Aplicación tecnológica en alimentos de la maltodextrina y su evaluación como material pared en el proceso de secado por aspersión) 1177

Gustavo Adolfo Camelo-Méndez[a]*, Glenda Pacheco-Vargas[a], Francisco Javier García-Suárez [a], Luis Arturo Bello-Pérez[a+]. COMPARATIVE STUDY OF NUTRACEUTICAL PROPERTIES OF MEXICAN MAIZE FLOURS. (Estudio comparativo de propiedades nutracéuticas de harinas de maíz mexicano)..... 1178

Karen María Ruiz-Beltrán[a**], José de Jesús Zazueta-Morales[a], Ernesto Aguilar-Palazuelos[a], Carlos Iván Delgado-Nieblas[a], Miguel Ángel Urrea-Gámez[a], Irma Leticia Camacho-Hernández[a], Roberto Gutiérrez-Dorado[a]. EFFECT OF EXTRUSION PROCESSING ON PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES, DIETARY FIBER, AND SENSORY ACCEPTABILITY OF BREAKFAST CEREALS ADDED WITH NARANJITA FRUIT (*Citrus mitis*) BAGASSE. [Efecto del proceso de extrusión sobre propiedades fisicoquímicas, fibra dietaria y aceptabilidad sensorial de cereales para desayuno adicionados con bagazo del fruto de naranjita (*Citrus mitis*)]..... 1179

Anayanci Guadalupe Luna-Mandujan[a]*, Laura Yaneth Sicairos-Medina[a], Gabriela López-Angulo[a], Nancy Yareli Salazar-Salas[a], Karen Virginia Pineda-Hidalgo[a], Pedro Sánchez–Peña[b], Francisco Delgado-Vargas[a], José Ángel López-Valenzuela[a+]. CHARACTERIZATION OF PHENOLIC COMPOUNDS AND THEIR ASSOCIATION WITH THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF WILD TOMATO FROM MEXICO. (Caracterización de compuestos fenólicos y su asociación con la actividad antioxidante de tomate silvestre de México).. 1180

Blanca Alicia López-Zazueta[a*], Yuridia Lizet Chaidez-Fernández[a], Marcela de Jesús Vergara-Jiménez[a], Feliznando Isidro Cárdenas-Torres[ab], Misael Odín Vega-García[b], Martha Edith López-López[ab+]. EVALUATION OF QUALITY, NUTRITIONAL CONTENT AND ANTIOXIDANT CAPACITY OF PRICKLY PEAR (*Opuntia ficus-indica*) TREATED WITH ASCORBIC ACID AND CALCIUM CHLORIDE. (Evaluación de la calidad, contenido nutricional y capacidad antioxidante de frutos de tuna (*Opuntia ficus-indica*) tratados con ácido ascórbico y cloruro de calcio)..... 1181

Martha Edith López-López[a*], Jordi Gerardo López-Velázquez[b], Lidia Elena Ayón-Reyna[a], María Fernanda Ramírez-Perales[c], Gabriela López-Angulo[a], José Ángel López-Valenzuela[a,c], Misael Odín Vega-García[a,c+]. PHENOLIC COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF MANGO (*Mangifera indica* L) WITH DIFFERENT SENSITIVITY TO LOW TEMPERATURES. (Compuestos Fenólicos y Capacidad Antioxidante de Mango (*Mangifera indica* L.) con diferente sensibilidad a las temperaturas bajas)..... 1193

José de Jesús Luna Díaz[a], Ana Cristina Ramírez Anguiano[a*], José Luis Navarrete Heredia[b], María Judith Sánchez Peña[a], Luis Javier González Ortiz[a], Celso Cortes Romero[a], Gilberto Velázquez Juárez[a], Lizet Yadira Rosales Rivera[c], Sandra Fabiola Velasco Ramírez[a+]. DETERMINATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY IN LARVAE AND ORGANIC WASTE OF THE PROTEIN HYDROLYSATE OF THE INSECT *Tenebrio molitor***.** (Determinación de actividad antioxidante del hidrolizado proteico de larva y desecho orgánico del insecto *Tenebrio molitor*)..... 1204

Pedro Martín Mondragón Cortez[a,*], Julisa López Ramírez[a], María Guadalupe Guatemala Morales[a], Enrique Arriola Guevara[b]. APPLICATION OF FOURIER TRANSFORM INFRARED (FTIR) SPECTROSCOPY IN COMBINATION WITH ATTENUATED TOTAL REFLECTANCE (ATR) FOR THE DETERMINATION OF MATURATION INDEXES IN TEQUILAS. (Aplicación de la técnica de espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) en combinación con reflexión total atenuada (ATR) para la determinación de índices de maduración en tequilas)..... 1210

Ferretiz-Contreras Diana[a], Álvarez-Salas Claudia[b+], Alvarado-Galván Magdalena[b*]. EVALUATION OF THE NUTRITIONAL, SENSORY QUALITY AND STABILITY OF A SNACK CHIP TYPE AMARANTH AND OATS. (Evaluación de la calidad nutrimental, sensorial y la estabilidad de una botana tipo chip de amaranto y avena) 1216

Javier Villanueva Sánchez[a*+], Guillermina González Rosendo[a], Rubén Puga Díaz[a], Jesús Gutiérrez Trujillo[a], Adrian Guillermo Quintero Gutiérrez[a]. MEASUREMENT OF THE LIPASE ACTIVITY AND TOTAL ANTIOXIDANT CAPACITY IN THE SHELF LIFE OF A FUNCTIONAL EMERGENT FOOD. (Medición de la actividad de la lipasa y capacidad antioxidante total en la vida de anaquel de un alimento funcional emergente) 1221

Elías Martínez-Torres[a]*, Araceli Castañeda-Ovando[a], Elizabeth Contreras-López[a], Javier Añorve-Morga[a], Luis Guillermo González-Olivares[a], Judith Jaimez-Ordaz[a]. EVALUATION OF THERMAL STABILITY OF NECTARS ADDED WITH MODIFIED EXTRACTS OBTAINED FROM THE ADDITION OF ORGANIC ACIDS TO ANTHOCYANINS OF THE CAPULIN. (Evaluación de la estabilidad térmica de néctares adicionados con extractos modificados obtenidos de la adición de ácidos orgánicos a antocianinas del capulín)..... 1226

Marysol Rubio Landa[a*], Sarahi López Mendoza[a], Víctor Meza Carmen[a], Rafael Ortiz Alvarado[b], Josué Altamirano Hernández[a+]. TOTAL PHENOLS CONTENT IN SEEDS AND VEGETATIVE TISSUE OF COMMON BEAN. (Contenido de fenoles totales en semillas y tejidos vegetativos de la planta de frijol)..... 1235

Gómez-Zamora Oscar[a]*, Castañeda-Ovando Araceli[a], Contreras López Elizabeth[a], Añorve-Morga Javier[a], González Olivares Luis Guillermo [a], Jaimez Ordaz Judith[a]. THE EFFECT OF THE FEEDING IN THE NUTRITIONAL QUALITY OF THE RAINBOW TROUT RAISED IN CAPTIVITY. (Efecto de la alimentación en la calidad nutricional de la trucha arcoíris criada en cautiverio)..... 1236

Julia Verónica Hernández-Madrigal[a*+], Laura Virginia Madrigal-Ambriz[a], Joel Vázquez-Galindo[a], Oscar Alejandro Figueroa-Barreto[a]. DETERMINATION OF THE ANTIOXIDANT ACTIVITY AND PHYSICOCHEMICAL CHARACTERISTICS IN JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa*, L.) WINE. [Determinación de la actividad antioxidante y características fisicoquímicas en vino de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*, L.)]..... 1243

Julisa Edith López Ramírez[a*+], Estefany Hernandez Aguilera[a], Karina de la Rosa Silerio[a], Pedro Martín Mondragón Cortez[a]. EVOLUTION OF CAPSAICINOIDS AND VOLATILE COMPOUNDS IN FERMENTED PASTES FROM JALAPEÑO AND SERRANO CHILI PEPPERS. (Evolución de los capsaicinoides y compuestos volátiles, presentes en pastas fermentadas de chile jalapeño y serrano)..... 1250

Willy Morales-Ávila[a*+], Cinthya Annel Avila-Estrada[a], Rosa Eréndira Fosado-Quiroz[a], María Zenaida Saavedra-Leos[a]. BROMATOLOGICAL COMPARISON OF COMMERCIAL TOMATO PUREE *vs* ARTISANAL. (Comparación bromatológica de puré de tomate comercial *vs* artesanal)..... 1256

Vania Montserrat Salazar Camarillo[a*], Sandra Fabiola Velasco Ramírez[a], Ana Cristina Ramírez Anguiano[a], Lizet Yadira Rosales Rivera[b], Sánchez-Peña María Judith[a], Luis Javier González Ortiz[a], José Luis Navarrete Heredia[c], José de Jesús Luna Díaz[a+]. BROMATOLOGY STUDY OF THE RAW SPECIE AND ORGANIC WASTE OF ADULT INSECT *Ulomoides dermestoides*. (Estudio bromatológico de la especie en bruto y del desecho orgánico del insecto adulto *Ulomoides dermestoides*) 1261

Oscar Gómez-Zamora[a*+], Araceli Castañeda-Ovando[a], Elizabeth Contreras-López[a], Javier Añorve-Morga[a], Luis Guillermo González-Olivares[a], Judith Jaimez-Ordaz[a]. SKELETAL ASSESSMENT OF RAINBOW TROUT RAISED IN CAPTIVITY FOR IT´S POSSIBLE USE IN DEVELOPING A CATTLE FOOD. (Evaluación del esqueleto de trucha arcoíris criada en cautiverio para su posible uso en la formulación de un alimento para ganado)..... 1268

Carlos Andrés Piedrahita Bermúdez[a*+], María Orfilia Román Morales[a], Laura Cristina Preciado Velásquez[a]. CHEMICAL ASSESSMENT BRAN FLOUR BARLEY (*Hordeum vulgare*) WITH POTENTIAL APPLICATION IN THE DEVELOPMENT OF A BAKERY PRODUCT. (Evaluación química de harina de afrecho de cebada (*Hordeum vulgare*) con potencial aplicación en el desarrollo de un producto de panificación) 1275

Mónica Virginia Montoya-Hernández[a]*, Julisa Edith López-Ramírez[a], Francisco Javier Pérez-Martínez[a], Juan Villafaña Rojas[b], Mirna Estarrón-Espinosa[a+]. QUALITY OF VARIOUS MEXICAN COMMERCIAL BEERS. (Calidad de diferentes cervezas mexicanas comerciales)..... 1283

Eristeo García Márquez[a], Teresa Del Rocío Morales Pérez[a*+], Hugo Espinosa Andrews[a], Jorge Alberto García Fajardo[a]. DESIGN OIL-WATER MICRO EMULSIONS FOR STABILIZATION ALKAMIDES. (Diseño de emulsiones aceite-agua para la estabilización de alcamidas)..... 1290

Laura Lucía Ramírez Ramos[a], Norma Chamé Pérez[b], Claudia Patricia Beltrán Miranda[c], María Leonor Valderrama-Cháirez[d*+]. CUPCAKE WITH AMARANTH, RICE AND OATS FLOURS: DEVELOPMENT AND EVALUATION. (Cupcake con harinas de amaranto, arroz y avena: Desarrollo y evaluación)..... 1296

Yazmin Zaragoza-Peralta[a*+], Víctor Conde-Martínez[a], Rubén San Miguel Chávez[a], Alfredo López Jiménez[b], Guillermo Calderón Zavala[b]. QUALITY PARAMETERS, POLYPHENOLIC COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF FRESH SYCONIUMS OF COMMON FIG (*Ficus carica* L.). (Parámetros de calidad, compuestos polifenólicos y actividad antioxidante de siconos frescos de Higuera común (*Ficus carica* L.)..... 1302

Alma Vázquez-Luna [a,b*+], Cristian Ulises Arbez-Evangelista[b*], Alma E. Díaz-Vázquez[c], Rafael Díaz-Sobac[a, b]. PAPRIKA OLEORESIN AS A DYE AND PRESERVATIVE IN THE DEVELOPMENT OF A SOY SAUSAGE. (Oleorresina de pimiento como colorante y conservador en la elaboración de chorizo de soya)..... 1303

Alma Vázquez-Luna[a,b*+,] B.M.L. Cruz[b*], Maricela Santiago-Santiago[c], Rafael Díaz-Sobac[a]. DEVELOPMENT OF A GLUTEN-FREE BREAD AND ENRICHED WITH QUINOA. (Elaboración de un pan libre de glutén y enriquecido con quinoa)..... 1307

Evelin Solís-Sánchez[a]*, Severiano Patricio-Martínez[b], María Leonor Valderrama-Cháirez[b]. DEVELOPMENT AND EVALUATION OF A POTENTIAL FUNCIONALITY CANDY BASED ON PEANUT AND ORGANIC COFFEE. (Desarrollo y evaluación de una golosina con potencial de funcionalidad, tipo mazapán, a base de cacahuate y café orgánico)..... 1312

Rosa Eréndira Fosado Quiroz[a*], Alejandra de los Ángeles Osorio Castillo[a], María Zenaida Saavedra Leos[b], Juan Francisco Pauli Sauceda[a]. CHEMICAL CHARACTERIZATION OF FLOWER PALM *Yucca filifera*. (Caracterización química de la flor de palma *Yucca filifera*)..... 1318

Emir Mancilla Juan[a*+], Víctor Conde Martínez[a], Alejandrina Robledo Paz[a], Hilda Victoria Silva Rojas[a], Moisés Cortez Cruz[b]. EVALUATION OF PROTEIN EXTRACTION METHODS FROM MAIZE (*Zea mays* L.) GRAINS. [Evaluación de métodos de extracción de proteínas de granos de maíz (*Zea mays* L.)]..... 1324

Aline Manzur Aguilar[a]*, Patricio Martínez Severiano[b], María Leonor Valderrama Cháirez[b+]. DEVELOPMENT AND EVALUATION OF A GUMMY CANDY WITH PITAHAYA PULP (*Hylocereus undatus*). [Desarrollo y evaluación de una gomita a base de pulpa de pitahaya (*Hylocereus undatus)*]..... 1325

Sandra Jiménez-Espinoza[a]*, Mirna Estarrón-Espinosa[b], María Dolores García-Parra[b+], Eugenia del Carmen Lugo-Cervantes[b], Socorro Josefina Villanueva-Rodriguez[b]. DETERMINATION OF FATTY ACID PROFILE AND PRESENCE OF CONJUGATED LINOLEIC ACID, IN TWO ARTISAN FERMENTED PRODUCTS OF THE STATE OF JALISCO (ADOBERA CHEESE AND TEJUINO) BY GAS CHROMATOGRAPHY. (Determinación del perfil de ácidos grasos y la presencia de ácido linoleico conjugado, en dos productos fermentados artesanales del Estado de Jalisco (queso Adobera y Tejuino), mediante cromatografía de gases)..... 1332

María de Jesús Mendoza-Sánchez[a], Sandra O. Mendoza-Díaz [a], María Guadalupe Flavia Loarca-Piña[a], Marcela Gaytán-Martínez[a], R. Campos-Vega[a], Alexandra del Socorro Cárdenas-Hernández[b], Héctor Paul Reyes Pool[c]. (Formación de nanopartículas de Alginato-Quitosano cargadas con ácido fólico)..... 1339

María Alejandra Villaseñor López[a*], Jorge Alberto García Fajardo[a], Eugenia Lugo Cervantes[a+]. MICRO AND NANO-ENCAPSULATION OF BLACKBERRY *(Rubus spp.)* AND BLUEBERRY *(Vaccinium corymbosum)* ANTHOCYANINS. [Micro y nanoencapsulación de antocianinas de zarzamora (*Rubus spp.*) y arándano (*Vaccinium corymbosum*)] 1343

Ismael Ramírez Flores[a,*+], M. del Socorro López Cortéz[a], María Soledad Vázquez Murrieta[a]. CONTENTS OF TOTALS PHENOLICS COMPOUNDS IN TOMATO VARIETY SALADETTE (*Solanum lycopersicum*). (Contenido de compuestos fenólicos totales en jitomate variedad saladette *Solanum lycopersicum*)..... 1350

Rafael Ortíz-Alvarado[a+], Luis A. García de León Rodríguez[a*], César R. Solorio-Alvarado [b]. EXTRACTION OF FATTY ACIDS POLYUNSATURATED FROM ***Rubus idaeus*** PRODUCED IN MICHOACÁN. (Extracción de ácidos grasos polinsaturados de *Rubus idaeus* producido en Michoacán) 1354

Blas Flores Pérez[a], Margarita Romero Ávila[a], Dessire Gabriela Olivar Minjares[a], Ricardo Alberto Miranda Hernández[a]. STUDY OF THE MAILLARD REACTION. (Estudio de la reacción de Maillard)..... 1355

Sandra Sofía Ramírez Sánchez[a], María Fernanda Curiel Romero[a], Michelle Guadalupe Torres Castro[a], Allyson Téllez Martínez[a*], José Isael Gutiérrez Espinosa[a+]. OSMOTIC DEHYDRATION OF PEAR FRUIT USING AN EXPERIMENTAL DESIGN APPROACH. (Determinación de las condiciones óptimas para la deshidratación de peras por osmosis)..... 1362

María Zenaida Saavedra Leos[a], Rosa Eréndida Fosado Quiroz [a], César Leyva Porras[b], Ana Lourdes López Pablos[ac], Sandra Berenice Araujo Díaz[c*]. APPLICATION TECHNOLOGY AND THERMAL-PHYSICAL CHARACTERISTICS SYSTEM ORANGE JUICE-INULIN SPRAY DRYING. (Aplicación Tecnológica y características Físicas-Térmicas de un Sistema de Jugo de Naranja-Inulina secado por Aspersión) 1363

QUÍMICA ANALÍTICA

Brenda Mejía-Ortiz[a*+], Ana V. Reyes-Fierro[a], Beatriz A. Rocha-Gutiérrez[a], Luis de La Torre[b]. METHOD DEVELOPMENT FOR THE ANALYSIS OF A GROUP OF EMERGENT POLLUTANTS (PBDEs) IN SEWAGE SLUDGE USING (HSSPME-GC-MS). [Desarrollo de la metodología para el análisis de un grupo de contaminantes emergentes (PBDEs) en lodos residuales usando (HSSPME-GC-MS)] 1369

Blanca Alicia García-Grajeda[a*+], Sergio A. Águila[b], Héctor Peinado-Guevara[a], Adriana Cruz-Enríquez[a], José de Jesús Campos-Gaxiola[a]. COLORIMETRIC DETECTION OF Ba^{2+} IONS USING 11-MERCAPTOUNDECYLPHOSPHONIC ACID FUNCTIONALIZED GOLD NANOPARTICLES. (Detección colorimétrica de iones Ba^{2+} usando nanopartículas de oro funcionalizadas con el ácido 11-mercaptoundecilfosfónico)..... 1370

Ma. de la Paz Elizalde González[a], Esmeralda García Díaz[a*+], Hilda Mota Nava[a], Rodolfo Trejo Vázquez[b]. INFOCHEMICALS OF GUAVA WEEVIL: CHROMATOGRAPHIC PROFILE. (Infoquímicos del picudo de la guayaba: Perfil cromatográfico)..... 1377

Karina Jeanette Parra Saavedra[a*+], Adriana Macaria Macías Lamas[a], Ana María Puebla Pérez[a] Gregorio Guadalupe Carbajal[b]. QUANTIFICATION OF CYCLOPHOSPHAMIDE INCORPORATED INTO LAYERED DOUBLE HIDROXIDES, USING HIGH PERFORMANCE LIQUID CHOMATOGRAPHY (HPLC). [Cuantificación de ciclofosfamida incorporada en hidróxidos dobles laminares, mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)] 1378

Nayeli Sarahí Quiñones-Islas[a*+], Tzayhrí Gallardo-Velázquez[b], Guillermo Osorio-Revilla[c], Juan Fabricio Lazcano-Escobar[c]. CHEMOMETRIC MODEL FOR DETECTION OF ADULTERANTS IN OILS BY MID-FTIR SPECTROSCOPY AND MULTIVARIATE ANALYSIS. (Modelo quimiométrico para la detección de adulterantes en aceites por medio de espectroscopia MIR-FTIR y análisis multivariante)..... 1379

Germán Godínez Cardoza[a*+], Celerino Reséndiz Rosas[a]. LOW COST MANUFACTURING METHOD OF MICROFLUIDICS SYSTEMS USING ACRYLIC SHEETS AND LASER ENGRAVING, AS BASIS FOR A CELL SEPARATION SYSTEM. (Método de fabricación de sistemas microfluídicos de bajo costo con lámina de acrílico y grabado láser como base de un sistema de separación de células) 1385

QUÍMICA BIOORGÁNICA

Verónica Gisela López-Martínez[a*], Miguel Ángel Claudio-Catalán[a], Felipe Medrano-Valenzuela[a], Carolina Godoy-Alcántar[a+]. STRUCTURAL ELUCIDATION OF POLYMYXIN B-PHOSPHATE COMPLEXES. (Elucidación estructural de complejos polimixina B-fosfato)..... 1386

QUÍMICA CLÍNICA

Guillermina González Rosendo[a], Javier Villanueva Sánchez[a*+] Iker Rodríguez García[a], Guadalupe Bravo Rivera[a], Gybran Eduardo Reyes Navarrete[a], Adrián Guillermo Quintero Gutiérrez[a]. EVALUATION IN HUMANS TOTAL ANTIOXIDANT CAPACITY BY CONSUMING A DRINK OF RICE BRAN. (Evaluación en humanos de la capacidad antioxidante total por el consumo de una bebida de salvado de arroz)..... 1393

Guillermo Castro-Torres Ibrahim[a,*+], María Angelina Torres-Ledesma[a], María de Lourdes García-Jiménez[a], María Guadalupe Azpeitia-Galaviz[a], Elia Brosla Naranjo-Rodríguez[b]. TOXICITY EVALUATION OF *Raphanus sativus* L. *var niger* IN TWO EXPERIMENTAL MODELS. (Evaluación de la toxicidad de *Raphanus sativus* L. *var niger* en dos modelos experimentales) 1399

Penélope Valdez Aburto[a]*, Leonardo Daniel Molina Noyola[a], María Guadalupe Zavala Cerna[a], Ana Cristina Lara Acevedo[b], Jorge Alfonso Herrera Figueroa[b], Aurelio Flores García[b], Olivia Torres Bugarín[a+]. GENOTOXICITY EVALUATION AFTER TOPICAL CORTICOSTEROID APPLICATION IN MICE PERIPHERAL BLOOD. (Evaluación de genotoxicidad de cuatro corticosteroides de uso tópico en sangre periférica de ratón)..... 1408

QUÍMICA FARMACÉUTICA

PatriciaSalazar Carrasco[a]*, Lorena Moreno Vilet[b], Rosa María Camacho Ruiz[b], Alba Adriana Vallejo Cardona[a], José Luis Flores Montaño[c], Marisela González Ávila[a], Blanca Elizabeth Ruiz Álvarez[a], Miguel

Ángel Teposte Andrade[a], Zaira Y. García Carvajal[a+]. AGAVE FRUCTANS AS FUNCTIONAL PHARMACEUTICAL EXCIPIENT IN A GASTRORETENTIVE SUSTAINED-RELEASE CRYOGEL. (Fructanos de agave como excipiente farmacéutico funcional en un criogel de liberación sostenida de retención gástrica) 1409

Eneida Turiján Espinoza[a,b*+], Raúl Alejandro Salazar [a,b], Rosa del Carmen Milán Segovia[b], Diana Patricia Portales Pérez[a]. ROLE OF SIRTUINS ON NAT1 AND NAT2 ENZYMATIC ACTIVITY..... 1419

Claudia Mariana Méndez González[a*+], Cristina Isabel Núñez Angeles[a]*, Juan Rodrigo Salazar[a]. SYNTHESIS OF ANTI-INFLAMMATORY β-SITOSTEROL DERIVATES. (Síntesis de derivados anti-inflamatorios de β-Sitosterol)..... 1420

QUÍMICA DE PRODUCTOS NATURALES

Ma. Beatriz Sánchez-Monroy[a*+], Alejandro Zentella-Dehesa[b], Nadia J. Jacobo Herrera[b], Beatriz Hernández Téllez[c], Mariano Martínez-Vázquez[a]. ANTI-TUMOR EFFECT OF THE 3α-OH MASTICADIENOIC ACID IN PROSTATE CANCER XENOGRAFTS, BY INHIBITION OF PROLIFERATION MARKERS AND APOPTOSIS INDUCTION. (Efecto anti-tumoral del ácido 3α-OH masticadienoico en xenotransplantes de cáncer de próstata, por la inhibición de marcadores de proliferación e inducción de apoptosis) 1425

Brenda Gisella Curiel Olague[a]*, Margarita Cid Hernández[a], Raúl Ricardo Quiñones López[a], Sandra Fabiola Velasco Ramírez[a+], Fermín Paul Pacheco Moisés[a], Fernando Antonio López Dellamary Toral[b], Ricardo Manríquez González[b], María Judith Sánchez Peña[a], Luis Javier González Ortiz[a], Ana Cristina Ramírez Anguiano[a]. EXTRACTION, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF CHLOROPHYLL A OF THE CYANOBACTERIUM *Arthrospira platensis*: A SIMPLE PROPOSAL, WITH LOW COST AND HIGH YIELDS. (Extracción, purificación y caracterización de la clorofila A de la cianobacteria *Arthrospira platensis:* una propuesta simple, de bajo costo y con altos rendimientos)..... 1433

Gerardo Díaz Vázquez[a*+]. (Actividad antitumoral de saponinas esteroidales en líneas celulares de cáncer cérvico uterino HeLa y CasKi)..... 1440

José Luis Rodríguez Chávez[a]*, Virginia Gómez Vidales[a], Elvia Coballase Urrutia[b], Daniel Ortega Cuellar[b], Guillermo Delgado Lamas[a+]. EVALUATION OF THE PROTECTIVE ABILITY OF *Heterotheca inuloides* METABOLITES TOWARD OXIDATIVE DAMAGE TO *C. elegans* USING SPECTROSCOPIC TECHNIQUES. (Evaluación de la capacidad protectora de los metabolitos de *Heterotheca inuloides* frente al daño oxidativo en *C. elegans* empleando técnicas espectroscópicas) 1441

Leonardo Romo Patiño[a*], Alexis Joavany Rodríguez Solís[b], Ma Lourdes Acosta Urdapilleta[c], Elba Cristina Villegas Villarreal[b+]. IDENTIFICATION OF PIGMENTS IN STRAINS OF *Pycnoporus sanguineus*. (Identificación de pigmentos en cepas *Pycnoporus sanguineus*) 1448

Mirna Estarrón-Espinosa[a*+], Alberto Flores-Arteaga[b], Gustavo Adolfo Castillo-Herrera[a]. CHEMICAL CHARACTERIZATION OF ESSENTIAL OIL OF GOBERNADORA (*Larrea tridentata*), OBTAINED BY

HYDRODISTILLATION. (Caracterización química del aceite esencial de Gobernadora (*Larrea tridentata*), obtenido por hidrodestilación) 1449

María Nancy Pérez Mejía[a], Pablo Emilio Vanegas Espinoza[a*], Alejandro Zamilpa Álvarez[b], Alma Angélica Del Villar Martínez[a+]. PHYTOCHEMICAL PROFILE OF *Kalanchoe daigremontiana* SUSPENSION CULTURES. (Perfil fitoquímico de cultivos en suspensión de *Kalanchoe daigremontiana*)..... 1450

Carlos Arturo Loyola Torres[a], Alma Angélica Del Villar Martínez[a], Gabriela Sepúlveda Jiménez[a], Pablo Emilio Vanegas Espinoza[a*+]. EFFECT OF SALICYLIC ACID ON PHENOLIC COMPOUNDS PRODUCTION OF CORIANDER (*Coriandrum sativum* L). [Efecto del ácido salicílico sobre la producción de compuestos fenólicos en cilantro (*Coriandrum sativum* L)]..... 1455

Lauro Daniel Aguilar-Ramírez[a*+], Montserratt Herrera-Martell[a], Juan Rodrigo Salazar[b], Anabelle Cerón-Nava[c] Juan Rosales-Guevara[d]. ANTIMCROBIAL ACTVITY OF *Simsia sp.* EXTRACTS. (Actividad antimicrobiana de extractos de *Simsia sp.*) 1462

Calderón Gómez I.[a]*, Bustillos G.[b]; Salazar J.R.[a]*. THE CHEMICAL AND COLORIMETRIC STUDY OF "AGRILLO" *(Rhus sp.*) 1463

Montserratt Herrera-Martell[a*+], Lauro Daniel Aguilar-Ramírez[a], Juan Rodrigo Salazar[b], Anabelle Cerón-Nava[c]. ANTIFUNGAL ACTIVITY OF *Simsia sp* EXTRACTS IN IMPORTANT STRAINS IN FOOD INDUSTRY. (Actividad antifúngica en cepas con importancia en la industria alimentaria de extractos de *Simsia sp*) 1464

Jesús Salvador Navarrete Zapién[a]*, Eugenia del Carmen Lugo Cervantes[a+]. SELECTION OF MICRO AND NANO-ENCAPSULATION CONDITIONS OF ANTHOCYANINS FROM BLACK BEAN (*Phaseolus vulgaris L*. VAR. QUERÉTARO). [Selección de las condiciones de micro y nanoencapsulación de antocianinas provenientes de frijol negro (*Phaseolus vulgaris L*. Var. Querétaro)] 1465

Zahaed Evangelista-Martínez[a], Nohemí Reyes-Vázquez[b*+], Ingrid Rodríguez Buenfil[b]. OREGANO OIL COMBINED WITH NATURAL FOOD PRESERVATIVES AS ANTIMICROBIAL AGAINST HUMAN PATHOGENS. (Aceite de orégano combinado con conservadores naturales de alimentos como antimicrobiano contra patógenos humanos)..... 1472

Rafael Ortiz Alvarado[a+], Rubén Chávez Rivera[a], Víctor Meza Carmen[a], Luis Alejandro García de León Rodríguez[b*]. OIL SEED FROM FRUITS *Rubus idaeus* GROWN IN MICHOACAN BY THE COSMETICS INDUSTRY. (Aceite de semilla de los frutos *Rubus ideaus,* cultivados en Michoacán, por la industria cosmética) 1473

Sonia Hernández-Navia[a*+], José Luis Figueroa-Hernández[b], Adolfo Andrade-Cetto[c], Artemisa Espinoza–Hernández[c], Gerardo Mata Torres-Valle[c], Mariano Martínez-Vázquez[a]. EVALUATION OF HYPOGLYCAEMIC ACTIVITY OF AN ETHYL ACETATE EXTRACT OF *Ibervillea lindheimerii*. (Evaluación de la actividad hipoglucemiante de un extracto de acetato de etilo de la raíz de *Ibervillea lindheimeri*) 1474

Karla Ivette Leal López[a*], María Porfiria Barrón González[a+], Ramón Gerardo Rodríguez Garza[a], Sergio Moreno Limón[b]. *Helicobacter pylori* BIOFILM INHIBITION BY METHANOLIC EXTRACTS OF *Stenocereus*

marginatus AND *Glycyrrhiza glabra*. (Inhibición del biofilm de *Helicobacter pylori* por extractos metanólicos de *Stenocereus marginatus* y *Glycyrrhiza glabra*). 1475

CONFERENCIAS MAGISTRALES Y PANELES SELECTOS

Ecological Restoration: Opportunities and challenges to repairing degraded ecosystems across the globe. James Hallett. Eastern Washington University. 1476

Liming for the mitigation of acid rain in freshwaters: A review of recent results. Tom Clair. Department of Earth Sciences, Dalhousie University, Canada. 1527

Emerging ideas about temperate forest restoration in the western United States. James Hallett. Eastern Washington University. 1572

DENDROCHRONOLOGY IN MEXICO: HYDROCLIMATIC AND ECOLOGICAL APPLICATIONS. (La dendrocronología en México: aplicaciones hidroclimáticas y ecológicas). José Villanueva Díaz. Laboratorio de Dendrocronología. INIFAP. México. 1613

PRÓLOGO

Zapopan Jalisco a 16 Febrero de 2016

Estimados Congresistas:

La elaboración de este libro memorial de las actividades del Quinto 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 2015, de quizás el congreso de pre-grado mas importante en el país organizado por una institución educativa. Este año cerca de 400 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 aquel no tan lejano 2007 como un tímido proyecto en la mente de estudiantes y profesores con una participación de 650 asistentes, 8 años después es un importante proyecto de divulgación científica del Estado Jalisco, que es un Estado en el se privilegia las ideas y la innovación, creando una zona del conocimiento con sentido transformante, que ha logrado reunir a mas de 1300 personas.

La búsqueda de soluciones a los problemas nacionales, 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 80 mentes destacadas (entre ellas al premio mundial de la alimentación 2014), 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.

También esta fue la primera vez que el congreso unió a la academia con la industria en una plataforma común de experiencia e innovación. En la actualidad enfrentamos importantes desafíos para generar, no solo el conocimiento de frontera, si no también productos de alto valor agregado que en consecuencia elevarán la competitividad del país. Es prioritario para el país y sus jóvenes estudiantes la organización de eventos de este tipo, donde ellos adquieren experiencias que en consecuencia estimulan un mayor ingreso a los programas de posgrado, con jóvenes convencidos de desarrollar ciencia de alta calidad.

En nombre del comité que presidí, me enorgullece presentar a ustedes el libro de memorias de los trabajos libres y otras actividades desarrolladas en el Quinto Congreso Internacional de Biología, Química y Agronomía organizado por la Facultad de Ciencias 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.

Dr. Miguel J. Beltrán García
Presidente del Comité Organizador

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF PLANT GROWTH PROMOTING BACTERIA (PGPR) FROM THE RHIZOSPHERE OF MAIZE (*Zea mays L.*) WITH POTENTIAL TO BE USED AS BIOFERTILIZERS

(Aislamiento y caracterización de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV) a partir de la rizósfera de maíz (*Zea mays L.*) con potencial de ser empleadas como biofertilizantes)

Jackeline Lizzeta Arvizu-Gómez[a*+], Alejandro Hernández-Morales[b], Carlos Rubén Carbajal-Cazola[c], Juan Ramiro Pacheco-Aguilar[d], Jesús Bernardino Velázquez-Fernández[a], Jennifer Alexis Rojas-Morales[e], Norma Angélica Pérez-Dueñas[e].

[a]Secretaría de Investigación y Posgrado, Universidad Autónoma de Nayarit
[b]Unidad Académica Multidisciplinaria Zona Huasteca, Universidad Autónoma de San Luis Potosí
[c]Unidad Académica de Agricultura, Universidad Autónoma de Nayarit
[d]Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro
[e]Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas y Farmacéuticas, Universidad Autónoma de Nayarit

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: lizzeta28@gmail.com

Área del Conocimiento: Agrobiotecnología.

ABSTRACT
This study was conducted with a view to isolate and characterize rhizospheric bacteria from maize (*Zea mays* L.), with biochemical characteristics of plant-growth promoting and evaluate their effect on germination, growth and/or development of cucumber and chili seedling. A total of 182 strains were isolated from rhizosphere of maize, of which 57 showed solubilizing phosphate capacity. Additional biochemicals analyzes, to evaluating the lytic enzymes production (cellulose, pectinase and amylolitic activity), permitted us to select 13 strains for plant-growth promoting analyses *in vitro.* Seed germination tests and growth analyses in cucumber and chili plants were performed. The preliminary results show that the bacterial isolates have a positive effect on seeds germination of cucumber and chili plants *in vitro*. Likewise, the results demonstrate an effect of the bacterial isolates on the seedlings development by promoting of the main root development, and increasing of secondary and tertiary roots as well as the formation of root hairs. An increase in the length of stem was also observed in presence of some of the bacterial isolates.

Keywords: rhizobacteria; solubilizing phosphates; plant growth promoting bacteria.

EVALUATION OF THE EFFECT OF BIOTIC AND ABIOTIC STRESS IN THE PRODUCTION OF ANTIOXIDANT COMPOUNDS IN CALLUS OF *Opuntia spp*.

(Evaluación del efecto de estrés biótico y abiótico en la producción de compuestos antioxidantes en callos de *Opuntia spp.*)

Nancy Gabriela Camarena-Rangel [a]*, María del Socorro Santos-Díaz [a+], Ana Paulina Barba-de la Rosa [b]

[a]Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí
[b]Departamento de Biología Molecular. IPICyT, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

* Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: ssantos@uaslp.mx

Área del Conocimiento: Agrobiotecnología.

ABSTRACT
In previous studies, callus from *Opuntia ficus-indica*, *Opuntia megacantha* and *Opuntia streptacantha* species were established. These *in vitro* cultures produce phenols and flavonoids and have antioxidant activity. It is known that biotic and abiotic stress induce the synthesis of secondary metabolites, therefore, the aim of this work was to evaluate the effect of water stress (induced with polyethylene glycol, PEG), light stress (UV light) and jasmonic acid (JA) in the production of phenolics compounds, and antioxidant activity of callus. The *Opuntia* calli were cultured on MS medium containing 1.25%, 2.5% or 5% PEG, MS with 25 and 50 µM JA, or were irradiated with UV light (30 to 480 min). Development of callus was unaffected by PEG, and the content of phenolic acids, flavonoids and antioxidant increased 3 to 5 times in relation to control treatment. In the presence of JA the growth of *O. ficus indica* and *O. streptacantha* was similar to control but decreased in *O. megacantha* callus. JA mainly favored flavonoid accumulation. Irraditation of callus also increased content of phenolic acids and flavonoids but in a lesser extent than PEG or UV. Data show that it was possible to increase secondary metabolites concentration by elicitation of callus from the three *Opuntia species.*

Keywords: callus 1; phenolic acids 2; flavonoids 3; antioxidant activity 4.

PROMPT CHLOROPHYLL *A* FLUORESCENCE AS A TOOL TO FOLLOW VARIATIONS OF PHOTOSYNTHESIS DURING WATER-STRESS IN *Capsicum annuum* L. PLANTS

(Aumento rápido de la fluorescencia de clorofila *a* como una herramienta para monitorear las variaciones de la fotosíntesis en plantas de *Capsicum annuum* L. durante estrés hídrico)

Huitzimengari Campos[a*+], Carlos Trejo[b], Cecilia B. Peña-Valdivia[b], Rodolfo García-Nava[b].

[a]Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Michoacán, Instituto Politécnico Nacional, Justo Sierra No. 28 Oriente, Jiquilpan, Michoacán 59510, México.
[b]Posgrado en Botánica, Colegio de Postgraduados, Carretera México-Texcoco, km 36.5, Montecillo, México 56230, México.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: hcamposga@conacyt.mx

Área del Conocimiento: Agrobiotecnología.

ABSTRACT
Water availability is one of the most important limitations to photosynthesis and plant productivity. Thus, proper monitoring of plant water stress is essential for the development of appropriate, sustainable, irrigation programs for crop production in semiarid areas. In the present work a laboratory experiment was performed with bell peppers (*Capsicum annuum* L.) plants that were water stressed by reducing irrigation amounts. Soil (Ψ_S) and leaf water potential (Ψ_L), gas exchange and prompt chlorophyll *a* fluorescence measurements were made at various intervals during the drought cycle to obtain a gradient of water stress situations. The results showed that, as water stress increases, there was a progressive decline of both Ψ_S and Ψ_L. Similarly, CO_2 assimilation rates (*A*), stomatal conductance (g_s) and transpiration (*Tr*) decreased with increasing water stress. Parameters obtained from the prompt chlorophyll *a* fluorescence and analyzed by the JIP-test revealed that several events were affected by water stress and these include the inactivation of photosystem II (PSII) reaction centers, a decline in electron transport beyond Q_A^- and a decrease in the reduction of end electron acceptors at the photosystem I (PSI). A direct correlation between a JIP-test parameter (PI_{total}) and important photosynthesis parameters (*A* and g_s) is shown in *C. annuum* plants. The significance of these relationships for water stress monitoring and irrigation scheduling is discussed. The PI_{total} measured with a portable fluorescence instrument provides a good method for the early detection of water stress, and may become a useful guide to irrigation requirements.

Keywords: Drought stress, gas exchange, water relations, prompt fluorescence

ELICITOR EFECT IN PERUANO BEAN SEED QUALITY

(Efecto de elicitores en calidad de semilla de frijol peruano)

Ana Patricia Raygoza Martínez [a]*, Luis Patricio Guevara Acevedo [b+], Gilberto Rodríguez Pérez [b], Juan Gabriel Ramírez Pimentel [b], Francisco Cervantes Ortiz [b], Mariano Mendoza Elos [b].

[a]Estudiante de Maestría en Ciencias en Producción y Tecnología de Semillas del Instituto Tecnológico de Roque
[b]Instituto Tecnológico de Roque

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: lpguevara@itroque.edu.mx

Área del Conocimiento: Agrobiotecnología.

ABSTRACT
One of the main factors that defines success in crop planting is the use of high quality seeds. Germination and vigor capacity of the seed used must be high to get the optimum field establishment. Elicitor's application promotes, inducts or activates defense mechanisms in plats and with it the seed quality parameters are improved. The objective of this investigation was to evaluate the effect of the elicitors: quitosan (Q), salicylic acid (AS) and calcium carbonate (CC) in seed quality of peruano beans in a factorial experimental design: elicitor x doses with four repetitions and two checks: one with sodium carboxymethyl cellulose and an absolute one. Germination and emergence percents, emergence speed and vigor index II were evaluated. Elicitor doses used were mixed with sodium carboxymethyl cellulose as a vehicle to reach 0.5% and 1% of CC, 1µM and 10µM of Q; 1mM and 10mM of AS concentrations. 100 g of peruano beans were used with elicitor doses depending on each treatment and placed in plastic containers of 236 mL, each container was shaken for 30 seconds, and then kept for a month. After that, standard germination and sand bench tests were made to determine: germination percent, emergence percent, emergence speed and vigor index II. A variance analysis was done to determine differences for elicitors and doses; and there were no differences between two level doses for the four parameters evaluated. Then a mean comparison was done by LSD ($p>0.05$) because differences between elicitors were found. The results show significant differences between elicitors for: emergence percent, emergence speed and vigor index II. Checks showed the highest levels for emergence speed; checks and CC showed the highest values for emergence percent and vigor index II, meanwhile AS and Q affected these last two parameters negatively; for germination percent no differences were found.

Key words: germination 1; vigor 2; peruano bean 3; emergence 4.

STABILITY OF MAIZE OF THE JALA RACE DEPENDING ON ITS EAR LENGTH

(Estabilidad de maíz de la raza jala en función de su longitud de mazorca)

Jesús A. López-Guzmán [a*+], Juan A. Aguilar-Castillo [b], J. Jesús García-Zavala [c], Ricardo Lobato-Ortiz [c], Antonio Rojas-Polanco [b], Víctor Valenzuela-Herrera [a]

[a] INIFAP-CIRNO, Campo Experimental Valle de Culiacán.
[b] Unidad Académica de Agricultura, Universidad Autónoma de Nayarit.
[c] Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad-Genética, Colegio de Postgraduados.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: guzman.jesus@inifap.gob.mx

ABSTRACT
One of the races of maize (Zea mays L.) most important in Mexico, because of its unique features is the Jala race; it has been grown exclusively in the Valley of Jala, Nayarit, Mexico. The maize ear of Jala is recognized worldwide as the larger, measuring up to 60 cm in length. During the selection process, it is important to consider not only the linear effects of genotype and environment, but also those of the genotype x environment (GxE) interaction, because by considering this interaction the effectiveness of selection of genotypes is improved through environments. The genotype x environment interaction is the differential performances that exhibit the genotypes when they are subjected to different environments. The objective of this work was to study the interaction GxE and evaluate the stability of the ear length (LM) of 14 maize populations of maize of the Jala race by the AMMI method. 14 maize populations of Jala race were evaluated in four municipalities in the state of Nayarit and in the Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, State of Mexico. An experimental design of randomized complete blocks with three replications was used. In all cases the experimental unit was two rows of 5 m long and 0.80 m apart. The variance analysis detected significance ($P \leq 0.01$) between locations and among populations for LM, while the interaction of both factors showed no significance. In the AMMI analysis, the population that showed less interaction or was more stable was P3, and the one contributing more to the interaction or was unstable was P5. The localities that best discriminated populations were San José de Mojarras and Ixtlán del Río, and the least discriminating was the location Valley of Jala. The effects of locations had great importance because they caused variations in the expression of ear length.

Keywords: Jala race, ear length, G x E interaction, AMMI.

RESUMEN
Una de las razas de maíz (Zea mays L.) más importantes en México, por sus características únicas, es la raza Jala; ésta ha sido cultivada exclusivamente en el Valle de Jala, Nayarit, México. Su mazorca se reconoce mundialmente como la de mayor tamaño, llegando a medir hasta 60 cm de longitud. Durante el proceso de selección es importante considerar no solo los efectos lineales del genotipo y del ambiente, sino también los de la interacción genotipo x ambiente (GxA), ya que al considerar ésta se mejora la eficacia de la selección de genotipos a través de ambientes. La interacción genotipo x ambiente es el comportamiento relativo diferencial que exhiben los genotipos cuando se les somete a

diferentes ambientes. El objetivo de este trabajo fue estudiar la interacción GxA y evaluar la estabilidad de la longitud de mazorca (LM) de 14 poblaciones de maíz de la raza Jala por el método AMMI. Se evaluaron 14 poblaciones de maíz de la raza Jala, en cuatro municipios del estado de Nayarit y en el Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Edo. de México. Se utilizó un diseño experimental de bloques completos al azar con tres repeticiones. En todos los casos la unidad experimental fue de dos surcos de 5 m de longitud y 0.80 m. El análisis de varianza detectó significancia ($P \leq 0.01$) entre localidades y entre poblaciones para LM, mientras que la interacción de ambos factores no mostró significancia. En el análisis AMMI la población que presentó menor interacción o resultó más estable fue P3, y la que contribuyó más a la interacción o resulto más inestable fue P5. Las localidades que mejor discriminaron a las poblaciones fueron San José de Mojarras e Ixtlán del Río, y la que menos discriminó fue la localidad del Valle de Jala. Los efectos de localidades tuvieron gran importancia, ya que provocaron variaciones en la expresión de longitud de mazorca.

Palabras Clave: Raza Jala, longitud de mazorca, interacción G x A, AMMI.

INTRODUCCIÓN

Una de las razas de maíz (*Zea mays L.*) más importantes en México, por sus características únicas, es la raza Jala; ésta ha sido cultivada exclusivamente en el Valle de Jala, Nayarit, México [1]. La mazorca de este maíz se reconoce mundialmente como la de mayor tamaño, llegando a medir hasta 60 cm de longitud. No obstante, en los últimos años esta raza ha sufrido "erosión genética" grave, que le ha provocado reducción en su longitud de mazorca y grano [1].

La adaptación de los organismos puede ser medida por la capacidad de éstos para desarrollarse, reproducirse, y dejar descendencia viable. Al respecto [2] señalan que cuando un genotipo es evaluado en distintas condiciones ambientales (años, localidades, y/o épocas de siembra), puede presentar dos tipos de adaptación: general o específica. Un genotipo tiene adaptación general cuando muestra tener mejor comportamiento relativo en la mayoría de los ambientes en los que es evaluado. Por el contrario, un genotipo presenta adaptación específica cuando muestra tener mejor comportamiento relativo en un determinado ambiente.

En relación con el mejoramiento genético, [3] mencionan que durante el proceso de la selección es importante considerar no solo los efectos lineales del genotipo y del ambiente, sino también los de la interacción genotipo x ambiente, ya que al considerar ésta se puede mejorar la eficacia de la selección de genotipos a través de ambientes, lo cual evita la necesidad de desarrollar programas específicos para cada ambiente.

Según [4] menciona que la interacción genotipo ambiente es el comportamiento relativo diferencial que exhiben los genotipos cuando se les somete a diferentes medios ambientes. Este autor menciona que con frecuencia los fitomejoradores enfrentan un problema de gran magnitud cuando seleccionan en presencia del fenómeno de interacción genotipo ambiente. El objetivo de este trabajo fue estudiar la interacción G x A y evaluar la estabilidad de la longitud de mazorca de 14 poblaciones de maíz de la raza Jala por el método AMMI.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se evaluaron 14 poblaciones de maíz de la raza Jala, de las cuales cinco fueron colectas de la región de Jala, Nayarit, a las cuales se les denominó P1, P2, P3, P4 y P5; siete fueron poblaciones mejoradas individualmente a partir del compuesto de selección Montecillo 2007 denominado Jala recuperado: Montecillo-2007(P6), UAN-2008(P7), UAN-2009[a](P8), UAN-2009[b](P9), UAN2009[c](P10), UAN-2010(P11), y UAN-2011(P12) y dos fueron los híbridos varietales 13 XT(P13) y 8 XT(P14), que tienen 50 % de germoplasma de Jala.

Las poblaciones se sembraron en el año 2012 en cinco localidades; cuatro de ellas se establecieron en el estado de Nayarit (San José de Mojarras (L1), Ixtlán del Río (L2), Jala (L3) y Xalisco (L4)), tres de las cuales (L1, L2, y L3) se establecieron en parcelas de agricultores cooperantes. La localidad L4 se estableció en las instalaciones de la Unidad Académica de Agricultura de la Universidad Autónoma de Nayarit, en Xalisco, Nayarit, y la localidad L5 en el Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Montecillo, Texcoco, Edo. de México.

El establecimiento de los ensayos en las localidades (L1, L2, L3 y L4) coincidió con el inicio de la temporada de lluvias; en la L5 se sembró el día 10 de mayo, donde en ésta se aplicaron riegos de auxilio hasta el establecimiento del periodo normal de lluvias. Se utilizó un diseño experimental de bloques completos al azar con tres repeticiones. En todos los casos la unidad experimental fue de dos surcos de 5 m de longitud y 0.80 m entre surcos; la fertilización y labores de cultivo se realizaron de acuerdo con las prácticas tradicionales de cada localidad. Los análisis estadísticos AMMI, así como las gráficas biplot se realizaron con el programa SAS (SAS Institute, 2002) de acuerdo con los procedimientos establecidos por [5].

RESULTADOS

En el **cuadro 1** se muestran los resultados del análisis de varianza AMMI para la variable longitud de mazorca (LM), el análisis mostro significancia (P≤0.01) entre localidades y entre poblaciones para la variable de estudio, mientras que la interacción de ambos factores no mostro significancia.

Cuadro 1. Análisis de varianza AMMI para longitud de mazorca de 14 poblaciones de maíz raza Jala evaluadas en 5 ambientes durante el periodo 2012.

F.V.	g.l.	SC	CM
Localidad (l)	4	298.81	74.70**
Poblaciones (p)	13	221.34	17.02**
Interacción (pxl)	52	179.6	3.45ns
CP1	16	98.53	6.15**
CP2	14	41.39	2.95ns
Error	138	342.75	2.48
Total Corregido	209	1056.3	
CV (%)	8.13		
Promedio	19.36		

F.V.: fuente de variación; g.l.: grados de libertad; **, ns: significativo (p≤0.01) y no significativo, respectivamente; SC: Suma de cuadrados; CM: Cuadrado medio; CV: Coeficiente de variación; CP: Componente principal.

En la **Figura 1** se representa el biplot de la longitud promedio de mazorca en función de las coordenadas del primer eje del CP1 de poblaciones y ambientes. Las poblaciones y ambientes con coordenadas elevadas sobre el CP1, consideradas en valores absolutos, contribuyen en mayor medida a la interacción G x A, en tanto que valores cercanos a cero contribuyen en menor grado a la misma [6].

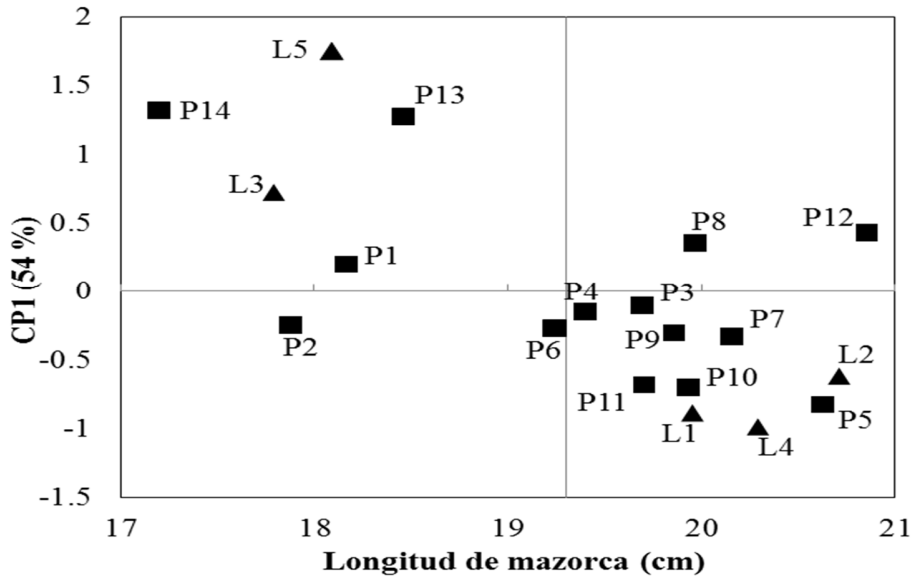


Figura 1. Representación gráfica del CP1 en función de la longitud de mazorca, en promedio de 14 poblaciones evaluadas en cinco localidades.

En la **Figura 2** se observa el comportamiento de las poblaciones en cuanto a su LMZ y aquéllas de mayor interacción con las localidades, en función de las coordenadas del CP1 y CP2. Donde el CP1 se encuentra altamente correlacionado con el efecto principal del genotipo, y representa la proporción del rendimiento (longitud de mazorca) que se debe solo a las características del genotipo. El segundo componente, (CP2), representa la parte del rendimiento debido a la interacción genotipo x ambiente.

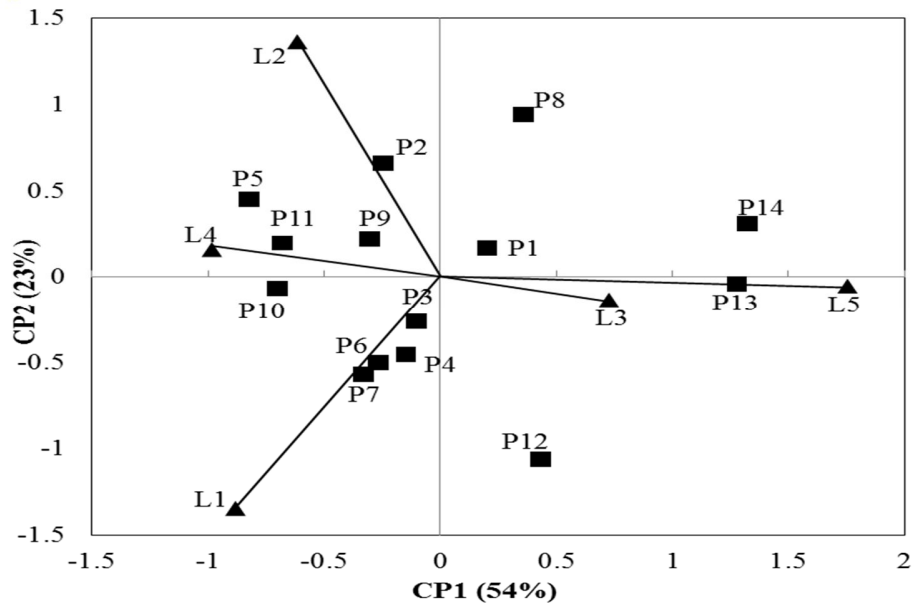


Figura 2. Biplot AMMI para14 poblaciones. Los puntos (P) representan a las poblaciones y los vectores las localidades.

DISCUSIÓN

En el análisis AMMI, Cuadro 1 el 28 % de la suma de cuadrados total se atribuyó a efectos de localidades, mientras que los efectos de población e interacción localidades por población representaron 21 y 17 %, respectivamente. Los efectos de localidades tuvieron gran importancia, ya que provocaron variaciones en la expresión de la longitud de mazorca.

En la Figura 1 la posición de las poblaciones P12 (UAN-2011) y P5 indica que estas mostraron la mayor longitud de mazorca, y por el grado de asociación el ambiente L2 fue donde se expresó la máxima longitud de mazorca.

Las poblaciones P13 (13XT) y P14 (8XT) presentaron valores absolutos positivos superiores a 1.0 sobre el CP1, en tanto que P5, P10 (UAN-2009^{c}) y P11 (UAN-2010) obtuvieron valores negativos mayores a -0.60 (Figura 1), y por esto se infiere que contribuyeron en mayor grado a la interacción, siendo más inestables.

Con respecto al análisis AMMI, se identificaron dos poblaciones, P3 y P4, con un CP1 de valor menor al valor absoluto 0.20; es decir, estas poblaciones presentaron efectos pequeños de interacción población x localidad, siendo más estables [6 y 7].

En la figura 2 se puede observar que algunas poblaciones registraron asociaciones específicas con localidades, como la mostrada por las poblaciones P13 (13XT) y P14 (8XT) en la localidad de Montecillo L5, o la de las poblaciones P6, P7 y P3 en la localidad de San José de Mojarras. Las poblaciones P5 y P11 se asociaron mejor a la localidad L4 Xalisco, por lo que fueron sensibles a los cambios ambientales de los sitios de evaluación.

Con base en la mayor longitud de los vectores de cada ambiente, las localidades que mejor discriminaron a las poblaciones (Figura 2) fueron; San José de Mojarras e Ixtlán del Río (L1 y L2), de acuerdo con los criterios aplicados por [8 y 9]. Tales criterios indican que los vectores que están más retirados del origen discriminan mejor a los genotipos, mientras; que los que están más cercanos al origen de la gráfica son los menos sensitivos o los que más se parecen al promedio, como fue el caso de la localidad de Jala.

Los genotipos que se encuentran cercanos al centro de la figura son más estables que aquellos alejados de la misma. En este sentido, tres poblaciones mostraron una tendencia cercana a cero, y, en un sentido más estricto, las poblaciones P1, P3 y P4, fueron las más estables en las localidades donde fueron evaluadas (Figura 2).

CONCLUSIONES

La población que presentó menor interacción para LM fue P3, y las que contribuyeron más a la interacción G x A para LM fueron P13 (13XT), P14 (8XT), P12 (UAN-2011) y P5. Las localidades que mejor discriminaron a las poblaciones para LM fueron San José de Mojarras e Ixtlán del Río, y el ambiente que menos discriminó fue la localidad del Valle de Jala.

REFERENCIAS

[1] Aguilar-Castillo J. A, Carballo-Carballo A, Castillo-González, F, Santacruz-Varela, A, Mejía-Contreras, J. A, Crossa-Hiriarte, J, Baca-Castillo, G, (2006). Diversidad fenotípica y variantes distintivas de la raza Jala de maíz. Agricultura Técnica en México. 32:57-66.

[2] Fuentes, L. M. R. y W. Quemé. 2005. Evaluación de híbridos de maíz de gano amarillo y blanco en diferentes ambientes de México y Centro América. Informe del PCCMA Guatemala Abril 2005.

[3] Wong, R. R., E. Gutiérrez del Río., S. A. Rodríguez, H., A. Palomo G. H. Córdova O., A. Espinosa B. 2006. Aptitud combinatoria y parámetros genéticos de maíz para forraje en la comarca lagunera. Universidad y Ciencia. Vol. 22, Núm. 002 pp. 141-151.

[4] Márquez, S. F. 1976. El problema de la interacción genético ambiental en genotecnia vegetal. Ed. PATENA, A.C. Universidad Autónoma, Chapingo, México. 113p.

[5] Vargas, M. and J. Crossa, 2000. The AMMI Analysis and Graphing the Biplot. Biometrics and Statistical Unit, CIMMYT. México. 42 p.

[6] Crossa, I., H. Gauch and R. Zobel. 1990. Additive main effect and multiplicative interaction analysis of two international maize cultivar trials. Crop Science 30:493-500.

[7] Medina, S., C. Marín, V. Segovia, A. Bejarano, Z. Venero, R. Ascanio y E. Meléndez. 2002. Evaluación de la estabilidad del rendimiento de variedades de maíz en siete localidades de Venezuela. Agronomía Tropical 52(3):255-275.

[8] Kempton, B. A. 1984. The use of biplots in interpreting variety by environment interactions. Journal of Agricultural Science 103:123-135.

[9] Yan, W.; A. Hunt; Q. Sheng and Z. Szlavnics. 2000. Cultivar evaluation and mega-environment investigation based on the GGE biplot. Crop Science. 40: 597-605.

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF POTATO ENDOPHYTES (*Solanum tuberosum)* VAR. FIANA AS PLANT GROWTH PROMOTERS

(Aislamiento y caracterización de endófitos de papa (*Solanum tuberosum*) var. Fiana como promotores del crecimiento vegetal)

Cisneros-Reyes, Claudia I.[a*+]; Martínez-Rodríguez, Julia del Carmen[b]; De la Mora-Amutio, Marcela[b]; Beltrán-García, Miguel J.[b] y Tetsuya Ogura[b].

[a] Centro de Investigación en Biotecnología aplicada, CIBA Tlaxcala-IPN, Ex-Hacienda San Juan Molino Carretera Estatal Tecuexcomac-Tepetitla Km 1.5, Tlaxcala C.P. 90700, México
[b] Departamento de Química, Instituto de Ciencias Exactas y Terrestres (ICET), Universidad Autónoma de Guadalajara (UAG). Av. Patria 1201, Col. Lomas del Valle, CP 45129, Zapopan, Jalisco, México

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: claudia.cisneros@edu.uag.mx

Área del Conocimiento: Agrobiotecnología.

ABSTRACT
Potato is the fourth most important crop in the world and its production has an average surface coverage in México of 63,919 ha. Approximately 1/3 of the total production cost is destined to chemical fertilization giving importance to the development of alternative strategies for stimulating plant growth such as inoculation with plant growth promoting (PGP) microorganisms like endophytic and rhizospheric bacteria. The objective of this work is the isolation and characterization of endophytes and soil-borne nitrogen fixing bacteria associated to potato plants as *in vitro* PGP and further evaluate the effect of selected strains in greenhouse experiments. We expect to obtain a boost in plant development through application of selected strains capable of indole acetic acid (IAA) production, hydroxyapatite (HA) solubilization and to identify each of the inoculated bacteria in different potato tissues based on the analysis of potato tissue-isolated bacteria against an internally designed MALDI/TOF identification library. A collect of 10 healthy-looking potato plants (*Solanum tuberosum*) Fiana cv. and the corresponding rhizosphere soil was taken from El Sirio a commercial orchard with low levels of chemical fertilization near Los Pozos in Tingüindin, Michoacán, Mexico. All potato plant tissues were surface disinfected and processed, serial dilutions were made and plated in nitrogen free Norris Glucose medium. A total of 135 initial isolates were reduced to 80 strains and tested for their PGP traits. All tested strains were positive for IAA production from 0.28 µg/mL to 8.92 µg/mL, and 32 strains (40%) were positive for HA solubilization with solubilization indexes from 1.039 to 3.757. According to the statistical analysis, 17 strains were selected for bacterial compatibility assays and identification by MALDI/TOF and 16s RNA sequencing, selecting 5 strains belonging to the following genera: *Pseudomonas* (NF10), *Enterobacter* (NRa9 y NRa13), *Pantoea* (NTa10) y *Paenibacillus* (NR11) for greenhouse assays.

Keywords: Bioformulation, Endophytes, Growth promotion, Mass spectrometry, MALDI/TOF

EVALUATION OF THE GERMINATION INDEX IN LETTUCE USING LIQUID DIGESTATES FROM DIFFERENT ANAEROBIC DIGESTION CONDITIONS

(Evaluación del índice de germinación en lechuga usando digestatos líquidos de diferentes condiciones de digestión anaeróbica)

Edgar Esteban Bustos-Barrera[a]*+, María Myrna Solís-Oba[a], Vanesa Chicatto-Gasperín[a], Joseph Israel Hernández-Rivadeneyra[a], Julieth Andrea Peña-Burgos[b], Aida Solís-Oba[c]

[a] Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, Instituto Politécnico Nacional
[b] Facultad de Ciencias Agrarias y del Ambiente, Universidad Francisco de Paula Santander
[c] Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: e.bustos@live.com.mx

Área del Conocimiento: Agrobiotecnología.

ABSTRACT
One of the most important problems are the organic wastes disposal, eutrophication and the enlarge use of chemical fertilizers. An alternative to solve them is the anaerobic digestion (AD), where the organic matter is decomposed by microorganisms to produce biogas and digestate, which has been used as fertilizer. Digestate has two parts, one liquid (biol) and another solid (biosol). We evaluated the lettuce germination index using biols from different AD conditions, to get an organic fertilizer. It was prepared 24 reactors with 10% solids dry basis: 80% waste (cranberry or blackberry, alone and mixture in equal parts) and 20% manure (cow or pig); 60 days retention at mesophilic temperature. One group of reactors was adjusted at initial pH 6 and other to pH 8, and with or without adjusts in the carbon/nitrogen ratio to 20/1. The germination index (GI) assay was done using 10 lettuce seeds (Latuca sativa) by triplicated in petri boxes on filter paper, it was wet with 5% biol and incubated during 4 days, it was measured the root elongation and calculated the GI compared with using distilled water (control). With six of the 24 biols the GI was from 80 to 110% (classified as no phytotoxic) and three biols were growth promoters (IG>110%). The higher IG was getting with the biol from AD of blackberry with pig manure, initially pH 8, with and without initial setting of C/N to 20/1 (162 and 182% respectively). In general GI of biols from AD using cow manure were higher than using pig manure and GI of biols from AD adjusting pH to 8 were higher than in those adjusting pH to 6. Adjust in the C/N ratio did not improve the GI. Changes in the AD conditions affect the biol final properties to be used as fertilizer.

Palabras Clave: anaerobic co-digestion; agricultural residues; liquid digestate; germination index

RESUMEN
Algunos de los problemas ambientales más importantes es la disposición de los residuos orgánicos, la eutrofización y el mal uso de fertilizantes químicos. Una alternativa para resolver dichos problemas es el uso de la digestión anaeróbica (DA), en la cual la materia orgánica es degradada por microorganismos para producir biogás y digestato, el cual ha sido usado como fertilizante. El digestato consta de una fracción líquida (biol) y una sólida (biosol). En este trabajo se evaluó el índice de germinación en lechuga

usando bioles de diferentes condiciones de DA para obtener fertilizante orgánico. Se prepararon 24 biodigestores al 10% de sólidos base seca: 80% residuo (arándano o zarzamora, solos y en mezclas iguales) y 20% estiércol (vaca o cerdo); el tiempo de retención fue de 60 días a condiciones mesofílicas de temperatura . Un grupo de reactores fue ajustado a pH 6 inicial y otro a pH 8, y con o sin ajuste de la relación carbono/nitrógeno a 20/1. El ensayo de índice de germinación (IG) se hizo utilizando 10 semillas de lechuga (*Latuca sativa*) por triplicado en cajas Petri con papel filtro, se humedecieron con biol al 5% y se incubaron por 4 días, se midió la elongación radicular y se calculó el IG comparado con un control con agua destilada. Con seis de los 24 bioles se obtuvieron IG mayores a 80% (clasificados como no fitotóxicos), tres de ellos fueron promotores de crecimiento (IG>110%). Los IG más altos se obtuvieron con el biol de DA de zarzamora con estiércol de cerdo ajustado a pH8 inicial con y sin ajuste inicial de C/N (162 y 182% respectivamente). En general, el IG de los bioles de DA con estiércol de vaca fueron mayores que con estiércol de cerdo, los bioles de DA con ajuste inicial a pH 8 fueron más altos que los ajustados a pH 6. El ajuste inicial en la relación C/N no mejora el IG. Los cambios en las condiciones de DA afectan las propiedades del biol final para ser usado como fertilizante.

Palabras Clave: co-digestión anaeróbica; residuos agrícolas; digestato líquido; índice de germinación

INTRODUCCIÓN

En México enfrentamos diversas problemáticas ambientales, una de ellas es el incremento en la generación de residuos sólidos y su deficiente disposición. Cerca del 50% de los residuos sólidos urbanos generados en México están conformados por material orgánico. La actividad agropecuaria genera un elevado volumen de residuos, tanto en forma de estiércol de animales como de residuos de cultivos, la forma común de tratar estos residuos es esparciéndolos en los campos de cultivo, con el doble interés de disponer de ellos y obtener beneficio de su propiedad fertilizante. Sin embargo, cuando existen cantidades elevadas de estiércol esta práctica puede provocar eutrofización de las cuencas hidrográficas [1].

Una alternativa para la gestión de los residuos orgánicos es la búsqueda y desarrollo de metodologías que utilicen sus componentes para obtener productos de interés y de valor agregado aplicables a la agricultura orgánica. Existen diversas tecnologías para aprovechar los residuos orgánicos, una de ellas es el uso de la digestión anaeróbica (DA), el cual es un proceso de descomposición microbiano donde en ausencia de oxígeno la materia orgánica es degradada para obtener biogás y un digestato, éste último consta de dos partes: una líquida llamada biol y una sólida llamada biosol [2], los cuales, si no son fitotóxicos, pueden ser utilizados como fertilizantes.

En el presente trabajo se evaluó la fitotoxicidad mediante un índice de germinación en semillas de lechuga (*Lattuca sativa*) de bioles obtenidos por co-DA de residuos de arándano y zarzamora, con estiércol de vaca y cerdo, para obtener fertilizante orgánico.

METODOLOGÍA

Para el proceso de co-digestión anaeróbica se construyeron biodigestores de régimen estacionario o batch, hechos de garrafas de plástico de alta densidad de 20 L. Cada digestor tiene en su parte superior una abertura para la carga inicial y una tapa-rosca a la cual se le adaptó una válvula para la salida del biogás. En la parte inferior fue adaptada una válvula que se utiliza para tomar muestras del efluente. Los digestores se cargaron al 80% de capacidad y se diseñaron al 10% de sólidos base seca (sbs) con 20% de

estiércol y 80% de residuo, se mantuvieron a temperatura mesofílica con un tiempo de retención de 60 días.

Los digestores se cargaron con residuos de zarzamora, arándano y mezcla 1:1 de ambos residuos, en co-digestión con estiércoles de vaca y de cerdo. Se agruparon las co-digestiones dependiendo del estiércol utilizado, por lo cual se formaron dos grupos: las co-digestiones con estiércol de vaca y las co-digestiones con estiércol de cerdo. Los parámetros modificados en cada tratamiento fueron el pH y relación C:N de la mezcla inicial ingresada en el digestor. Los ajustes de pH fueron a pH 6 y pH 8, el ajuste de la relación C:N fue de 20:1 y relación C:N inicial sin ajustar, esto con el fin de evaluar el efecto de la modificación de dichos parámetros en el el índice de germinación del biol resultante (Tabla 1). El ajuste de pH se hizo con una solución de Na_2CO_3 1.5 M, y el ajuste de la relación C:N se hizo con residuo molido de cáscara de pepita de calabaza. La tabla 2 muestra las claves y definición de los tratamientos utilizados.

Tabla 1. Diseño del experimento de las mezclas iniciales en las co-digestiones anaeróbicas para obtener bioles. En todos los casos se incluyen los residuos de frutas en las co-DA. Para el ajuste de pH se utilizó una solución de Na_2CO_3 1.5 M. Para el ajuste de la relación C:N se usó cáscara de pepita de calabaza.

Estiércol		pH		Relación C:N	
Vaca	Cerdo	6	8	Sin ajuste	20:1
x		x		x	
x		x			x
x			x	x	
x			x		x
	x	x		x	
	x	x			x
	x		x	x	
	x		x		x

Tabla 2. Mezclas de residuos para los tratamientos, de lado izquierdo se muestra la clave usada para el tratamiento y del lado derecho los componentes de la mezcla y parámetros iniciales utilizados en el tratamiento. Estas mezclas se hicieron con estiércol de vaca y con estiércol de cerdo por separado para formar 24 tratamientos.

Tratamiento	Definición
A6	Residuo de Arándano+Estiércol+Ajuste a pH 6 inicial
A8	Residuo de Arándano+Estiércol+Ajuste a pH 8 inicial
AP6	Residuo de Arándano+Ajuste de relación C:N de 20:1+Estiércol+Ajuste a pH 6 inicial
AP8	Residuo de Arándano+Ajuste de relación C:N de 20:1+Estiércol+Ajuste a pH 8 inicial
Z6	Residuo de Zarzamora+Estiércol+Ajuste a pH 6 inicial

Z8	Residuo de Zarzamora+Estiércol+Ajuste a pH 8 inicial
ZA6	Residuo de Zarzamora+Residuo de Arándano+Estiércol+Ajuste a pH 6 incial
ZA8	Residuo de Zarzamora+Residuo de Arándano+Estiércol+Ajuste a pH 6 incial
ZAP6	Residuo de Zarzamora+Residuo de Arándano+Ajuste de relación C:N de 20:1+Estiércol+Ajuste a pH 6 inicial
ZAP8	Residuo de Zarzamora+Residuo de Arándano+Ajuste de relación C:N de 20:1+Estiércol+Ajuste a pH 8 inicial
ZP6	Residuo de Zarzamora+Ajuste de relación C:N de 20:1+Estiércol+Ajuste a pH 6 inicial
ZP8	Residuo de Zarzamora+Ajuste de relación C:N de 20:1+Estiércol+Ajuste a pH 8 inicial

Al finalizar el proceso de co-DA se determinó la fitotoxicidad de cada biol mediante el índice de germinación (IG), esta prueba es una medida indirecta del grado de degradación que ha sufrido la materia orgánica, si está suficientemente degradada es factible su aplicación en cultivos. La evaluación se hizo tomando en cuenta el índice de germinación (IG) midiendo la elongación radicular de semillas germinadas de lechuga (*Lattuca sativa*), utilizando una metodología modificada de la propuesta por Zucconi et al., (1981) [3], donde reportan que un valor del IG mayor al 80% indica que no presenta fitotoxicidad el biol, si el IG es superior al 110%, es decir que es 10% o más alto con respecto al obtenido en el control, indica que hay una estimulación del desarrollo radicular y si es menor al 50% indica que el biol es fitotóxico y por lo tanto no recomendado para su aplicación. Se utilizaron tratamientos con biol diluido al 5% .

La técnica utilizada utilizada es la siguiente:
-Se preparan cajas Petri con papel filtro y 30 semillas de lechuga cada una.
-Se Humedece el papel filtro con 6 ml del tratamiento a evaluar en la caja Petri.
-Se Incuban las cajas Petri por cuatro días a 27°C en ausencia de luz.
-Se registran el número de semillas germinadas por caja.
-Se mide la elongación de la raíz o crecimiento de la radícula al término de los cuatro días de incubación. Como testigo se utiliza cajas Petri con 30 semillas de lechuga y para humedecer el papel filtro se usan 6 ml de agua destilada.
-Se calcula el porcentaje de germinación relativo (PGR), crecimiento de la radícula relativo (CRR) e índice de germinación (IG), con las ecuaciones siguientes:

$$PGR = \frac{No.\,de\ semillas\ germinadas\ en\ el\ extracto}{No.\,de\ semillas\ \ germinadas\ en\ el\ testigo} x100$$

$$CRR = \frac{elongación\ de\ radículas\ en\ el\ \ extracto}{elongación\ de\ radículas\ en\ el\ testigo} x100$$

$$IG = \frac{PGR\ x\ CRR}{100}$$

RESULTADOS

La técnica de IG propuesta por Zucconi *et al*. (1981) [3] establece una clasificación para la fitotoxicidad con base en el IG obtenido en el tratamiento. La clasificación es la siguiente: si IG>110, el tratamiento es benéfico (promotor de crecimiento vegetal); si IG<110 pero IG>80, el tratamiento no es fitotóxico; si IG<80, el tratamiento es inhibitorio; si IG<50, el tratamiento es fitotóxico. De acuerdo con esta clasificación, en total 6 de los 24 bioles obtenidos no fueron fitotóxicos, 3 fueron promotores de crecimiento, siendo los dos bioles obtenidos de co-DA de residuos de zarzamora con estiércol de cerdo, ajustados a pH 8 inicial con y sin ajuste de C:N los que presentaron IG más alto (IG=162% y 182%) (Fig. 2), y el biol obtenido de co-DA de residuos de arándano con estiércol de vaca, ajustado a pH 6 y sin ajuste de C:N el que presentó el IG con mayor fitotoxicidad (IG=0%) (Fig. 1).

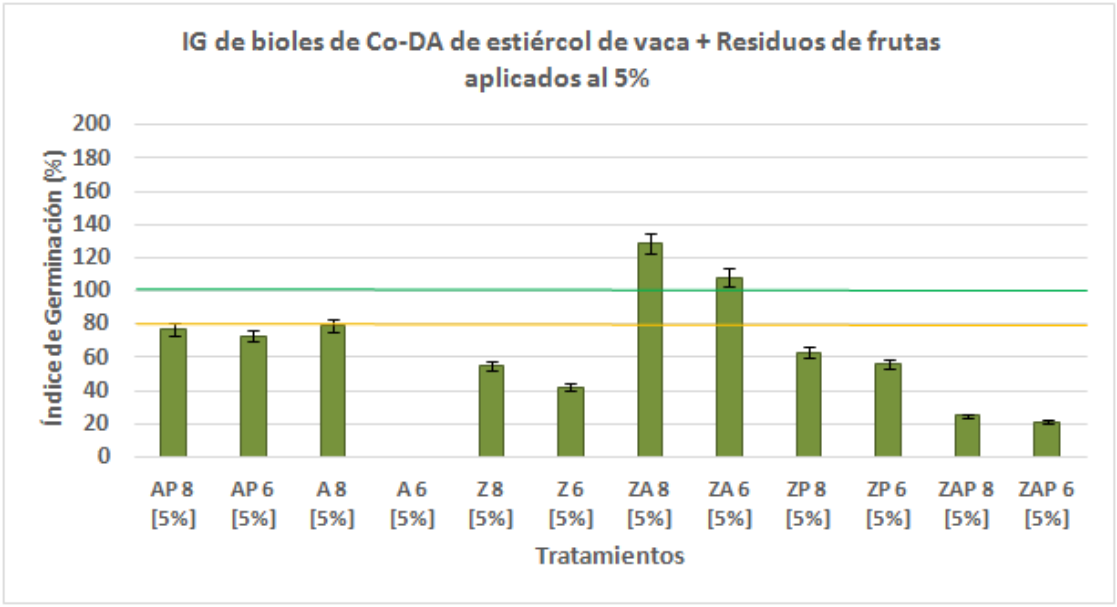


Figura 1. Índices de germinación (en porcentaje) de la elongación radicular de semillas de lechuga al aplicarles bioles obtenidos de co-DA de residuos de arándano y zarzamora con estiércol de cerdo aplicados a concentración de 5%.

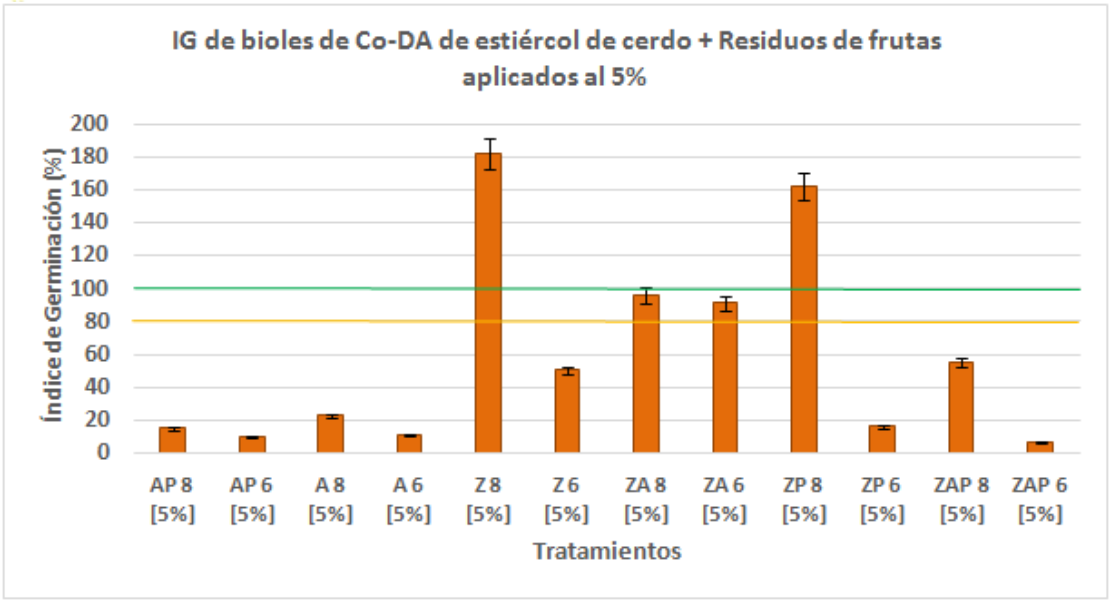


Figura 2. Índices de germinación (en porcentaje) de la elongación radicular de semillas de lechuga al aplicarles bioles obtenidos de co-DA de residuos de arándano y zarzamora con estiércol de vaca aplicados a concentración de 5%.

DISCUSIONES

Como se observa en los resultados, con bioles de co-DA donde se utilizó residuos de zarzamora obtuvieron IG arriba de 110%, lo cual es un indicativo de que dicho residuo contiene propiedades que combinadas con los otros residuos benefician el IG. a su vez se observa que los bioles de las co-DA donde se ajustó a pH inicial 8 obtuvieron IG más altos que aquellos donde se ajustó a pH 6, lo cual sugiere que ajustar el pH inicial a valores de 8 puede incrementar el IG, sin embargo depende de la mezcla de residuos utilizados el alcanzar los valores de IG por arriba del 80%. Por último, aunque en el caso de los bioles de co-DA con estiércol de cerdo se obtuvieron 4 con los IG más altos, éstos contrastan con en general con los demás del grupo, ya que en general son más bajos al compararlos con los bioles de co-DA con estiércol de vaca (excluyendo a los bioles de co-DA con estiércol de cerdo con IG más altos). Por lo cual es de consideración realizar más pruebas de germinación para evaluar la fitotoxicidad de estos residuos de frutas (arándano y zarzamora) con ambos tipos de estiércol (vaca y cerdo).

CONCLUSIONES

- Los tratamientos con IG mayor a 110% incluyen co-DA con residuos de zarzamora.
- En general fueron mayores los IG de co-DA con estiércol de vaca, sin embargo con los bioles de co-DA con estiércol de cerdo se obtuvieron los IG más altos.
- El ajuste inicial de C:N en las co-DA no beneficiaron el IG.
- En general, el ajuste inicial a pH= 8 en las DA incrementaron el IG.
- Los cambios en las condiciones de DA afectan las propiedades del biol final para ser usado como fertilizante.

REFERENCIAS

[1] Al-Masri, M. R. (2001). "Changes in biogas production due to different ratios of some animal and agricultural wastes", Bioresource Technology, 1 (77): 97-100.

[2] Krakat, N., Westphal, A., Schmidt, S., Scherer, P. (2010). "Anaerobic digestion of renewable biomass: thermophilic temperature governs methanogen population dynamics", Applied and Environmental Microbiology, 76 (6): 1842-1850.

[3] Zucconi, F., Pera, A., Forte, M., De Bertoli, M.(1981). "Evaluating toxicity in immature compost", Biocycle (22) :54-57.

TEMPORARY IMMERSION BIOREACTOR SYSTEM (TIBS) FOR MICROPROPAGATION OF *Stevia rebaudiana* BERTONI.

(Sistema de Biorreactor de Inmersión Temporal (BIT) para la micropropagación de *Stevia rebaudiana* Bertoni)

Dumas Oviedo-Pereira[a]*, Silvana Alvarenga Venutolo[b], Silvia Evangelista Lozano[a], Gabriela Sepúlveda Jiménez[a], Mario Rodríguez-Monroy[a+].

[a] Departamento de Biotecnología. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del IPN. Calle CEPROBI 8. Col. San Isidro. Yautepec, Morelos. México CP. 62730.
[b] Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: monroy64@hotmail.com

Área del Conocimiento: Agrobiotecnología.

ABSTRACT
Stevia rebaudiana Bertoni is a plant who contain diterpene glucosides, this compounds have a sweetening power between 100 to 400 times more than the sucrose. The Stevia plant's traditionally propagation is by cuttings or seeds. In the first method it's observed a phytosanitary problematic because of contamination by viruses, bacteria and fungi, which creates risk of spreading diseased plants and crop losses. In the other hand, the use of seeds is related to its low viability and low percent germination (between 10 and 38%), which implies lower economic benefits and low availability of plant material, and a reduction in the production of the interest compounds, so it has led to the search for new strategies propagative. One such strategy is the use of temporary immersion bioreactor, whereby operating costs, labor, time growth and phenomena as hyper- hybridization are reduced. Therefore the aim of this study was to implement a System of Temporary Immersion Bioreactor (TIBS), and used for micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Six units TIS (1L) were produced and the volume of culture medium (300 to 500 ml) was evaluated. Internodal *S. rebaudiana* explants were cultured in Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 30 g / L sucrose, 0.5 mg / L of gibberellic acid and 2 mg / L calcium pantothenate. The results allowed to establish conditions for *S. rebaudiana* plant morphological properties better than those obtained in the semisolid culture. The survival of plants in greenhouses *S. rebaudiana* was 100%.

Keywords: Micropropagation, Temporary Immersion Bioreactor System "TIBS", *Stevia rebaudiana* Bertoni.

RESUMEN
Stevia rebaudiana Bertoni, es una planta que contiene glucósidos diterpenos, compuestos que tienen un poder endulzante entre 100 a 400 veces mayor al de la sacarosa. Tradicionalmente la propagación de la planta de Stevia se realiza mediante esquejes y semillas. En el primer método se observa una problemática fitosanitaria a causa de contaminación por virus, bacterias y hongos, lo que genera riesgo de propagar plantas enfermas y perdidas en el cultivo. Por otra parte, el uso de semillas está ligado a su baja viabilidad y poco porcentaje de germinación (entre 10 y 38%), lo que implica menores beneficios

económicos y baja disponibilidad del material vegetal, además de una reducción en la producción de los compuestos de interés, lo que ha llevado a la búsqueda de nuevas estrategias propagativas. Una de estas estrategias es el uso de biorreactores de inmersión temporal, mediante los cuales se reducen costos operativos, mano de obra, tiempo de crecimiento y fenómenos como la hiperhibridicidad. Por lo anterior el objetivo de este estudio fue implementar un Sistema de Biorreactor de Inmersión Temporal (TIBS), y emplear para la micropropagación de la *Stevia rebaudiana* Bertoni. Seis unidades de TIS (1 L) se produjeron y se evaluó el volumen de medio de cultivo (300 a 500 ml). Los explantes internodales de *S. rebaudiana* se cultivaron en un medio de Murashige y Skoog (MS) complementado con 30 g medio / L de sacarosa, 0,5 mg / L de ácido giberélico y 2 mg / L de pantotenato de calcio. Los resultados permitieron establecer condiciones para obtener plantas *S. rebaudiana* con mejores propiedades morfológicas que los obtenidos en el cultivo semisólido. La supervivencia de las plantas en invernaderos *S. rebaudiana* era 100%.

Palabras Claves: Micropropagación, Biorreactores de Inmersión Temporal "BIT", *Stevia rebaudiana* Bertoni.

INTRODUCCIÓN

Stevia rebaudiana Bertoni, es una planta que contiene glucósidos diterpenos, compuestos que tienen un poder endulzante entre 100 a 400 veces mayor al de la sacarosa [1,2,3,4]. Actualmente la industria alimentaria y farmacéutica, tiene interés en la producción de esta planta, debido a su bajo aporte calórico cuando se usa como edulcorante, además de que se le atribuyen propiedades medicinales. Industrialmente se usa para la preparación de alimentos, siendo un ingrediente de jugos, néctares, bebidas carbonatadas, pastelería, confitería, yogurt, chicles, entre otros [5,6,7,8,9].

Tradicionalmente la propagación de la planta de Stevia se realiza mediante esquejes y semillas. En el primer método se observa una problemática fitosanitaria a causa de contaminación por cierto tipo de microorganismos, lo que genera riesgo de propagar plantas enfermas y perdidas en el cultivo. Por otra parte, el uso de semillas está ligado a su baja viabilidad y poco porcentaje de germinación (entre 10 y 38%), lo que implica menor beneficio económico y poca disponibilidad del material vegetal, además de una reducción en la producción de los compuestos de interés [10,11,12,13], lo que ha llevado a la búsqueda de nuevas estrategias de propagación. En este contexto, las herramientas biotecnológicas basadas en la micropropagación de plantas mediante técnicas de cultivo de tejidos vegetales, representan un mecanismo alternativo para generar un gran número de plántulas. La técnica emplea pequeños explantes como inicio del cultivo, en espacios reducidos y bajo condiciones controladas, además de potenciar ciertas características de interés y obtener finalmente plántulas con una alta calidad sanitaria[14,15,16]. Una alternativa potencial de estas técnicas, consiste en el empleo de Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT), donde se logran optimizar los coeficientes de multiplicación y mejorar el desarrollo fisiológico de plantas para su aclimatación en invernaderos. La técnica, además reduce los costos de producción a gran escala, ya que se requiere menor demanda de mano de obra y se disminuye problemas como la hiperhidricidad existentes en otros sistemas[14,15]. Por todo lo anterior, el objetivo de este estudio fue implementar un sistema de Biorreactores de Inmersión Temporal alternativo para la propagación *in vitro* de plántulas de *S. rebaudiana* Bertoni.

METODOLOGÍA

Multiplicación de plántulas de *S. rebaudiana* en cultivo *in vitro.*

Material vegetal y medio de cultivo: se usaron plantas madre provenientes de un cultivo *in vitro* de *S. rebaudiana* Bertoni variedad criolla, proveniente del Instituto Tecnológico de Costa Rica. El medio que

se empleó fue Murashige y Skoog (MS) suplementado con AG_3 (0.5 mg/L), sacarosa (30 g/L), pantotenato de calcio (2 mg/L) y phytgel®(3.3 g/L)[1]. El pH del medio se ajustó a un valor de 5.7. Se utilizaron frascos tipo gerber, y se adicionaron 25 mL de medio en cada frasco. El material se esterilizó en autoclave a 120 °C con 15 libras de presión durante 20 minutos.

Siembra de explantes: Para la conservación de las plantas en medios semisólidos, se escogieron explantes nodales de un centímetro (cm) y se sembraron 4 o 5 explantes por frasco. Los cultivos se conservaron en una cámara de cultivo bajo condiciones de temperatura de 25 ± 3 °C, con un fotoperiodo de 16 horas luz / 8 oscuridad y una intensidad lumínica de 11.14 µmol m^{-2}. Las vitroplantas se subcultivaron cada 30 o 45 días, dependiendo del crecimiento y desarrollo observado.

Sistemas de Biorreactor de Inmersión Temporal (BIT): El sistema BIT-CeProBi (figura 1) se implementó con seis unidades, utilizando un par de frascos para cada BIT, un frasco para colocar las plantas y otro para el reservorio del medio. Los frascos se comunicaron mediante una manguera de silicona marca *MasterFlex* calibre 25 (Figura 1A). A cada frasco se le acopló en su salida un par de adaptadores marca *Thermoscientific*, con un filtro de marca Whatman® con tamaño de poro de 0.22 µm (Figura 1B-C). Para el suministro de aire, se utilizó un compresor de marca *Poterclable*® el cual suministró aire libre de aceite, con una presión de 20 psi. El control de la frecuencia y tiempo de inmersión de las plantas en el medio de cultivo, se mantuvo por medio de una unidad de programación Timer programable *Siemens* (Figura 1D), que controló el suministro del aire por medio de 2 válvulas solenoides marca *Ascoy* con un regulador de presión (Figura 1E). La frecuencia de inmersión del sistema fue de 10 minutos, cada 12 horas. El montaje se realizó en estantes metálicos dentro de un cuarto de crecimiento a una temperatura de 25 ± 3 °C con un fotoperiodo de 16 horas luz/8 horas oscuridad, la iluminación se realizó con una tira de LED a una intensidad lumínica de 11.14 µmol m^{-2}.

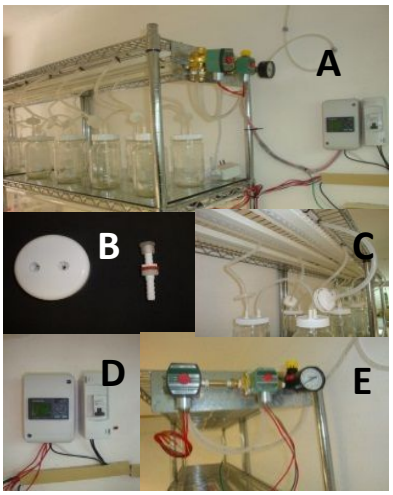


Figura 1. Sistema BIT-CePrOBi para 6 unidades de 1 litro (A), Adaptación de tubos de salida marca *Thermoscientific* a las tapas de los frascos (B), alimentación de aire a los biorreactores con filtro de marca Whatman® con tamaño de poro de 0.22 µm (C), unidad de programación Timer programable *Siemens* (D) y válvulas solenoides marca *Ascoy* (E).

Propagación de las plántulas en sistema BIT: Para iniciar los cultivos en el los BIT, se utilizaron plántulas provenientes de cultivos en medio MS semisólido. Se seleccionaron plantas vigorosas de coloración verde oscuro, explantes aproximadamente de 3 cm y por lo menos con una sección internodal. Una vez establecido el cultivo en los sistemas BIT, la multiplicación se llevó a cabo mediante internodos

provenientes de plantas crecidas en un BIT. Como inoculo inicial se utilizaron 10 explantes por cada BIT, que se colocaron en el medio MS de propagación, pero sin la adición de phytgel®.

Evaluación de volumen del medio de cultivo: con el objeto de disminuir el volumen de operación de los BIT, se probaron dos contenidos de medio de cultivo (300 y 500 ml). El experimento se realizó por triplicado. El periodo de evaluación de las plantas crecidas en los BIT fue de tres semanas y se empleó como referente, los datos de las pantas generadas en el sistema de cultivo en medio semisólido.

Medición de variables cualitativas y cuantitativas: Se determinó número de brotes, número de hojas, longitud del explante, longitud de raíz, peso fresco y peso seco. Para la medición de la masa seca se colocaron los explantes en una estufa con sistema al vacío a 50 ° C durante 24 horas.

Aclimatación a condiciones de invernadero: las microplantas generadas en los BIT, se retiraron y se lavaron con agua destilada, luego las raíces fueron sumergidas en una solución fungicida comercial (Binolate®) y en una solución con antibióticos (Amoxicilina 400 mg/ 5 mL y ácido Clavulanico 37 mg/ 5 mL)[17], posterior a este procedimiento las plántulas fueron sembradas en sustrato peatmoss® y agrolita® manteniendo una humedad relativa entre 60 y 70 %. El periodo en que las plantas se evaluaron en condiciones de invernadero fue de 90 días, tiempo en que se tomaron datos de sobrevivencia.

Análisis estadístico

Para todo el experimento se calcularon los promedios y desviación estándar de los datos de las plantas. Los datos se analizaron mediante un ANOVA y para establecer diferencias entre los tratamientos se aplicó una prueba de tukey empleando el software estadístico JMP 10.0.

RESULTADOS



(A) (B) (C) (D) (E)

Figura 2. Aspecto de los cultivos de *S. rebaudiana* Bertoni en medios semisólidos (A-C) y en los sistemas BIT (D-E). Plantas en frascos tipo Gerber (A), en caja magenta (B), aspecto de la raíz verdosa (C), cultivos en BIT al inicio del cultivo (D), al final del cultivo (E)

Mantenimiento y multiplicación de plántulas en medio semi-sólido: se realizaron tres subcultivos y se observó crecimiento de las plantas limitado por la falta de espacio en los frascos (Figura 2A), coloración verdosa y formación de raíz. Sin embargo, las raíces también presentaron coloración verdosa (Figura 2C), lo que posiblemente está dado por la presencia de clorofilas. Este comportamiento es indeseable en el cultivo *in vitro*, debido a que se convierte en un factor limitante en el momento de hacer la aclimatación de las plantas. Para facilitar el crecimiento y la elongación de los explantes, se ensayaron cajas magenta. En este recipiente, se observó un aumento en el tamaño de las plántulas, debido a que las cajas magenta tienen una altura mayor que los frascos gerber, pero se observó el mismo fenómeno de coloración verdosa en las raíces (Figura 2B).

Sistema de Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT): la figura 2 (C,D), muestra el aspecto de los cultivos de Stevia en los sistemas BIT, al inicio y al final del cultivo. Se puede observar que las plantas

presentan un desarrollo vigoroso, con tallos más robustos que los de las plantas obtenidas en los medio semisólidos y las raíces no presentaron la coloración verdosa.

Evaluación de volumen de cultivo:

Los resultados mostraron que las plantas obtenidas en el BIT, en ambos volúmenes ensayados, presentaron una tasa de multiplicación hasta cuatro veces superior a la obtenida en el sistema semisólido (Tabla 1). No se observaron diferencias en la altura de las plantas entre los dos sistemas, pero la longitud de las raíces en los BIT operados con 500 ml, llegó a ser hasta 2 veces superior a la de las plantas de los sistemas semisólidos, sin embargo no se observaron diferencias significativa con el volumen de 300 ml. Por otra parte, las plantas obtenidas en los BIT, solo tardan 21 días en crecer y formar raíces, en comparación a los 60 días que se demoran las plantas en desarrollarse en medio semi-sólido. El número de hojas producidas por las plantas en el sistema BIT con 300 mL, alcanzó el valor más alto (18 hojas) y fue 2.2 veces mejor al obtenido en medio semisólido y 1.8 veces mayor al obtenido usando 500 mL en los BIT. Finalmente la cantidad de masa fresca y seca obtenida en el BIT fue superior a la generada en medio semisólido.

En cuanto a las características de desarrollo de la plantas, la longitud de las plántulas obtenidas en este trabajo con el sistema BIT, resultaron 3 veces mayor a las obtenidas en los RITA® por Jiménez Quesada[1]. A pesar de haber una mejora en el crecimiento y desarrollo de la planta de Stevia en el sistema BIT, la tasa de multiplicación (5.13) resultó inferior a la reportada por otros autores en medios semisólidos[21,22,23]. En estudios futuros se deberá mejorar la tasa de multiplicación de las plantas.

Tabla 1: Parámetros de desarrollo de la planta *Stevia rebaudiana* Bertoni en medio semi-sólido y diferentes volúmenes de medio líquido.

Sistema	No. Brotes	Longitud Plántula (cm)	Longitud raíz (cm)	No. Hojas	Peso fresco (gr)	Peso seco (gr)
medio Semisólido	1,22±0,90b	11,66±1,21a	2,83±0,57b	8,0±1,47b	0,06±0,10b	0,007±0,010c
BIT 500 mL	3,9±0,42a	13,0±1,19a	4,9±0,43a	10,3±1,03b	0,9±0,08a	0,12±0,01a
BIT 300 mL	5,13±1,04a	14,0± 0,80a	4,2±0,36ab	18,0±1,32 a	0,8±0,10a	0,08±0,01b

Las letras desiguales en cada columna indican que existe diferencia significativa. $p \leq 0.05$

Aclimatación: Después de 90 días en condiciones de invernadero se observó una supervivencia del 100 % de las plantas provenientes de los sistemas BIT.

DISCUSIÓN

Dado a los resultados observados en los BIT se puede inferir que estos permiten un intercambio de gases, como el CO_2 y etileno, los cuales se volatilizan una vez que se realiza la inyección de aire para llevar a cabo la inmersión de los explantes, proceso que no se presenta en los medios semisólidos en los frascos o cajas Magenta cerrados[14,15]. Por otra parte es importante considerar el número de hojas como un factor limitante en el almacenamiento de los metabolitos de interés. Ceune y Geuns, 2013 [18], reportan que entre mayor es el área foliar de Stevia, mayor es la acumulación de glucósido de esteviol. Berthouly y Etiennen, 2005 [19], señalan que el volumen de medio por explante empleado en los BIT es

uno de los factores importantes que se tiene que evaluar para un uso eficiente y efectivo a la hora de micropropagar en estos sistemas. En este trabajo, se utilizó un volumen de 300 mL, con 10 explantes, lo que da una relación de 30 mL/explante, valor similar al que reporta Jiménez Quesada, 2011[1]. Quien empleó RITA® con plántulas de Stevia una relación de 25 mL/explante. Para otras especies, como el plátano vianda se ha reportado una relación optima 60 mL/explante[20], lo que representa un valor mucho mayor al obtenido en este trabajo.

CONCLUSIONES

Se estableció un BIT donde se logró propagar plántulas de Stevia con buenas características morfológicas, lo cual permitió una adaptabilidad del 100 % en condiciones de invernadero. Con fines de mejorar el sistema y reducir costos operativos, se sugiere emplear un volumen de 300 mL de medio de cultivo para la micropropagación.

AGRADECIMIENTOS

Al Programa de Cooperación Técnica y Científica entre México y Costa Rica 2014-2015" proyecto Incremento de las capacidades Biotecnológicas de México y Costa Rica, para el desarrollo de cultivos vegetales (Secretaria de Relaciones Exteriores). A la Secretaria de Investigación y Posgrado del IPN (SIP-20150061).

REFERENCIAS

[1]. Jiménez Quesada K. M. (2011) Evaluación del desarrollo *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni con el empleo de sistemas de propagación semi-sólido, inmersión temporal RITA y Biorreacto de burbujeo. Informe final para optener titulo de Bachiller en Ingieneria en Biotecnolgia. Instituto Tecnologico de Costa Rica p: 1-90.

[2]. Soliman I., A .,H. (2013) Micropropagation of *Stevia rebaudiana* Betroni and assessment of genetic stability of *in vitro* regenerated plants using inter simple sequence repeat (ISSR) marker. *Archives Des Sciences* 66(3): 343–59.

[3]. De Carvalho VM, Marochio CA, Mangolin CA, Pires da Silva Machado M de F. (2011) The use of esterase polymorphism for analysis of the genetic diversity and structure of stevia (*Stevia rebaudiana* Bert . Bertoni) populations. *Biochem Syst Ecol* 39 (4-6): 594–9.

[4]. El-zaidy M, Zayed M, Alharbi S, Doaigey A, Al Sahli A, Ammar R. (2014) Micropropagation of Seven *Stevia rebaudiana* Bert . Genotypes Via Adult Leaf Explants. *J Pure Appl Microbiol* 8(2): 1289–98.

[5]. Escobar- Medez F de M, Hermandez, Saravia .,R.,A.(2012) Extracción de un edulcorante naturla no calorico a escale de laboratorio a partir de "*Stevia rebaudiana* Bertoni" y su aplicación en la industria de alimentos. Tesis para optar titulo de Ingenieria de alimentos). Universidad del el Salvador p: 1-200.

[6]. Herrera Cedano F, Gómez Jaines R, Gonzáles Rivas C. (2012) El Cultivo de Stevia (*Stevia rebaudiana*) Bertoni en condiciones agroambientales de Nayarit, México. Nayarit, Mexico p:1-52.

[7]. Goyal ,S.,K, Goyal, R.,K. (2010) Stevia (*Stevia rebaudiana*) a bio-sweetener : a review. *Internacional Journal of Food Sciences and Nutrition* 61: 1–10.

[8]. Anbazhagan M, Kalpana M, Rajendran R, Natarajan V, Dhanavel D.(2010) *In vitro* production of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Emirates Journal Food Agriculture* 22(3): 216–22.

[9]. Gantait S, Das A, Mandal N.(2014) Stevia: A Comprehensive Review on Ethnopharmacological Properties and *in vitro* Regeneration. *Sugar Tech* 17(2): 95–106.

[10].Vázquez-Baxcajay L (2012) Cultivo in vitro de *Stevia rebaudiana* Bertoni. Tesis de maestria en ciencias. Colegio de Posgraduados, Montecillo,Texcoco, Edo. México pp. 1-87.

[11]. Shahid Akba K, Roshan Z, Nisar A. (2014) Selection of suitable propagation method for consistent plantlets production in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *Saudi Journal of Biological Sciences*.King Saud University.

[12]. Das ,A., Gantait, S., Mandal, N. (2011) Microprppagation of an Elite Medicinal Plant: *Stevia rebaudiana* Bert. *Inrtenational Journal of Agricultural Research* 6(1) :40–8.

[13]. Dey A, Kundu S, Bandyopadhyay A, Bhattacharjee. (2013) A efficient micropropagation and chlorocholine chloride induced stevioside production of *Stevia rebaudiana* Bertoni.*Comptes Rendus Biologies*. Academie des sciences 336(1): 17-28.

[14]. Aragón CE, Escalona M, Capote I, Cejas I, Rodríguez R, Sandoval J. (2006) Aspectos metabólicos del crecimiento y desarrollo de las plántulas de plátano (cemsa ¾) micropropagadas en Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT). *Cultivol Tropicales* 27:39–44.

[15]. Escalona, M., Samson, G., Borroto, C., Desjardins ,Y.(2003) Physiology of effects of temporary immersion bioreactors on micropropagated pineapple plantlets. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 39(6):651–6.

[16]. Mohamed ,R.,.A., AA.(2011) Micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni. A New Sweetening Crop in Egypt. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry* 6(4):178–82.

[17]. Vargas, Gutierrez .,L. (2012) Propagación y adaptación *ex vitro* de plantas de *Stevia sp*. Tesis para optener titulo de Técnico Superior en Quimica Área Biotecnologia. Universidad Tecnológica de Xicotepec de Juárez p: 1-51

[18]. Ceunen ,S., Geuns, J.,M.,C. (2013) Influence of photoperiodism on the spatio-temporal accumulation of steviol glycosides in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *Plant Science* 198: 72-82

[19]. Berthouly, M., Etienne H. (2005)Temporary immersion systems: a new concept for use liquid medium in mass propagation. In: K H-EA, W. P, editors. Liquid Culture Systems for *in vitro* Plant Propagation p. 165–95.

[20].Pérez, M.,B, Vega, V.,M, Delgado, M.,T, Torres, J.,L, Pino, A.,S, Cabrera, A.,R (2013). Nueva alternativa para la micropropagación en inmersión temporal del cultivar de plátano vianda " INIVITPV -2011 "(AAB) New alternative for micropropagation in temporary immersion system of plantain cultivar " INIVITPV -2011 " (AAB). *Revista Colombianade Biotecnologia* XV(1):98–107.

[21]. Ali A, Gull I, Naz S, Afghan S.(2010) Biochemical Investigation During Different Stages of *in vitro* Propagation of *Stevia Rebaudiana.Pakistan Journal of Biological Sciences* 42(4): 2827–37.

[22]. Chotikadachanarong K, Dheeranupattana S.(2013) Micropropagatin and Acclimatization of St*evia rebaudiana* Bertoni. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 16(17):887–90.

[23]. Shatnawi M a., Shibli R a., Abu-Romman SM, Al-Mazra'awi MS, Al Ajlouni ZI, Shatanawi W a & Odeh W H (2011). Clonal propagation and cryogenic storage of the medicinal plant *Stevia rebaudiana*. *Spanish Journal of Agricultural Research* 9(1): 213–20.

MALDI-TOF MASS SPECTROMETRY IDENTIFICATION OF SECONDARY METABOLITES AND SECRETED ENZYMES DURING *Colletotrichum gloesporoides* INTERACTION WITH *Trichoderma* SPECIES: A PROPOSAL.

Diana Andrea Arroyo Moreno[a]*, Andrea Gutiérrez-Santa Ana[b], Gloria Macedo-Raygoza[c], Aurora Huerta-Valle[d], Miguel J. Beltrán García[e].

[a] Universidad Autónoma de Guadalajara. Av Patria 1201, Lomas del Valle, 45129 Zapopan, JAL.

*Autor que presentó.
+Autor para correspondencia: mbeltran71@hotmail.com

Área del Conocimiento: Agrobiotecnología

ABSTRACT
The genus *Colletotrichum* comprises a series of fungal plant pathogens that cause higher economic losses in fruits and some economically important plants. *Trichoderma* genus has been extensively studied as a biological control against some fungal pathogens and recently as plant growth promoter. The antagonistic mechanism as *Trichoderma* works are: competition by nutrients, antibiotics production and mycoparasitism. We have isolated some *Trichoderma* species of with special features for controlling fungal pathogens and have selected one strain of *C. gloesporoides* from soil. We want to study what kinds of metabolites are secreted by *Trichoderma* using inactivated *C. gloesporoides* mycelium as a source of nutrient and of course the active mycelium. Also we are interested to know the active metabolites secreted by the pathogen in response to the presence of their antagonist. Such studies will help us to predict pathways that pathogen could use to break the *Trichoderma* antagonism. We expect a secretion of degradative enzymes of the cell wall, (chitinases, glucanases and proteases). The secretome analysis with 2-D electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry will be used to identify secreted proteins and related metabolites to suppress *C. gloesporoides* growth. During the congress we shown the results obtained after the interaction between fungus, their growth and the antagonistic activities.

Keywords*: Biological control; Trichoderma; Enzymes; Secondary metabolites; Colletotrichum.*

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

EFFECT OF THE SALICYLIC ACID IN THE BROCCOLI (*Brassica oleracea* var. *italica*) SEEDLINGS PRODUCTION

[Efecto del ácido salicílico en la producción de plántula de brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica*)]

Arlet Torres Chimes[a*], Luis Patricio Guevara Acevedo[b+] Francisco Cervantes Ortiz[b], Julio Cesar León Vargas[c], Enrique Andrio Enriquez[b], Hugo Cesar Cisneros López[b], Daniel Rodríguez Mercado[b].

[a] Estudiante de Ingeniería en Agronomía, Instituto Tecnológico de Roque
[b] Instituto Tecnológico de Roque. Departamento de Ciencias Agropecuarias
[c] Estudiante de Ingeniería en Innovación Agrícola Sustentable. Instituto Tecnológico de Roque

*Autor que presentó.
+Autor para correspondencia: lpguevara@itroque.edu.mx

Área del Conocimiento: Agrobiotecnología

ABSTRACT
Guanajuato state is the main broccoli producer, all the production of this crop is done through the planting system, one of the problems the farmers face is losses during the transplant due to stress plants suffer on this process. The application of salicylic acid (AS) increases plant resistant to biotic and abiotic stress, therefore the objective of this investigation was to evaluate the effect of foliar applications of AS on broccoli seedlings, to do that the variety Avenger was sown on polyethylene trays of 338 cavities and 7.5mL of capacity and kept in the greenhouse for eight days, after that the treatments application started in a completely randomized design with 10 repetitions. AS doses applications of 10^{-4}, 10^{-5} y 10^{-6} µM were made manually every 8 days during 4 weeks, one tray was used for each treatment. The variables evaluated were: plant length, stem length, root length, stem diameter, fresh weight, chlorophyll content, dry weight and biomass. Evaluations were made twice a week. AS applications at doses of 10^{-6} µM every eight days on broccoli seedlings increased plant length, stem length, root length, stem diameter, chlorophyll content, fresh weight and biomass.

Keywords: Salicylic acid, seedlings, broccoli, plant length

RESUMEN
El estado de Guanajuato es el principal productor de brócoli (*Brassica oleracea* var. *itálica*), este cultivo en su totalidad se produce bajo el sistema de plantación, uno de los problemas que tienen los productores es la perdida en el trasplante, debido al estrés que sufren las plantas al momento de realizarlo. La aplicación de ácido salicílico (AS) incrementa la resistencia de las plantas al estrés biótico y abiótico, es por ello que el objetivo de la presente investigación es evaluar el efecto de aplicaciones foliares de AS en plántulas de brócoli, para ello se sembró la variedad Avenger en charolas de polietileno de 338 cavidades y 7.5 mL de capacidad, a los ocho días posteriores a la inserción de las charolas en el

invernadero se realizó la aplicación de los tratamientos en un diseño completamente al azar con 10 repeticiones y un testigo al que solamente se le aplico adherente, la unidad experimental consistió en una planta, la aplicación con AS a dosis de 10^{-4}, 10^{-5} y 10^{-6} µM con 1% de adherente (Bionex®) se realizó de forma manual cada 8 días por espacio de 4 semanas, se utilizó una charola para cada tratamiento. Las variables evaluadas fueron: longitud total de planta, longitud de tallo, longitud de raíz, diámetro de tallo, peso fresco, clorofila y peso seco, las variables longitud total de planta, longitud de tallo, longitud de raíz. Las evaluaciones se realizaron dos veces por semana. Aplicaciones de ácido salicílico a dosis de 10-6 µM cada ocho días en plántulas de brócoli, aumentan la altura de planta, longitud de tallo, longitud de raíz, diámetro de tallo, contenido de clorofila, peso fresco y biomasa.

Palabras Clave: Ácido salicílico, plántula, brócoli, longitud

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, la producción de algunas hortalizas ha cambiado de una agricultura tradicional (siembra directa) a una agricultura desarrollada, basada en el trasplante de plántulas producidas en invernadero mediante el uso de charolas con alvéolos rellenos con turbas *Sphagnum* (peat most) como sustrato [1]. En México, uno de los cultivos hortícolas donde se requiere en su totalidad del sistema de producción de plántulas en charolas para trasplante es el brócoli (*Brassica oleracea* var. *itálica*) [2], debido principalmente a que se utiliza semilla híbrida de alto costo. En el ciclo otoño-invierno 2014 se sembraron 15,870 ha y el estado de Guanajuato aporto más del 70% con 11,209 ha [3].

Para el mayor establecimiento posterior al trasplante y después obtener el máximo rendimiento en campo, es necesario tener una plántula de calidad, al respecto se han realizado investigaciones y se ha demostrado que entre otros parámetros se considera la acumulación de materia seca como importante indicador de calidad en plántulas [4, 5, 6, 1]. Los factores que intervienen durante la producción de plántula tales como la fertilización, el riego, el control de plagas y enfermedades, pueden influenciar su calidad y recuperación después del trasplante [7, 5]. Para que las plántulas puedan superar el choque de adaptación en el trasplante depende de cómo las plántulas soportan los cambios estructurales y funcionales de la raíz, de la capacidad radicular de absorción de agua y nutrientes, y de la capacidad de regeneración de nuevas raíces.

El estrés de las plántulas es debida principalmente a factores abióticos, el uso de mecanismos de defensa en plantas, particularmente la expresión y regulación de la resistencia de amplio espectro asociada al fenómeno ISR (resistencia sistémica inducida) y SAR (resistencia sistémica adquirida), puede funcionar como una alternativa viable para el diseño de estrategias en la producción hortícola.

Por otro lado, los elicitores son moléculas que inducen la respuesta de protección en las plantas ante cualquier tipo de estrés [8, 9, 10,11] Además, se ha observado que las plantas tratadas con elicitores generalmente desarrollan resistencia en el hospedero a estrés abiotico, debido a que la aplicación de estos sobre la superficie de la planta activa múltiples vías de señalización de defensa intracelular [11, 12, 13, 14]. Dentro de los elicitores bióticos, además de algunos microorganismos y los extractos de los

mismos empleados comúnmente, es posible considerar moléculas que actúan como señales endógenas en los mecanismos de defensa de las plantas, tales como el ácido salicílico (AS) y el ácido jasmónico entre otro [15].

El AS se encuentra de forma natural en las plantas, juega papeles importantes en cuanto al crecimiento y tolerancia al estrés [16,17,18], además de participar como parte de las señales internas que regulan la respuesta de la defensa de las plantas contra plagas y patógenos [19, 20] y abióticas [21, 17, 22]. Al aplicarlo en forma exógena, el AS induce tolerancia al estrés, mejorando la respuesta biológica de la planta frente los cambios extremos de temperatura, modificando además las concentraciones de antioxidantes , nutrientes y clorofila [23, 24].

Por lo anteriormente expuesto, el objetivo de la investigación fue evaluar el efecto aplicaciones de ácido salicílico en plántulas de brócoli (*Brassica oleracea* var. *itálica*)

METODOLOGÍA

La investigación se desarrolló en el mes de octubre de 2014, en un microtunel de producción comercial de plántulas de brócoli (*Brassica oleracea* var. *itálica*) con riego por aspersión. Para la siembra del material vegetal en estudio se utilizó la variedad Avenger (Sakata®), en charolas de polietileno de 338 cavidades y 7.5 mL de capacidad que previamente fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio a 300 ppm y llenadas con *Canadian sphagnum* (Growing Mix Sungro®) y perlita a relación 2:1, se colocó una semilla por cavidad de forma manual, se estivaron y se cubrieron con plástico colocandolas en una cuarto de germinación a una temperatura de 20-25 °C y 85-90% HR, con oscuridad total, a los dos días posteriores a la siembra, se destaparon y se cubrió la semilla con vermiculita y se trasportaron al microtunel y colocadas al azar en carriles de 32 charolas. A los ocho días posteriores a la inserción de las charolas en el microtunel se realizó la aplicación los tratamientos en un diseño completamente al azar con 10 repeticiones y un testigo al que solamente se le aplico agua y adherente, la unidad experimental consistió en una planta, la aplicación de los tratamientos con ácido salicílico a dosis de 10^{-4}, 10^{-5} y 10^{-6} µM y 1% de adherente (Bionex®) se realizó de forma manual con una aspersora de 10 L (Trupper®), la aplicación se realizó cada ocho días por espacio de cuatro semanas, se utilizó una charola para cada tratamiento, debido a que las variables evaluadas se utilizó un muestreo destructivo. Para el cálculo de las dosis de ácido salicílico a evaluar, se preparó una solución madre de 1000 µM en 1L de agua y agitado durante 12 h.

Las charolas se regaron diario mediante un sistema de riego por aspersión, la fertilización foliar se realizó cada tercer día alternando: 43-12-43 a 27.7 ppm y 36.36 ppm de 16-16-16 con 9.09 ppm Raizal (GBM®).

Las variables evaluadas fueron: longitud total de planta, longitud de tallo, longitud de raíz, diámetro de tallo, peso fresco, clorofila y peso seco, las variables longitud total de planta, longitud de tallo, longitud de raíz. Las evaluaciones se realizaron dos veces por semana. Para evaluación de las variables de cada tratamiento, a cada charola se le dio un riego ligero para facilitar la extracción del cepellón, la extracción se realizó al azar, sacando 10 plantas por tratamiento y etiquetadas, posteriormente se lavó el cepellón

para eliminar el sustrato y se colocaron en servilletas de papel y se procedió a pesar la totalidad de la planta en una balanza analítica (ADAM®), después de realizado el pesado se procedió a medir el diámetro de tallo con ayuda de un vernier digital (Trupper®), posteriormente se midió la longitud total de la planta, longitud de tallo y longitud de raíz, con ayuda de una regla graduada; realizado esto se envolvieron en servilletas de papel y se colocaron en una estufa con recirculación forzada de aire (Felisa®) a una temperatura de 70 °C durante 96 h, cumplido ese tiempo se procedió a pesarlas. El contenido de clorofila se determinó cada 8 días mediante un medidor de clorofila (Minolta SPAD 502) a las 12:00 h, para ello se eligieron 10 plantas al azar y a cada planta 2 hojas.

Con los resultados de la longitud total, longitud de tallo, longitud de raí, diámetro de tallo, contenido de clorofila, peso fresco, peso seco y biomasa se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con 10 tratamientos y un testigo para indicar las diferencias entre los tratamientos con aplicaciones de AS. Cuando el ANOVA indico la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos, se aplicó la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) para la separación de medías. Para el análisis estadístico se utilizó el programa SAS system [26].

RESULTADOS

Las determinaciones registradas en las variables evaluadas en plántulas de brócoli, permiten señalar responden de manera significativa a los tratamientos de AS. Los efectos del AS fueron detectados durante cuatro semanas de aspersiones.

En la Tabla 1 se presentan los resultados del el efecto de la aplicación de AS y los periodos de muestreo en las variables evaluadas en plántulas de brócoli, muestran que la aplicación de AS fue altamente significativo en longitud total, longitud de tallo, y diámetro de tallo, así mismo el periodo de muestreo fue altamente significativo para todas las variables en estudio; el efecto del AS en la longitud de raíz fue significativa y en la interacción de los muestreos y los tratamientos con ácido salicílico fueron altamente significativos para la longitud total.

El mayor coeficiente de determinación se observó en la variable de longitud total con 0.91 y el menor observado fue en diámetro de tallo con 0.79; el coeficiente de variación para las variables descritas fue de 7.79 a 18.6%.

Tabla 1. Efecto de la aplicación de ácido salicílico en longitud total, longitud de tallo, longitud de raíz y diámetro de tallo en plántula de brócoli, evaluadas durante cuatro semanas.

Fuente	GL[1]	Cuadrado Medio			
		Longitud Total	Longitud de Tallo	Longitud de Raíz	Diámetro de Tallo
Muestreo	5	268.14**	1.85**	74.71**	0.370**
Rep[2]	54	1.15	0.026	0.89	0.005
Trat[3]	3	53.07**	4.44**	22.97*	0.490**
Mue[4]*Trat[3]	15	4.49**	0.063	1.85	0.017
EE[5]	162	0.94	0.026	0.7	0.006
Total	239	-	-	-	-
R2[6]	-	0.91	0.85	0.81	0.79
CV[7]	-	7.44	11.48	12.22	6.31

[1]Grados de Libertad, [2]Repeticiones, [3]Tratamuentos, [4]Muestreos, [5]Error Experimental, [6]Indicede determinación, [7]Coeficiente de Variación

En el Tabla 2 se muestra el efecto de las aplicaciones de ácido salicílico en cuatro semanas de muestreo en plántulas de brócoli, observando que el efecto de los tratamientos en el contenido de clorofila fue altamente significativos, así mismo el periodo de muestreo para todas las variables; en peso fresco y biomasa fue significativo. Para el peso seco no se observaron diferencias, mientras que para la interacción de los muestreos y tratamientos fueron altamente significativos para las variables de clorofila, peso fresco y biomasa. El coeficiente de determinación mayor se observó en la variable de peso seco con 0.91 y el menor en clorofila con 0.79. El coeficiente de variación para las variables en estudio fue de 10.86 a 21.03.

Tabla 2. Efecto de la aplicación de ácido salicílico en longitud total, longitud de tallo, longitud de raíz y diámetro de tallo en plántula de brócoli (*Brassica oleracea* var. *itálica*), evaluadas durante cuatro semanas.

Fuente	GL[1]	Clorofila	Peso Fresco	Peso Seco	Biomasa
Muestreo	5	694.38**	2.33**	0.046**	1.87**
Rep[2]	54	16.11	0.012	0.00015	0.012
Trat[3]	3	728.06**	0.085*	0.000053[ns]	0.089*
Mue[4]*Trat[3]	15	72.19**	0.17**	0.000430	0.160**
EE[5]	162	12.13	0.013	0.000130	0.0132
Total	239				
R2[6]		0.79	0.87	0.91	0.85
CV[7]		10.86	18.6	16.33	21.03

[1]Grados de Libertad, [2]Repeticiones, [3]Tratamuentos, [4]Muestreos, [5]Error Experimental, [6]Indicede determinación, [7]Coeficiente de Variación

En la Tabla 3 se presentan los resultados obtenidos del efecto de AS en la longitud total, longitud de tallo, longitud de raíz y diámetro de tallo de plántulas de brócoli en comparación con el testigo.

Para longitud total el patrón de respuesta fue suficientemente claro; las altas concentraciones de 10^{-6} y 10^{-5} µM promovieron su desarrollo, el incremento fue de más del 16% en comparación con el testigo, en tanto que la concentración con 10^{-4} µM fue 11.19% en comparación con el testigo.

En tanto la longitud del tallo se incrementó por efecto del AS 50.44 % con la dosis de 10^{-6} µM con respecto al testigo, esto es, 1.13 cm del testigo a 1.70 cm del tratado, con una diferencia de 57 mm. Mientras que a dosis de 10-5 y 10-4 µM la longitud de tallo fue de 1.57 y 1.22 cm con una diferencia con el testigo de 38.93 y 7.96 % respectivamente.

Para la variable de longitud de raíz el efecto de AS se observó en la dosis de 10^{-6} µM con respecto a la dosis de 10^{-5}, 10^{-6} µM y al testigo con un incremento mayor de 18.80%.

El diámetro de tallo presentó un incremento de 17.79% a dosis de 10^{-6} µM de AS con respecto al testigo, esto es, de 1.18 cm del testigo a 1.39 cm del tratamiento, con una diferencia de 21 mm. Mientras que las dosis de 10^{-5} y 10^{-4} µM presentaran valores similares con 1.26 y 1.24 cm y diferencia con respecto al testigo de 6.77 y 5.08 % respectivamente.

Tabla 3. Efecto de diferentes concentraciones de ácido salicílico en plántulas de brócoli (*Brassica oleracea* var. *Itálica)* aplicado cada ocho días por cuatro semanas.

No Trat[1]	Trat[1]	Longitud total (cm)	Longitud de tallo (cm)	Longitud de raíz (cm)	Diámetro de tallo (cm)
3	10^{-6} µM	13.77 a	1.705 a	7.77 a	1.39 a
2	10^{-5} µM	13.6 a	1.57 b	6.54 b	1.26 b
1	10^{-4} µM	13.01 b	1.22 c	6.67 b	1.24 b
0	Testigo	11.7 c	1.13 d	6.44 b	1.18 c

[1]Tratamuentos

El efecto de las aplicaciones AS en las variables de clorofila, peso fresco, peso seco y biomas de plántulas de brócoli se muestran en el Tabla 4.

Para el contenido de clorofila (unidades SPAND), peso fresco y biomasa, todos los tratamientos con AS superaron al testigo, en el contenido de clorofila los tratamientos superaron en más del 26.02 % al testigo, para peso fresco 12.50 % y para la biomasa en 16.66 %.

Las aplicaciones de AS sobre plántulas de brócoli no tuvieron efecto en peso fresco, esto es, de 0.070 g en el testigo a 0.071 g en la dosis de 10^{-6} µM.

Tabla 4. Efecto de diferentes concentraciones de ácido salicílico en plántulas de brócoli (*Brassica oleracea* var. *Itálica)* aplicado cada ocho días por cuatro semanas.

No Trat[1]	Trat[1]	Clorofila (unidades SPAND)	Peso fresco (g)	Peso seco (g)	Biomasa (g)
3	10^{-6} µM	0.63 a	0.63 a	0.071 a	0.56 a
2	10^{-5} µM	0.64 a	0.64 a	0.071 a	0.57 a
1	10^{-4} µM	0.63 a	0.63 a	0.070 a	0.56 a
0	Testigo	0.56 b	0.56 b	0.070 a	0.48 b

[1]Tratamuentos

DISCUSIONES

Los resultados que se presentan del efecto del AS en brócoli, permite confirmar que este regulador del crecimiento tiene impacto en la longitud total de la planta, longitud del tallo, longitud de raíz, diámetro de tallo, contenido de clorofila, peso fresco y biomasa, estos resultados coinciden con los reportados por Guzmán *et al.* [27], quienes reportan variaciones significativas en la altura, diámetro de tallo y área foliar entre tratamientos y días de evaluación de plantas de plántulas de chile habanero por efecto de ácido salicílico y nutrición mineral.

La aplicación de AS afecto positivamente la longitud total de las plántulas de brócoli a dosis de 10^{-6} y 10^{-5} µM en más del 16%, este efecto ha sido observado en plántulas de tomate con incremento de 14% con aplicaciones de 10^{-6} M [28], por lo que los datos reportados en el presente estudio demuestran la sensibilidad de los tejidos en el estado vegetativo a concentraciones bajas de AS asperjado. Es de mucho interés el considerar que los niveles endógenos básicos de AS en los tejidos de brócoli son menores a 0.02 µM g^{-1} de peso freso [29] y coinciden con los reportados por Quiroz-Figueroa *et al.* [30] y Echevarría-Machado *et al*. [30], que mencionan que para plántulas de tomate las concentraciones asperjadas que han sido reportadas son del orden de nanomoles o menores; lo que indica que posiblemente existe un receptor que magnifica su efecto o que un pequeño umbral dispara la cascada de efectos que se han venido reportando [28], las modificaciones tenidas en el crecimiento se deben a que el ácido salicílico fomenta la producción de ácido indolacético y de ácido naftalenacético que son reportados como los principales reguladores de crecimiento vegetal [31].

La longitud de raíz se incrementó 18.8 % con cuatro aplicaciones de AS de 10^{-6} µM en comparación al testigo, estos resultados son inferiores a los reportados por Larqué-Saavedra *et al.* [28] en plántulas de tomate con aplicaciones de AS con concentraciones de 1.0 mM se incrementaron 43 % en comparación con el control, pero son superiores a los reportados por Ramírez *et al.* [32] y Guzman *et al*. [27] quienes no observaron diferencias entre los tratamientos con AS y el control en plántulas de brócoli y chile habanero a dosis de 10^{-6} M y 10^{-8} M respectivamente. La mayor parte de los autores consultados indicaron que el efecto del AS es positivo sobre el crecimiento de las raíces [33,16], sin embargo en algunos estudios como el de Lian *et al*. [34] encontraron efectos negativos sobre la biomasa de raíz en

algunas de las concentraciones de AS aplicado, indicando los autores como causa probable del resultado una mayor derivación del presupuesto energético de la raíz a respuestas de defensa inducidas por el AS

El efecto de las aplicaciones de AS en el diámetro de tallo se incrementó en 17.79% a dosis de 10^{-6} µM, estos resultados son superiores a los reportados a los reportados por Ramírez *et al*. [25] y Guzmán *et al*. [26] quienes no observaron diferencias en el diámetro de tallo entre los tratamientos con AS y el control en plántulas de brócoli y chile habanero a dosis de 10^{-6} M y 10^{-8} M respectivamente, pero inferiores a las reportadas por Casierra-Posada [35] quienes reportan diferencias de 24.20% en diámetro de tallo de plántulas de brócoli crecidas bajo coberturas de color azul y el testigo.

Las aplicaciones de AS a las concentraciones en estudio en plántulas de brócoli tuvieron efectos similares en el contenido de clorofila, peso fresco y biomas. El aumento del contenido de clorofila por las aplicaciones foliares de AS puede pueden disminuir los efectos dañinos por parte de algunos tipos de estrés incrementando el contenido de clorofila y la actividad fotosintética. Se sabe que ocurre un incremento de clorofila durante el crecimiento de las plantas. En este estudio el contenido de clorofila incrementó como respuesta al incremento en la concentración de AS. Yildirim *et al*. [36] encontraron resultados similares, el mayor contenido de clorofila se encontró con 1.0 mM de AS en hojas de pepino. Khodary [33] encontró que en hojas de maíz los tratamientos de AS incrementaron los contenidos de clorofila a, b y carotenoides en condiciones de estrés salino.

El peso fresco se incrementó en más del 12.5% con AS, estos valores son superiores a los reportados por Ramírez *et al*. [25] y Guzmán *et al*. [26] quienes no observaron diferencias en el peso fresco entre los tratamientos con AS y el control en plántulas de brócoli y chile habanero a dosis de 10^{-6} M y 10^{-8} M respectivamente. De igual manera Casasola [37] (2012) reporta que no observó diferencias entre el testigo y la aplicación de 0.1 mM de AS a plantas de lechuga.

Las aplicaciones de AS no tuvieron efecto en el peso seco de las plántulas de brócoli, estos resultados son inferiores a los reportados por Casasola [37] quien reporta incrementos de 10% en el peso seco de plantas de lechuga con aplicaciones de AS a 0.1 mM.

CONCLUSIONES

Aplicaciones de ácido salicílico a dosis de 10-6 µM cada ocho días en plántulas de brócoli, aumentan la altura de planta, longitud de tallo, longitud de raíz, diámetro de tallo, contenido de clorofila, peso fresco y biomasa.

Los resultados positivos del presente estudio fortalecen la hipótesis básica de que una planta con mayor altura, raíz más desarrollada, mayor diámetro de tallo y contenido de clorofila pueda ser más eficiente en la toma de nutrientes y agua y desarrollar un mayor dosel. Se debe esperar que al momento del trasplante la planta resista el efecto del estrés de plantación.

REFERENCIAS

[1] Muñoz-Ramos, J. J. 2004. Producción de plántula. pp. 207-230. *In:* Castellanos, J.Z. (ed.). Manual de producción hortícola en invernadero. 2da edición. Instituto para la Innovación Tecnológica en la Agricultura. Celaya, Guanajuato, México

[2] Díaz P. J. C, D M Granberry, P Germishuizen. 2008. Transplat growth and stand establishment of bell Pepper (*Campsicum anum* L.) plants as effected by compost-amended substrate. Acta Horticulturae 782: 223-228.

[3] Momirovic N, M. Misovic, R Cvetkovic. 2000. Effect of different substrates on sweet pepper (*Capsicum annum* L. cv. Macvanka) transplants quality in organic farming production. Acta Horticulturae 533:135-139.

[4] SIAP. 2015. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2010. Anuario estadístico de la producción agrícola. Disponible en: http://www.siap.gob.mx.

[5] Guzman M, A Sánchez. 2003. Influence of nitrate and calcium increments on development, growth and early yield in sweet pepper plants. Acta Horticulturae 609:207-211.

[6] De Gracia J, P A Tittonell, A Chiesa. 2008. Nitrogen fertilization methods affect growth of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) transplants. Acta Horticulturae 782: 193-199.

[7] Noordegraaf C, V. 1994. Production and marketing of high quality plants. Acta Horticulturae 353:134-148

[8] Ozeretskovskaya, O.L.; Vasyukova, N.I. (2002). The use of elicitors for protection of cultured plants demands caution. Applied Biochemistry and Microbiology. Vol. 38 No. 3: 277-279

[9] Zhao J, Lawrence CD, Verpoorte R. 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnol. Adv.;23:283-333.

[10] Boller T, Felix G, 2009. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. Annu. Rev. Plant Biol. 60, 379–406

[11] Holopainen J K, Heijari J, Nerg A M, Vuorinen M, Kanulainen P. 2009. Potential for the use of exogenous chemical elicitors in disease and insect pest management of conifer seedling production. Open. For. Sci. J. 2:17-24

[12] Odjacova, M., and Hadjiivanova, C. 2001. The complexity of pathogen defense in plants. Bulg. J. Plant. Physiol. . 27:101–109

[13] Garcia-Brugger A., Lamotte O., Vandelle E., Bourque S., Lecourieux D., Poinssot B., et al. . (2006). Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. Mol. Plant Microbe Interact. 19, 711–724. 10.1094/MPMI-19-071

[14] Bent AF, Mackey D. 2007. Elicitors, effectors, and R genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions. Annu Rev Phytopathol. 2007;45:399-436.

[15] Piñeros C. Y., A.Otálvaro A. A., Velásquez L. M. 2009. Efecto de la aplicación de elicitores sobre la producción de 4β-hidroxiwithanólido E, en raíces transformadas de *Physalis peruviana* L. *Univ. Sci.; 14(1); 23-28*

[16] Noreen, S. and Ashraf, M. (2009) Assessment of Variation in Antioxidative Defense System in Salt-Treated Pea (*Pisum sativum*) Cultivars and Its Putative Use as Salinity Tolerant Markers. Journal of Plant Physiology, 166, 1764-1774. http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2009.05.005

[17] Khan, N., Syeed, S., Masood, N., Nazar, R., and Iqbal, N. 2010. Application of salicylic acid increases contents of nutrients and antioxidative metabolism in mungbean and alleviates adverse effects of salinity stress. International Journal of Plant Biology. 2010. 1 (1), DOI: 10.4081/pb.2010.e1

[18] Purcarea, C. and Cachita-Cosma, D. Studia Universitatis."Vasile Goldis" Seria Stiint ele Vietii. 2010. 20 (1):63-68

[19] Girling, R., Madison, R., Hassall, M., Poppy, G. M. and Turner, J. G. (2008) Investigations into plant biochemical wound-response pathways involved in the production of aphid-induced plant volatiles. Journal of Experimental Botany, 59 (11). pp. 3077-3085

[20] Zhang, Z., Li, Q., Li, Z., Staswick, P., Wang, M., Zhu, Y., and He, Z. 2009. Dual regulation role of GH 35 in salicylic acid and auxin signaling *Arabidopsis syringe* e interaction. Plant Physiology. 2009. 145:450–464

[21] Ashraf, M., Akram, N. A., Arteca, R. N. and Foolad, M. R. 2010. The physiological, biochemical and molecular roles of brassinosteriods and salicylic acid in plant processes an salt tolerance. Critical Reviews in Plant Sciences. 29 (3):162-190

[22] Ogawa, T., Ara, T., Aoki, K., Suzuki, H., and Shibata, D. 2010. Transient increase in salicylic acid and its glucose conjugates after wounding in Arabidopsis leaves Plant Biotechnology. 2010. 27:205–209.

[23] Benavides-Mendoza, A., Salazar-Torres, A., Ramírez-Godina, F., Robledo-Torres, V., Ramírez-Rodríguez, H. y Maiti., R. 2004. Tratamiento de semilla de chile con ácidos salicílico y sulfosalicílico y respuesta de las plántulas al frío. Terra Latinoamericana.22 (1):41-47

[24] Noreen, S., Ashraf, M., Hussain, M. and Jamil, A. 2009. Exogenous Application of Salicylic Acid Enhances Antioxidative Capacity in Salt Stressed Sunflower (*Helianthus annus* L.) Plants. Pakistan Journal of Botany, 41, 473-479

[25] Ramírez, H., J. H. Rancaño-Arrioja, A. Benavides-Mendoza, R. Mendoza-Villarreal, E. Padrón-Corral. 2006. Influencia de Promotores de Oxidación Controlada en Hortalizas y su Relación con Antioxidantes. Revista Chapingo Serie Horticultura 12(2): 189-195, 2006.

[26] SAS Institute Inc. 2002. Guide for personal computers. SAS Institute, Cary. N.C.

[27] Guzmán-Antonio, A., L. Borges-Gómez, L. Pinzón-López, E. Ruiz-Sánchez, J. Zúñiga-Aguilar. 2012. Efecto del Ácido Salicílico y la Nutrición Mineral Sobre la Calidad de Plántulas de Chile Habanero Agronomía Mesoamericana 23(2):247-257

[28] Larqué-Saavedra, A., R. Martín-Mex**,** A. Nexticapan-Garcéz**,** S. Vergara-Yoisura**,** M. Gutiérrez-Rendón. 2010. Efecto del Ácido Salicílico en el Crecimiento de Plántulas de Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Revista Chapingo Serie Horticultura 16(3): 183-187

[29] Peng, J.; Deng, X.; Huang, J.; Jia, S.; Miao, X.; Huang, Y. 2004. Role of Salicylic Acid in Tomato Defense against Cotton Bollworm, *Helicoverpa armigera* Hubner Z. Naturforsch. 59 (11-12: 856-62.

[30] Quiroz-Figueroa, F.; Méndel-Zeel, M.; Larqué-Saavedra, A.; Loyola Vargas, V. M. 2001. Picomolar concentrations of salicylates induce cellular growth and enhance somatic embryogenesis in *Coffea arabica* tissue culture. Plant Cell Rep 20: 679-684.

[31] Echeverría-Machado, I.; Escobedo Gracía-Medrano, R. M.; Larqué-Saavedra, A. 2007. Responses of transformed *Catharanthus roseus* roots to femtomolar concentrations of salicylic acid. Plant Physiol. and Biochem. 45: 501-507.

[32] Salisbury, FB; Ross, CW. 1994. Fisiología vegetal. Traducido por González, V. V. Edit. Iberoamérica, México. 673 p.

[33] Khodary, S.E.A., 2004. Effect of salicylic acid on the growth, photosynthesis, and carbohydrate metabolism in salt-stressed maize plants. J. Agric. Biol. 6, pp. 5-8.

[34] Lian B, Zhou X, Miransari M, Smith DL. 2000. Effect s of SA on the development and root nodulation of soybean seedlings. J. Agron. Crop Sci. 185(3): 187-192

[35] Casierra-Posada, F., Rojas B., Javier F. 2009. Efecto de la exposición del semillero a coberturas de colores sobre el desarrollo y productividad del brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica*). Agronomía Colombiana, 27 (1) 1:49-5

[36] Yildirim, E., Turan, M., Guvenc, I., 2008. Effect of foliar salicylic acid applications on growth, chlorophyll, and mineral content of cucumber under salt stress. Journal of Plant Nutrition. 31, pp. 593- 612.

[37] Casasola, Z. S. 2012. Efecto del ácido salicílico en la tolerancia a estrés abiótico: inducción de genes de resistencia, producción de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante en lechuga (*Lactuca sativa*). Tesis de Licenciatura en Biotecnología. Universidad Autónoma de Querétaro. p. 65.

CULTURE OF RHIZOSPHERE MICROORGANISMS AS BIOFERTILIZERS

(Cultivo de microorganismos rizosféricos como biofertilizantes)

María de los Angeles Aquiahuatl Ramos*[a], Lorenzo Wilfrido Rodríguez Pérez[b]

[a*]Universidad Autónoma Metropolitana
[b] Programa de Investigación Sierra Nevada-UAM

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: aura@xanum.uam.mx

Área del Conocimiento: Agrobiotecnología

ABSTRACT

The rhizosphere is widely reported to support highly diverse microbial communities, such microorganisms have a marked contribution to plant growth and physiology, notably by affecting plant mineral nutrition, by producing phytohormones, and by helping plants tolerate abiotic stress. Biofertilizers are products containing viable cells of different types of microorganisms, which are characterized by their ability to turn nutritionally important elements from their not available form to an available form via biological processes. The objective of this work is to obtain beneficial microorganisms cultures from rhizosphere of native plants, grown in culture media with ingredients that are accessible to field conditions in agricultural communities. If we know the cultivation conditions of beneficial microorganisms for crop production then it is possible to obtain bio-fertilizers to reduce the need for chemical fertilizers in agricultural practices. A liquid enrichment culture system was made to promote the growth of nitrogen-fixing bacteria and phosphate solubilizing found in the rhizosphere of *Lopezia racemosa,* a typical species of weeds found in corn production fields of Tlalmanalco, México State. A suspension of rhizosphere soil was obtained by shaking the root system, we used the plate-dilution frequency technique (Harris and Sommers, 1968) for the enumeration of nitrogen-fixing bacteria and phosphate solubilizing in cultures plates. A fractional factorial of Plackett–Burman design is used to screen the key factors of culture broth, the effect of 7 nutritional and environmental factors with two levels in 8 experiments were studied: bean flour, molasses, yogurt, $CaCO_3$, temperature, incubation time and agitation. The results showed that a culture with greater beneficial microbial populations are obtained with bean flour 10 g /L, $CaCO_3$ 2 g /L, molasses 1 g /L and yogurt 1.0 g /L incubated at room temperature. The agitation of the media culture was positive only for solubilizing phosphate while nitrogen fixers require longer incubation time.

Keywords: rhizosphere, biofertilizers, fixing nitrogen, phosphate solubilizing.

RESUMEN

En diversos estudios sobre la diversidad de comunidades microbianas de la rizósfera, se reporta que los microorganismos tienen una marcada contribución al crecimiento y fisiología de las plantas en diferentes formas; mejorando la nutrición mineral de la planta, por la producción de fitohormonas y ayudando a las plantas a tolerar el estrés abiótico. Los biofertilizantes son productos que contienen

células viables de diferentes tipos de microorganismos, que se caracterizan por su capacidad de convertir los elementos nutricionalmente importantes de su forma no disponible a una forma disponible a través de procesos biológicos. El objetivo de este trabajo es obtener cultivos microbianos benéficos de la rizósfera de plantas nativas, en medios de cultivo con ingredientes que sean accesibles a las condiciones de campo en las comunidades agrícolas. Si conocemos las condiciones de cultivo de microorganismos benéficos para la producción agrícola, entonces es posible obtener biofertilizantes y reducir el uso de fertilizantes químicos en las prácticas agrícolas. Se hizo un cultivo líquido de enriquecimiento para promover el crecimiento de bacterias fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fosfato que se encuentran en la rizósfera de *Lopezia racemosa*, una especie herbácea típica de campos de producción de maíz de Tlalmanalco, Estado de México. Del sistema radicular se obtuvo por agitación una suspensión de suelo de la rizósfera, se utilizó la técnica de inoculación de diluciones en placa (Harris y Sommers, 1968) para el recuento de bacterias fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fosfato en placas de Petri. Para la formulación de medios de cultivos de rizósfera enriquecidos en poblaciones fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fosfatos se aplicó un diseño factorial fraccionado en una matriz de tipo Placket- Burman, con el que se determinó el efecto principal de 7 factores nutricionales y ambientales con dos niveles en 8 experimentos; los factores de estudio fueron: harina de frijol, melaza, yogurt, $CaCO_3$, la temperatura, el tiempo de incubación y agitación. Los resultados mostraron que se obtuvieron mayores poblaciones microbianas benéficas en medios de cultivo que contienen harina de frijol 10 g / L, $CaCO_3$ 2 g / L, melaza 1 g / L y yogurt 1 g / L incubados a temperatura ambiente. La agitación de los cultivos fue positiva sólo para los microorganismos solubilizadores de fosfato mientras que para microorganismos fijadores de nitrógeno se requiere un mayor tiempo de incubación.

Palabras Clave: rizósfera, biofertilizantes, fijación de nitrógeno, solubilización de fosfato.

INTRODUCCIÓN

Desde la mitad del siglo pasado, la revolución verde como estrategia para aumentar la producción agrícola utilizando fertilizantes y plaguicidas ha demostrado sus limitaciones de aplicación en los distintos ecosistemas por los graves efectos secundarios en el medio ambiente y la salud humana. Ante esto en muchas comunidades de países latinoamericanos se han implementado sistemas de producción agrícola alternativas que promueven la producción sana y segura de alimentos, desde el punto de vista ambiental, social y económico, considerando la fertilidad del suelo como la base para una buena producción.

Existen prácticas muy antiguas como el uso de los abonos orgánicos; de tipo composta obtenidos por fermentación de desechos de origen animal, vegetal o mixto que ha demostrado su efecto positivo sobre el rendimiento de muchos cultivos. Uno de los productos utilizados en comunidades de Colombia que quieren desarrollar una agricultura orgánica es el uso de caldos microbianos de rizósfera de plantas como limonaria, ortiga y borraja como activadores eficaces y económicos de la microbiota del suelo [1,2]; otro ejemplo es el uso de cultivos microbianos de rizósfera como biofertilizantes en cultivos de *Citrus reticulata* en la India [3].

Estas prácticas se fundamentan en el hecho de que los microorganismos del suelo interactúan con las raíces de las plantas y constituyentes del suelo en la interfase raíz-suelo. Este gran conjunto de interacciones entre suelo, raíces y microorganismos da lugar al desarrollo de un ambiente dinámico conocido como rizósfera, donde una variedad de formas microbianas pueden desarrollarse activamente y en equilibrio [4]. Se ha demostrado una relativa abundancia de bacterias en la rizósfera, asociada a la excreción de nutrientes orgánicos por las raíces de las plantas, los cuales favorecen selectivamente a ciertos tipos nutricionales de bacterias; principalmente a las que realizan funciones esenciales para los

vegetales, tales como la fijación de nitrógeno, la mineralización de compuestos orgánicos y la solubilización de fosfatos minerales [5].

Un cultivo mixto de rizósfera es un líquido que contiene microorganismos normalmente presentes en la rizósfera de plantas sanas, con capacidad de mejorar las condiciones físicas, químicas y biológicas del suelo y mejorar su fertilidad. Se preparan utilizando insumos accesibles como productos orgánicos, productos químicos puros (no sintéticos), desechos de plantas, estiércoles, harinas, huesos, entre otros que ayudan a transformar los nutrientes de manera que sean asimilados fácilmente por las plantas, mejorando y favoreciendo sus condiciones de cultivo.

Es importante también seleccionar la rizósfera de especies vegetales nativas, adaptadas a las condiciones ambientales de la zona agrícola, con microrganismos que no solo mejoren la nutrición vegetal sino que también pueden mejorar la resistencia de los cultivos a factores adversos como falta de agua y toxicidad de metales pesados o tóxicos [6].

Nuestro principal interés es la investigación microbiológica de las tecnologías que en muchas comunidades se han utilizado desde tiempos antiguos, pero sin tener el completo conocimiento de las condiciones de elaboración y variables de control de su producto obtenido.

El objetivo de este estudio es la formulación de un medio de cultivo con el uso de materiales de bajo costo y condiciones de cultivo accesibles a la comunidad agrícola que favorezcan poblaciones benéficas obtenidas de la rizósfera de una planta nativa; cuantificando a los microorganismos fijadores de nitrógeno y solubilizadores de fosfato en cultivos mixtos de rizósfera para conocer el efecto de diferentes sustratos y condiciones de crecimiento.

METODOLOGÍA

Colecta de muestras

Se hizo una colecta de plantas nativas en época de floración de la zona agrícola de la Sierra Nevada en Tlalmanalco, Estado de México que cumplieran con los siguientes criterios: plantas sanas, persistentes, cosmopolitas y sin efectos alelopaticos. Se seleccionó *Lopezia racemosa*, una de las especies de maleza típicas en campos de producción de maíz de la región. Se obtuvieron muestras de suelo y rizósfera de *L. racemosa* que se colocaron en bolsas de plástico negras.



Figura 1. *Lopezia racemosa*

Obtención del inóculo de la rizósfera

La zona radicular de la planta se sacudió ligeramente para eliminaron las partes de suelo no rizosférico; se enjuagaron suavemente con agua destilada y se cortaron fragmentos de 1 cm aproximadamente, los que se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de solución salina isotónica estéril y 1 g de arena lavada y esterilizada previamente; el matraz se colocó en un agitador orbital a 150 rpm durante 10 minutos.

La suspensión de raíces se decantó; la solución resultante se guardó en frascos de cultivo estériles y se le cuantificaron los microorganismos fijadores de nitrógeno (MFN) y microorganismos solubilizadores de fosfato (MSP).

Diseño experimental

Para la formulación de medios de cultivos de rizósfera enriquecidos en poblaciones fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fosfatos se aplicó un diseño factorial fraccionado en una matriz de tipo Placket Burman con el programa estadístico Statgraphics Centurion XVI.II, para probar el efecto de 4 factores nutricionales y 3 factores ambientales con dos niveles (Tabla 1.) donde se asignan los niveles + y – para cada una de las variables.

Tabla 1. Niveles de cada factor de estudio.

Simbología	Factores	Nivel +	Nivel -
HF	Harina de fríjol (g/L)	10	1
M	Melaza (g/L)	10	1
Y	Yogurt (g/L)	10	1
C	$CaCO_3$ (g/L)	2	0
T	Temperatura (°C)	35	28
TI	Tiempo de incubación (Horas)	72	48
A	Agitación (150 rpm)	si	no

Siendo 7 factores se necesitaran de 8 experiencias diferentes para poder resolver el problema por lo que se forma una matriz de 7 X 8 con la combinación de 2 niveles que se presenta en la tabla 2. En cada experimento por duplicado se evaluó el número de MFN y MSP.

Tabla 2.- Composición del medio y condiciones de cultivo de cada experimento

Factores	Experimento							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Ingredientes (g/L)								
A. Harina de Frijol	1	10	1	10	1	10	1	10
B. Melaza	1	1	10	10	1	1	10	10
C. Yogurth	10	1	1	10	10	1	1	10
D. $CaCO_3$	0	0	0	0	2	2	2	2
Condiciones de cultivo								
E. Temperatura (°C)	35	35	28	28	28	35	28	35
F. Tiempo de cultivo (hr)	48	72	72	48	48	48	72	72
G. Agitación (Manual o rpm)	150	M	150	M	150	M	M	150

Cultivos mixtos de rizósfera

Se prepararon medios de cultivo con cada combinación por duplicado, en matraces Erlenmeyer de 250 ml; se agregaron la harina de fríjol, melaza y $CaCO_3$ en las cantidades correspondientes a 100 mL de agua destilada y se esterilizaron a 121°C durante 15 minutos. Una vez que se enfriaron los medios de cultivo se agregó el yogurt y 10 ml del inóculo de rizósfera en zona aséptica. Los matraces Erlenmeyer se incubaron en las condiciones correspondientes a la matriz de experimentación de la tabla 2.

Cuantificación de microorganismos

Se cuantificaron los MFN y MSP aplicando una técnica que combina la del número más probable NMP en tubos y de vertido en placas de diluciones decimales [7]. Se prepararon placas con medio para MFN de Döbereiner [8] y medio de cultivo del National Botanical Research Institute's Phosphate para MSP [9].

Se prepararon para cada experimento y su repetición 6 tubos de ensaye con 9 ml de solución salina isotónica estéril, con los cuales se realizan las diluciones 10^{-1}- 10^{-6}. Cada caja se inoculó con dos diluciones, colocando 5 µL de cada dilución en 8 puntos distribuidos como se indica en la figura 2, empezando con la dilución mayor.



Figura 2. Modo de inoculación en caja de Petri.

Después de que se absorbe completamente el líquido de cada inoculación, las cajas Petri se sellaron con parafilm y se incubaron de forma invertida. Después de 24 y 48 horas se revisaron las cajas contando las respuestas positivas para cada dilución para calcular el NMP en las tablas propuestas por Harris & Sommers, 1968 [6]. El número de microorganismos/mL calculado se transformó en forma logarítmica y se hizo el análisis de resultados con el programa estadístico Statgraphics Centurion XVI.II.

RESULTADOS

En la tabla 3 se presentan los resultas de cuantificación del número de MFN y MSP en los experimentos y en la figura 3 se muestran las gráficas de las estimaciones estadísticas para cada uno de los efectos de los factores en orden decreciente de importancia en diagramas de Pareto.

Tabla 3. Número de MFN y MSP de experimentos

Experimento	Fijadores de nitrógeno (MFN)		Solubilizadores de Fosfato (MSP)	
	Log # microorgs/mL	Desv. estandar	Log # microorgs/mL	Desv. estandar
1	3.076	0.004	3.251	0.082
2	5.105	0.125	4.451	0.037
3	4.251	0.082	5.270	0.056
4	3.429	0.069	3.451	0.037
5	4.429	0.069	4.491	0.020
6	4.454	0.041	5.326	0.023
7	4.433	0.020	4.345	0.050
8	3.154	0.056	3.429	0.069

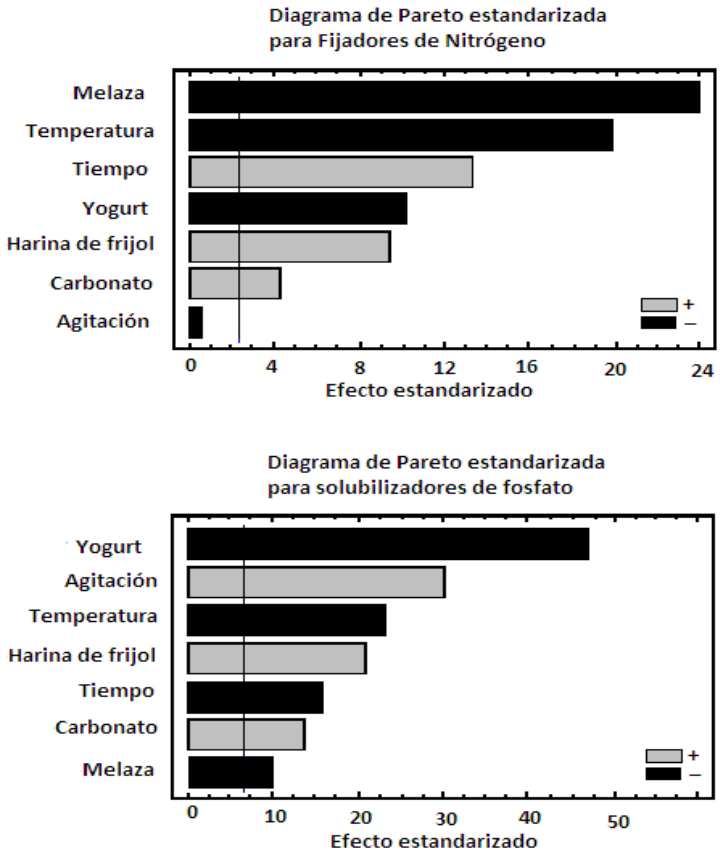


Figura 3. Efecto de los factores de estudio en los MFN y MSP

Los análisis de varianza de los efectos estandarizados tuvieron un valor-P menor que 0.05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95.0%. En la tabla 4 se presentan las ecuaciones de regresión ajustadas a los datos y las ecuaciones del modelo ajustado para cada población microbiana.

Tabla 4. Comparación de las ecuaciones del modelo ajustado para cada población microbiana

Ecuación del modelo ajustado	R-cuadrada ajustada	Error estándar
MFN = 4.04062 + 0.285625*HF - 0.726875*M - 0.309375*Y + 0.075625*C - 0.601875*T + 0.403125*TI - 0.016875*A	99.0222%	0.0700956
MSP = 4.25187 + 0.454375*HF - 0.220625*M - 1.04562*Y + 0.146875*C - 0.475625*T - 0.290625*TI + 0.609375*A	99.4828%.	0.0564975

Se hizo la formulación comparativa de medios de cultivo y condiciones óptimas para la obtención de un cultivo mixto microbiano enriquecido con MFN y MSP que se presenta en la tabla 5.

Tabla 5.- Formulación de un medio de cultivo enriquecido con poblaciones microbianas benéficas.

Población microbiana	Harina de frijol	Melaza	Yogurt	$CaCO_3$	Temperatura	Tiempo	Agitación
MFN	10 g/L	1 g/L	1 g/L	2 g/L	28 °C	72 h	manual
MSP	10 g/L	1 g/L	1 g/L	2 g/L	28°C	48 h	150 rpm

DISCUSIONES

En relación al diseño experimental, se demostró que la melaza y el yogurt de los medios de cultivo tuvieron efectos negativos tanto en el crecimiento de poblaciones FN como de SP, pero en grados de importancia distinta para cada población microbiana, es decir los niveles mayores de estos ingredientes en el medio no mejoran el crecimiento de las poblaciones microbianas, por lo que es recomendable utilizarlos en menores niveles. La utilización de la melaza en los medios como mezcla compleja de azúcares como sacarosa, glucosa, fructosa; ácidos orgánicos y minerales se ha recomendado en diferentes procesos de fermentación por levaduras y *Lactobacillus* [10], sin embargo también se ha reportado que puede tener efectos tóxico por su contenido de fenoles provenientes de la parte fibrosa de la caña de azúcar, lo que puede causar efectos inhibitorios para algunas bacterias incluso a niveles mayores de 0.5 g/L [11], lo que puede explicar su efecto negativo en MFN y en menor grado en los MSP. Con respecto al yogurt, este es un producto fermentado con bacterias lácticas; es comercialmente consumido por su valor nutricional y contenido de factores de crecimiento, pero al incorporarse al medio estas bacterias lácticas pudieron incrementarse en niveles mayores que las poblaciones de MFN y MSP, por su capacidad de utilizar las melazas a niveles mayores de 10% [10].

La harina de frijol fue el factor nutricional de mayor efecto positivo para las dos poblaciones microbianas, por su contenido de fuentes de carbono y principalmente nitrógeno. Dado que los medios de cultivo no son selectivos para las poblaciones benéficas, la adición de una fuente de nitrógeno estimulará el crecimiento diferencial de diversas poblaciones microbianas provenientes del yogurt y la rizósfera, formando un consorcio microbiano en que se establecerán interacciones y equilibrios entre las mismas. El principio de selección en este estudio se aplicó al obtener el inóculo de rizósfera, y en la cuantificación de MFN y MSP donde se utilizaron medios selectivos. Es importante mencionar que los consorcios microbianos son formas de crecimiento mixto microbiano natural en ecosistemas terrestres y acuáticos [12]; de la misma manera se aplican en procesos de fermentación del yogurt, queso, pulque y en la biorremediación de suelos, donde demuestran ser más eficientes que los cultivos puros de microorganismos [13].

El número de MFN/mL y MSP/mL en la solución de rizósfera inicial fue de $2x10^3$ y $1.2x10^4$, y en los cultivos mixtos estos valores se incrementaron; pero en un cultivo final con medio de la formulación de la tabla 5, utilizando como inóculos el cultivo de rizósfera del experimento 3 se obtuvieron $2.5x10^6$ y $2.9x10^7$ de MFN/mL y MSP/mL que se ajustan a las ecuaciones del modelo indicados en la tabla 4.

En cultivos de rizósfera de borraja, ortiga y limonaria que reportaron 2.5×10^7 MFN/mL y $8.4x10^6$ de MSP/mL, que son muy similares a los obtenidos en nuestro estudio pero fueron obtenidos después de ocho semanas en cubetas y sin condiciones de agitación [6].

La agitación mejoró el crecimiento de los MSP y el tiempo de incubación mayor favoreció a los MFN, que se relaciona con los resultados de mayores MFN, al contrario de los estudios de [6] en los que se aplicaron las condiciones tradicionalmente aplicadas en las comunidades de Colombia.
La temperatura de incubación a 28°C es la que mejora los niveles de microrganismos benéficos por lo que es una condición accesible para la producción en comunidades agrícolas.

CONCLUSIONES

El diseño experimental aplicado permitió conocer los efectos principales de los factores ambientales y nutricionales del cultivo de rizósfera, para la formulación del mejor medio incubado en condiciones favorables para obtener MSF y MSP que pueda aplicarse en la producción de biofertilizantes con poblaciones benéficas de manera más rápida, económica y baja inversión de insumos.

REFERENCIAS

[1] Agudelo, A. 2001. Agricultura orgánica: Un proyecto de vida, con la vida y para la vida. PRONATTA, Acción Campesina Colombiana y EMCOBA. Editorial Jotamar Ltda. Puente Nacional, Santander. 44 p.

[2] Forero, B. R. (2000). "Ecosistemas, Agricultura Ecológica u Orgánica y Visión de Colombia Global Tropical" Agencia de Cooperación IICA-Colombia.

[3] Thokchom, E., Kalita, M. Ch. and Talukdar, N. Ch. (2014) " Isolation, screening, characterization, and selection of superior rhizobacterial strains as bioinoculants for seedling emergence and growth promotion of Mandarin orange (*Citrus reticulate* Blanco)", Canadian Journal of Microbiology. 60: 85–92.

[4] Pedraza, R. O., Teixeira, K. R.S., Fernández, S. A., García de Salamone, I., Baca, B. E., Azcón, R., Baldani, V.L.D., Bonilla, R. (2010)" Microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos. Revisión" Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria 11(2): 155-164

[5] Jilani, G. , Akram, A., Ali,R. M. , Hafee, F. Y., Sham, I. H. , Chaudry, A. N., Chaudry A. G. (2007). Enhancing crop growth, nutrients availability, economics and beneficial rhizosphere microflora through organic and biofertilizers". Annals of Microbiology. 57(2) 177-183.

[6] Shen, D., 1997. Microbial diversity and application of microbial products for agricultural purposes in China. Agric. Ecosyst. Environ. 62: 237–245.

[7]Harris, R. F. and Sommers, L. E. (1968) "Plate-Dilution Frequency Technique for Assay of Microbial Ecology". Applied Microbiology. 16 (2): 330-334.

[8] Becking, J.H. (1992) "The Family Azotobacteriaceae", in The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology. (Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K. Eds.). New York: Springer Science & Business Media. 3144-3165.

[9] Shekhar, N. C. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. FEMS Microbiology Letters 170: 265-270.

[10] Vanegas, M.C.; Badillo, A.M. (2010) Evaluación de la melaza de caña como sustrato para el crecimiento de *Lactobacillus plantarum* Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica 13 (1): 97-104.

[11] Castro, M. (1993). Estudio de la melaza de caña como sustrato en la fermentación acetobutílica. (Tesis Pregrado Ingeniería Química, Universidad Nacional de Colombia): 3-33

[12] Atlas, R.M., Bartha, R. 2002. Ecología Microbiana y Ecología Ambiental. Cuarta Edición. Pearson Educación, S.A. Madrid.

[13] Maldonado-Chávez E, Rivera-Cruz MC, Izquierdo-Reyes F, Palma-López DJ. (2010) Efectos de rizosfera, microorganismos y fertilización en la biorremediación y fitorremediación de suelos con petróleos crudo nuevo e intemperizado. Universidad y ciencia [revista en la Internet]. Ago [citado 2015 Sep 10] ; 26(2): 121-136. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0186-29792010000200001&lng=es

[13] Méndez, M.J., Viteri, S.E. (2007) "Alternativas de biofertilización para la producción sostenible de cebolla de bulbo (*Allium cepa*) en Cucaita, Boyacá" Agronomía Colombiana 25(1), 168-175.

MICROPROPAGATION OF SOTOL (*Dasylirion cedrosanum* Trel.)

[Micropropagación de sotol (*Dasylirion cedrosanum* Trel.)]

Leticia Escobedo Bocardo[a*], Hermila Trinidad García-Osuna[a+], Adalberto Benavides Mendoza[a], Francisca Ramírez Godina[a].

[a] Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Calzada Antonio Narro 1923, Saltillo Coah. México.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: hgosuna@hotmail.com

Área del conocimiento: Agrobiotecnología

ABSTRACT
The increase in demand for *Dasylirion cedrosanum* plants for the production of alcoholic beverage Sotol requires its mass multiplication through micropropagation. There is a micropropagation protocol via direct organogenesis, but its efficiency is still low. Therefore the objective of this research was to analyze the response of explants *D. cedrosanum* to different doses of growth regulators in order to make efficient direct organogenesis. In addition, there is no information of use of Prohexadione-calcium (PCa) in tissue culture of *D. cedrosanum* so this test is designed to determine the effect of bioregulator in morphogenesis of this plant. For the establishment phase it will be started from seeds germinated *in vitro*. PCL2 medium used in the second stage and argue that the application of BAP at concentrations of 0.0, 0.5, 1.0 and 2.0 mg L^{-1} and equal concentration of Prohexadione calcium for induce a morphogenetic response and greater production of sprouts. The best treatment was the combination of 2.0 mg L^{-1} BAP and 1.0 mg L^{-1} of PCa with 4.5 buds per explant. The interaction of regulators BAP and Prohexadione-calcium increased production of sprouts.

Keywords: *Dasylirion cedrosanum*; micropropagation; prohexadionde-calcium; sotol.

RESUMEN
El aumento en la demanda de plantas de *Dasylirion cedrosanum* para la producción de la bebida alcohólica de Sotol requiere de multiplicación masiva a través de la micropropagación. Existe un protocolo de micropropagación vía organogénesis directa, pero su eficiencia es todavía baja. Por lo tanto el objetivo de esta investigación fue analizar la respuesta de los explantes de *Dasylirion cedrosanum* a diferentes dosis de reguladores de crecimiento con el fin de eficientar la organogénesis directa. Además, no existe información del uso de prohexadiona de calcio (PCa) en cultivo de tejidos de *D. cedrosanum* por lo que esta investigación fue diseñada para determinar el efecto de este biorregulador en la morfogénesis de la planta. La fase de establecimiento se inició partir de semillas germinadas *in vitro*. Se utilizó el medio PCL2 en la segunda etapa con la adición de BAP en concentraciones de 0.0, 0.5, 1.0 y 2.0 mg L^{-1} e iguales concentraciones de Prohexadiona calcio para inducir una respuesta morfogenética y aumentar así la producción de brotes. El mejor tratamiento fue la combinación de 2.0 mg L^{-1} BAP y 1.0 mg L^{-1} de PCa con 4.5 brotes por explante. La interacción de los reguladores BAP y prohexadiona de calcio aumentó la producción de brotes.

Palabras clave: *Dasylirion cedrosanum*; micropropagación; prohexadiona de calcio; sotol

INTRODUCCIÓN

Dasylirion cedrosanum es una planta nativa del Desierto Chihuahuense. Esta especie pertenece a la familia Asparagacea, ha sido utilizada históricamente como alimento, forraje, cestería y para la producción de una bebida alcohólica denominada sotol.

En el 2002 se propuso para los estados de Chihuahua, Coahuila y Durango la protección a la denominación de origen sotol [1]. Debido a ello, se originó un aumento en el número de solicitudes para aprovechamiento de la especie, lo que contribuye a un mayor uso de las poblaciones naturales, lo que conlleva a un aprovechamiento no sustentable, por lo cual es necesario originar información que nos proporcione las bases para llevar a cabo plantaciones dirigidas al uso industrial.

Esta especie se puede propagar por medio de semilla, o *in vitro* [2]. Una de las limitantes de la propagación sexual es la variabilidad genética, mientras la técnica de cultivo *in vitro* permite el saneamiento y la propagación masiva de la especie con características más uniformes, lo que garantiza su producción a nivel comercial.

Dentro de los reguladores poco evaluados en la micropropagación se encuentra la prohexadiona de calcio (PCa) el cual es un inhibidor de las giberelinas. Algunos autores mencionan sus efectos en la morfogénesis de *Populus tremula* L. donde observaron una disminución de la longitud del tallo e inhibición del enraizamiento[3].

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de prohexadiona de calcio en la formación de brotes de sotol, a partir de plántulas germinadas *in vitro.*

METODOLOGÍA

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Departamento de Fitomejoramiento de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Establecimiento del cultivo

La primera etapa consistió en germinar semillas *in vitro*. Las semillas fueron tratadas con agua jabonosa e hipoclorito de sodio al 10% por 10 minutos y enguajadas en agua corriente. Se inhibieron en agua destilada estéril por 24 horas. Una vez pasado este tiempo, en la campana de flujo laminar, se procedió a desinfectarlas en una solución alcohol al 70 % por un minuto y se enjuagaron en agua destilada estéril, posteriormente se colocaron en hipoclorito de sodio al 20% y se enguajaron con agua destilada estéril por tres ocasiones, se sembraron en medio Murashige y Skoog (MS) a mitad de su concentración suplementado con 100 mg L^{-1} de mio-inositol, 1 mg L^{-1} de tiamina-HCL, 1 mg L^{-1} de piridoxina-HCL, 1 mg L^{-1} Kinetina, 30 g L^{-1} de sacarosa y 8 g L^{-1} de agar; el pH del medio se ajustó a 5.7 y se esterilizó a 120° C durante 15 minutos. Las semillas se transfirieron al cuarto de incubación a una temperatura de 25±1° C, con 16 horas luz a intensidad de 2500 lux y 8 horas de obscuridad.

Una vez germinadas las semillas, las plántulas se trasvasaron a medio de cultivo PCL2 suplementado con 0.1 g L^{-1} de myo-inositol, 0.001 g L^{-1} de ácido nicotínico, 0.001 g L^{-1} de piridoxina-HCl, 0.001 g L^{-1} de tiamina-HCl, 0.001 g L^{-1} de riboflavina, 0.002 g L^{-1} de glicina, 0.080 g L^{-1} de adenina, 1 g L^{-1} de BAP, 30 g L^{-1} de sacarosa y 4 g L^{-1} de phytagel a un pH de 5.7. Se colocaron 20 ml de medio de cultivo en cada frasco tipo gerber, los que posteriormente se esterilizaron en autoclave a 121ºC durante 20 minutos.

Se trasvasaron cuatro explantes por frasco bajo la campana de flujo laminar. Se llevaron al cuarto de incubación a una temperatura de 25ºC ± 2ºC, con fotoperiodo de 18 horas luz durante cuatro semanas.

Micropropagación

Se tomaron trozos de tallo de las plántulas generadas en la fase de establecimiento del cultivo los que constituyeron los explantes, con la finalidad de llevar a cabo la micropropagación. Se prepararon dos medios MS [6] y PCL2 [7] adicionados con 250 mg L^{-1} de myo-inositol, 0.001 g L^{-1} de ácido nicotínico, 0.001 g L^{-1} de piridoxina-HCl, 0.001 g L^{-1} de tiamina-HCl, 0.02 g L^{-1} de glicina, 80 mg L^{-1} de adenina, 30 g L^{-1} de sacarosa y 4 g L^{-1} de phytagel a un pH de 5.7. Se agregaron además diferentes concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento, BAP (0.0, 0.5, 1.0 y 2.0 mg L^{-1}) y PCa (0.0, 0.5, 1.0 y 2.0 mg L^{-1}) que constituyeron los 16 tratamientos (T1-T16). Se colocaron 20 ml de medio de cultivo en cada frasco tipo gerber, los que posteriormente se esterilizaron en autoclave a 121ºC durante 20 minutos.
Se colocaron cuatro explantes por frasco bajo la campana de flujo laminar, considerando cada frasco como una repetición y se contó con 5 repeticiones. Los frascos se colocaron en el cuarto de incubación a una temperatura de 25ºC ± 2ºC con un fotoperíodo de 18 h luz. Se renovó el medio de cultivo cada 4 semanas y se evaluó el número de brotes a las 8 semanas de desarrollo.

Análisis estadístico

Este experimento se estableció bajo un diseño completamente al azar. Los resultados se sometieron a un análisis de varianza y a la prueba de comparación de medias de Tukey (P 0.05) cada tratamiento consistió de cuatro explantes replicado cinco veces.

RESULTADOS

El análisis de varianza para número de brotes no mostró diferencia significativa entre los medios MS y PCL2, pero fue significativo para reguladores de crecimiento, donde la prueba de medias de Tukey ($p<0.05$) indicó que la combinación de BAP (2 mg L^{-1}) con PCa (0.5, 1 y 2 mg L^{-1}) en los medio MS y PCL2 incrementó el número de brotes. El mejor tratamiento fue el T15 (2 mg L^{-1} BAP y 1 mg L^{-1} de PCa), alcanzando un promedio de 3.6 brotes por explante en el medio PCL2 y 3.5 brotes por explante en el medio MS, seguido por los tratamientos T14 (2 mg L^{-1} BAP y 0.5 mg L^{-1} PCa) y T16 (2 mg L^{-1} de BAP y 2 mg L^{-1} de PCa). La menor cantidad de brotes se observó en los tratamientos T2 a T8.
Los tratamientos T1 (sin reguladores de crecimiento) y T2 (0 mg L^{-1} BAP y 0.5 mg L^{-1} PCa) no presentaron brotes en el medio PCL2 y fueron mínimos en el medio MS. (Figuras 1 y 2).

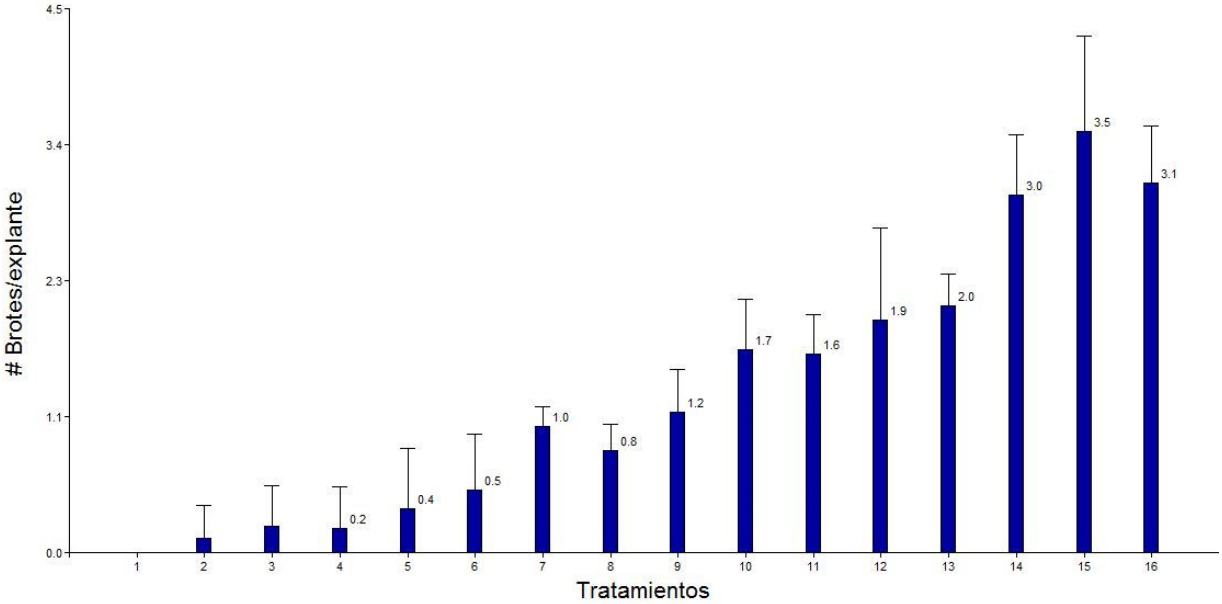


Figura 1. Número de brotes de sotol a las 8 semanas en medio MS en presencia de BAP y PCa.

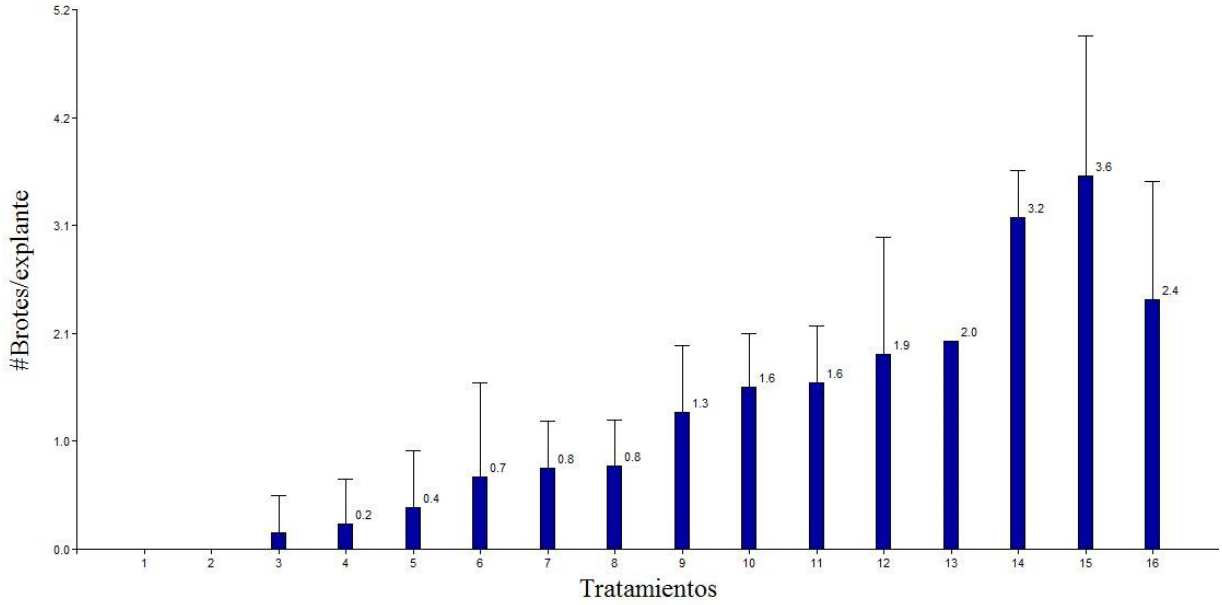


Figura 2. Número de brotes de sotol a las 8 semanas en medio PCL2 en presencia de BAP y PCa.

La calidad de los brotes fue mejor en el medio PCL2 debido a que en el medio MS se presentaron problemas en los tratamientos T4 y T13, los brotes del T4 (PCa 2 mg L^{-1}) presentaron clorosis en la parte distal de las hojas (Figura 2 A); mientras que en el T13 (BAP 2 mg L^{-1}) se generaron brotes con hiperhidracidad.

Los brotes procedentes de la micropropagación se trasvasaron a un medio libre de reguladores, lo que favoreció la producción de raíces a las 4 semanas (Figura 3B).

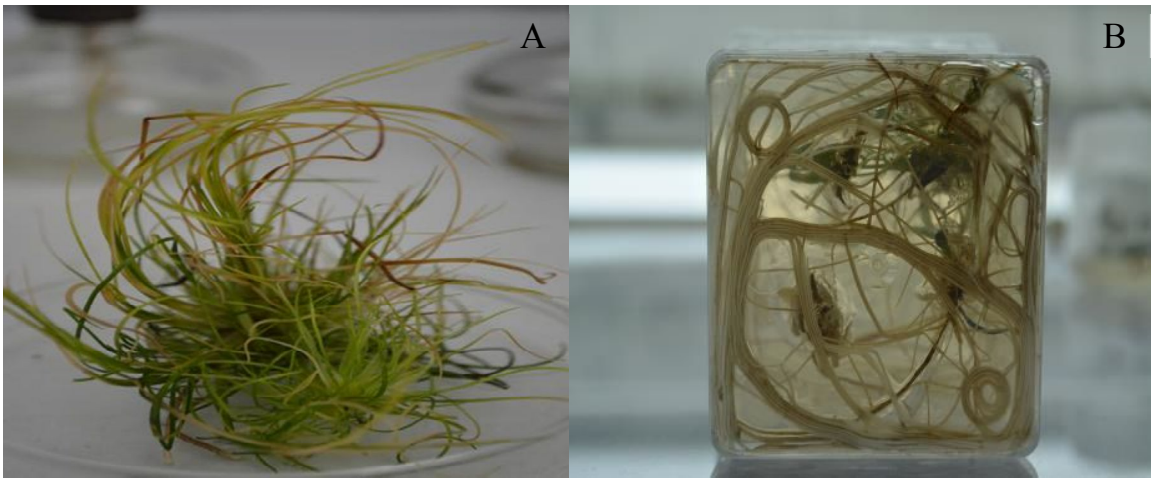


Figura 3. Respuesta morfológica en la formación de brotes (A) y raíces (B) de sotol.

DISCUSIÓN

La tasa de multiplicación de brotes fue significativa con la combinación de los dos reguladores de crecimiento. BAP y PCa que actuaron sinérgicamente, además PCa favoreció la síntesis de citocininas endógenas [4] generando una mayor cantidad de brotes posteriores a la fecha de evaluación.
Este valor fue menor a los valores obtenidos para el género [5] donde se obtuvo hasta 10.3 brotes por explante con BA a una concentración de 3 mg L^{-1}, de igual forma, para la especie [2] donde se obtuvo un promedio de 7 brotes por explante.
El crecimiento de la planta requiere de una combinación de división celular y expansión, la cual es ampliamente regulada por factores ambientales y endógenos, como las fitohormonas. Bajo condiciones *in vitro* los reguladores de crecimiento son los factores mas importantes en la regulación del desarrollo. Cuando las concentraciones de los reguladores de crecimiento no son fisiológicas se observa una expresión morfológica del estrés. En el caso de la aplicación de BAP solo se observó la presencia de brotes con hiperhidracidad en el medio MS, mientras al combinarse con PCa favoreció la formación de plantas sin esta respuesta fisiológica.

CONCLUSIONES

Los medios evaluados MS y PCL2 fueron adecuados para la propagación masiva, pero se observó una mejor calidad de brotes en medio PCL2. La combinación de la citocinina (BAP 2 mg L^{-1}) con el inhibidor de giberelina (PCa 0.5, 1 y 2 mg L^{-1}) resultó significativa en la producción de brotes en comparación con BAP solo.

REFERENCIAS

[1] IMPI. 2002. Declaración de protección a la denominación de origen sotol. Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. www.impi.gob.mx/impi/jsp/indice_all.jsp?OpenFile=docs/marco_i/sotol.htm

[2] Villavicencio G.E., Cano P.A., Juárez S.A. (2007). Guía para la micropropagación y producción in vitro de plantas de sotol *(Dasylirion cedrosanum* Trel.). Folleto Técnico No. 37, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Noreste. Saltillo,1-29.

[3] Ziauka, J., Kuusiené, S. (2010). "Different inhibitors of the gibberellin biosynthesis pathway elicit varied reaponses during in vitro culture of aspen (*Populus tremula* L.)". Plant Cell Tissue and Organ Culture, 102: 221-228.

[4] Rademacher, W. (2000). "Growth retardants: effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways". Annu Rev Plant Physiology Plant Molecular Biology, 51:501–531.

[5] Reyes,SAI., Morales M CF., Pérez R. ME., Pérez MBE. (2013) "Propagación *in vitro* de Nolináceas Mexicanas". Investigación y Ciencia 21(58):12-20.

[6] Murashige, T., Skoog F. (1962). "A revised medium for rapid growth ans bioenssays with tobacco tissue cultures", Physiology Plant, 15:473-497.

[7] Phillips, G.C., Collins, G.B. (1979). "In vitro tissue culture of selected legumes and plant regeneration of red clover", Crop Science, 19:59-64.

MICROPROPAGATION OF THREES VARIETIES OF NOPAL (*Opuntia ficus-indica* L.)

[Micropropagación de tres variedades de nopal (*Opuntia ficus-indica* L.)]

Hermila Trinidad García-Osuna[a*], Leticia Escobedo Bocardo[a], Francisca Ramírez Godina[a], Adalberto Benavides Mendoza [a+]

[a]Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Calzada Antonio Narro 1923, Saltillo Coah.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: abenmen@gmail.com

Área del conocimiento: Agrobiotecnología

ABSTRACT
Cytokinin and auxin have been a highly efficacious bioregulant of morphogenesis in the tissue culture of *Opuntia*. There are new plant growth retardants that are synthetic compouds, antagonistic to gibberellins and auxins, little has been investigated in tissue culture. The objective of the present research was to evaluate the effect of different media basal MS and PCL2, and concentrations of Benzylaminopurine (BAP) and Prohexadione-calcium (PCa) in the formation of buds from explants of three varieties of Nopal: Copena VI, Milapa Alta and Villanueva. The basal media were supplemented with the combination of BAP (0.0, 0.5, 1.0 mg L^{-1}) and PCa (0.0, 0.5 1.0 mg L^{-1}). The response was evaluated at 60 days after the addition of BAP and PCa. Maximum shoot regeneration was obtained on PCL2 in all varieties, with 0.05 mg L^{-1} BAP and 1.0 mg L^{-1} PCa with 12.28 shoot for explant in Villanueva.

Keywords: *Opuntia ficus-indica*; micropropagation; prohexadione-calcium; varieties.

RESUMEN
Las citocininas y auxinas han sido aplicados con éxito en la morfogénesis en cultivo de tejidos de nopal. Sin embargo existen nuevos retardantes de crecimiento sintéticos, antagonistas de las giberelinas y auxinas, que han sido poco investigados en cultivo de tejidos. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de diferentes medios basales MS y PCL2 y concentraciones de Bencilaminopurina (BAP) y Prohexadiona de Calcio(PCa) en la formación de brotes a partir de explantes de tres variedades de Nopal: Copena VI, Milapa Alta y Villanueva. Los medios basales fueron suplementados con la combinación de BAP (0.0, 0.5, 1.0 mg L^{-1}) y PCa (0.0, 0.5, 1.0 mg L^{-1}). La respuesta fue evaluada a los 60 días de la adición de los reguladores. El mayor número de brotes se presentó en medio PCL2 en todas las variedades en la combinación de 0.5 mg L^{-1} BAP y 1.0 mg L-1 de PCa con 12.28 brotes por explante en Villanueva.

Palabras clave: *Opuntia ficus-indica*, micropropagación, prohexadiona de calcio, variedades

INTRODUCCIÓN

El nopal (*Opuntia ficus-indica*) es una especie con interés agronómico que pertenece a la familia Cactaceae. México alberga la mayor variedad gracias a su domesticación desde épocas prehispánicas. En

nuestros días, es la especie de cactácea con mayor distribución en el mundo. Su importancia esta establecida por múltiples aplicaciones en el área ecológica, alimenticia, medicinal e industrial[1,2,3].
La propagación masiva en el género *Opuntia* se ha realizado de forma exitosa a través de organogénesis directa, indirecta y embriogénesis somática [4,5,6].
El proceso de la micropropagación depende de varios factores asociados al genotipo, tipo de medio de cultivo y reguladores de crecimiento. Los reguladores más usados tanto para la organogénesis y embriogénesis son BAP y ANA. Sin embargo, existen nuevos reguladores de crecimiento poco aplicados en la propagación masiva[7], tal es el caso de Prohexadiona de calcio. Este regulador es un inhibidor de la síntesis de giberelinas, presenta baja toxicidad y persistencia. Su aplicación en algunas plantas ornamentales y frutales favorece la morfogénesis al incrementar las citocininas en las yemas apicales[8], su efecto se observa principalmente en la disminución de la longitud del tallo y la distancia entre nodos, además incrementa la defensa contra patógenos.
El objetivo de este trabajo fue evaluar la aplicación de PCa en la micropropagación de tres variedades de nopal.

METODOLOGÍA

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Departamento de Fitomejoramiento de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Material vegetal

Se utilizaron cladodios de tres variedades de nopal: Copena, Milpa Alta y Villanueva.

Establecimiento del cultivo

Se utilizaron cladodios juveniles de 6-8 cm de longitud. Los cladodios fueron lavados en agua corriente y posteriormente se colocaron en agua jabonosa con hipoclorito de sodio al 2% por 45 m. En seguida se enjuagaron con agua corriente. Una vez en la campana de flujo laminar se colocaron en etanol al 70 % por un minuto y se enjuagaron en agua destilada estéril. Se continuó la asepsia con hipoclorito al 20 % por 20 m y se enjuagaron por 3 ocasiones con agua destilada estéril. Los cladodios se cortaron en piezas de 1 cm^2 conteniendo una areola. Se colocaron cuatro explantes por frasco en 20 ml de medio MS a mitad de su concentración suplementado con 100 mg L^{-1} de myo-inositol, 0.001 g L^{-1} de ácido nicotínico, 0.001 g L^{-1} de piridoxina-HCl, 0.001 g L^{-1} de tiamina-HCl, 0.002 g L^{-1} de glicina, 0.080 g L^{-1} de adenina, 30 L^{-1} de sacarosa y 4 g L^{-1} de phytagel a un pH de 5.7. Se colocaron 20 ml de medio de cultivo en cada frasco tipo gerber, los que posteriormente se esterilizaron en autoclave a 121ºC durante 20 minutos.
Los frascos se llevaron al cuarto de incubación a una temperatura de 25ºC $\pm$ 2ºC, con un fotoperíodo de 18 h luz durante cuatro semanas. Los explantes que crecieron asépticamente fueron subcultivados una vez más en medio MS con 2 mg L^{-1} de BAP y a 0.5 mg L^{-1} de ANA.

Micropropagación

Para esta etapa se utilizaron brotes obtenidos en la etapa de establecimiento. Los brotes se seccionaron transversalmente obteniendo explantes de aproximadamente 0.3 cm de longitud, con un promedio de 15 $\pm$ 2 areolas por explante, la parte apical fue descartada. Se estableció cada tratamiento con cinco repeticiones, cada repetición constó de cuatro explantes. Los tratamientos resultaron de la combinación de tres factores. Factor A: variedades de nopal (Copena, Milpa Alta y Villanueva); Factor B: medios nutritivos (Murashige and Skoog (MS) y PCL2); el Factor C: BAP (0.0, 0.5, 1,0 mg L^{-1}) y el Factor D: Prohexadiona de calcio (0.0, 0.5, 1.0 mg L^{-1}).

Análisis estadístico

Este experimento se estableció bajo un diseño completamente al azar con arreglo factorial. Los resultados de las variables se sometieron a un análisis de varianza y a la prueba de comparación de medias de Tukey (P 0.05) cada tratamiento consistió en cuatro explantes replicado cinco veces.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 1-3. Indican que el mejor medio fue PCL2 y el tratamiento (6) con mayor cantidad de brotes por explante fue la combinación de 0.5 mg L^{-1} de BAP y 1.0 mg L^{-1} de PCa en las tres variedades, seguida por el tratamiento(9 y 5) con la combinación de 1 mg L^{-1} de BAP mas 1.0 mg L^{-1} PCa y 0.5 mg L^{-1} BAP más 0.5 PCa mg L^{-1} respectivamente. Los tratamientos T8, T3 y T2 fueron estadísticamente iguales. Los tratamientos con menor respuesta fueron: T4, T7 y T1, los que no contenían PCa.

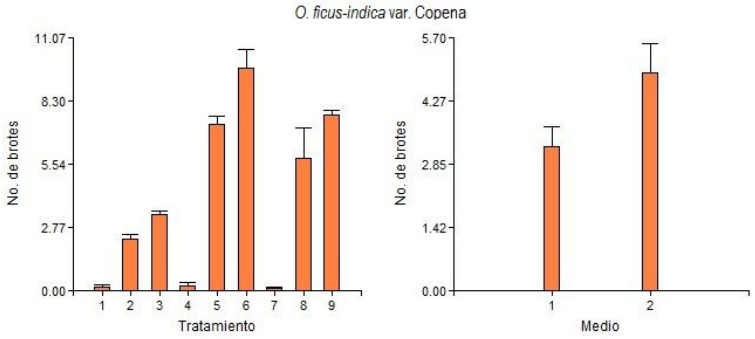


Figura 1. Efecto de la combinación de reguladores de crecimiento BAP y PCa (T1-T9) y del medio 1=MS y 2 = PCL2 en la producción de brotes de Nopal variedad Copena.

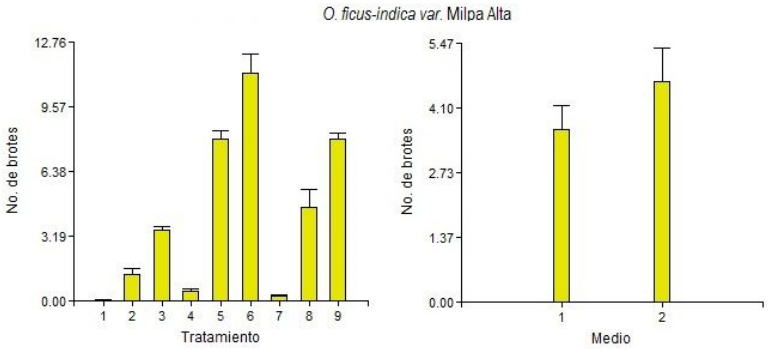


Figura 2. Efecto de la combinación de reguladores de crecimiento BAP y PCa (T1-T9) y del medio 1=MS y 2 = PCL2 en la producción de brotes de Nopal variedad Milpa Alta.

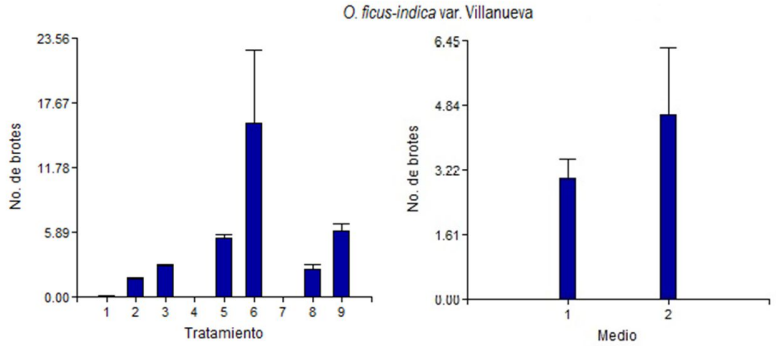


Figura 3. Efecto de la interacción de los reguladores de crecimiento BAP y PCa (T1-T9) y del medio 1=MS y 2 = PCL2 en la producción de brotes de Nopal variedad Villanueva.

La respuesta entre variedades no presentó diferencia estadística.

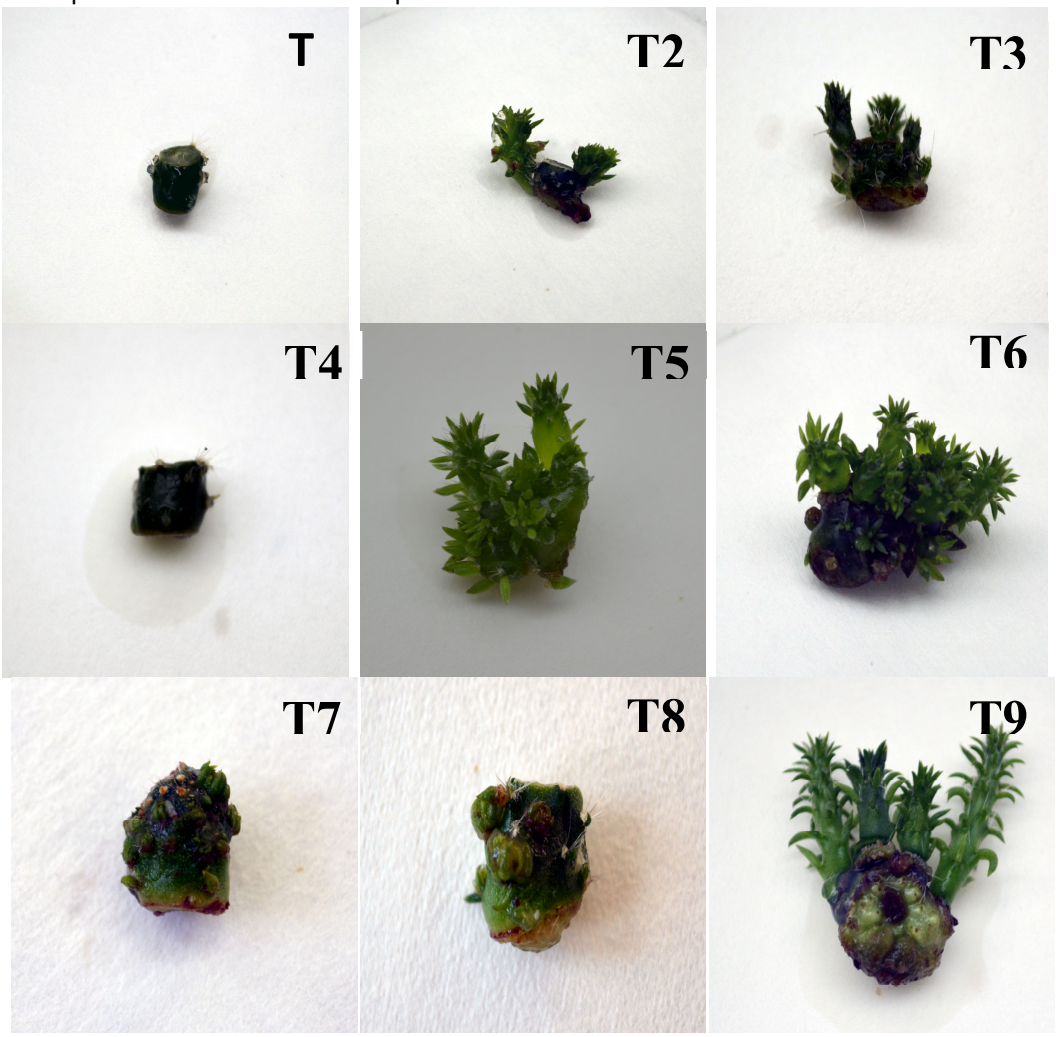


Figura 4. Respuesta morfogenética de la variedad Villanueva bajo los 9 tratamientos en medio PCL2.

DISCUSIÓN

Los reguladores de crecimiento son los factores mas importantes involucrados en la regulación del desarrollo vegetal bajo condiciones *in vitro*. La aplicación de PCa en combinación con BAP favoreció la activación de las areolas al romper la dominancia apical. La tasa de multiplicación es equiparable a los resultados obtenidos por otros autores[5], incluso para la variedad Villanueva obtenida por García-Saucedo[6], mientras que fue mayor a lo reportado por otros autores [4].

En cactáceas, el uso de reguladores de crecimiento produce la activación de las areolas. En algunos casos se ha observado la formación de múltiples brotes a partir de una areola, mientras en otros [9, 10] se menciona que la activación de la areola generalmente produce un brote por explante. En este último punto se confirma la formación de 1 brote por explante. Como está ampliamente documentado, la formación de múltiples brotes (14-15) se obtiene con altas concentraciones de BAP en ausencia de auxinas. Sin embargo, en la presente investigación se obtuvo mayor brotación con una concentración baja de BAP (0.5mg L^{-1}) en combinación con PCa, probablemente porque este regulador promueve el incremento de citocininas endógenas [7].

El medio con mejores resultados fue PCL2, este ha sido utilizado favorablemente en la micropropagación de la familia Cactaceae[11]. En las plantas, el N se requiere principalmente para la síntesis de proteínas tanto estructurales como enzimáticas. La absorción de distintas formas de N depende del contexto fisiológico de desarrollo y medioambiental. El medio PCL2 contiene una mayor cantidad de Nitrato, el cual favorece la absorción de cationes como el Calcio, elemento necesario en especial para especies calcícolas, además de Mg, Na K, Co, Cu y Mo.

CONCLUSIONES

El mejor medio fue PCL2 y la combinación de BAP y PCa incrementó la respuesta morfogenética al bloquear la dominancia apical y activar las yemas axilares favoreciendo la formación de brotes.

REFERENCIAS

[1] Mondragón J, C., Pérez, G, S.(2003). El nopal (*Opuntia spp*.) como forraje. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Estudio FAO. Producción y Protección vegetal No. 169. 172.

[2] Lee, Y. C., Pyo, Y. H., Ahn, C. K., Kim, S. H. (2005). "Food functionality of *Opuntia ficus-indica* var. cultivated in Jeju Island", Journal of Food Science and Nutrition, 10(1): 103-110.

[3] El-Mostafa, K., El Kharrassi, Y., Badreddine, A., Andreoletti, P., Vamecq, J., El Kebbaj, M., Latruffe, N., Lizard G., Nasser, B., Cherkaoui-Malki, M. (2014). "Nopal cactus (*Opuntia ficus-indica*) as a source of bioactive compounds for nutrition, health and disease" , Molecules, 19(9): 14879-14901.

[4] Angulo-Bejarano, P.I., Paredes-López, O. (2011). "Development of a regeneration protocol through indirect organogenesis in prickly pear cactus (*Opuntis ficus-indica* (L.) Miller)", Scietia Horticulturae 128:283-288.

[5] El Finti, A., El Boullani, R., El Ayadi, F., Aabd, N.A., El Mousadik, A. (2012). "Micropropagation in vitro of *Opuntia ficus-Indica* in south of Morocco", IJCBS (1): 6-10.

[6] García-Saucedo, P. A., Valdez-Morales, M., Valverde, M. E., Cruz-Hernández A., Paredes López O. (2005). "Plant regeneration of three *Opuntia* genotypes used as human food" Plant Cell Tissue and Organ Culture, 80:215-219.

[7] Ziauka J., Kuusiené, S. (2010). "Different inhibitors of the gibberellin biosynthesis pathway elicit varied reaponses during in vitro culture of aspen (*Populus tremula* L.)", Plant Cell Tissue and Organ Culture, 102: 221-228.

[8] Rademacher, W. (2000). "Growth retardants: effects on gibberellins biosynthesis an other metabolic pathway", Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 51:501-531

[9] Retes-Pruneda, J.L., Valadez-Aguilar, M. L., Pérez-Reyes, M. E., Pérez-Molphe-Balch, E. (2007). "Propagación in vitro de especies de *Echinocereus, Escontria, Mammillaria, Melocactus y Polaskia* (Cactaceae)", Boletín de la Sociedad Botánica de México, 81: 7–16.

[10] Mohamed-Yasseen, M. (2002). "Micropropagation of pitaya (*Hylocereus undatus* Britton et Rose)", In vitro Cellulat and Developmental Biology Plant, 38:427-429

[11] Clayton P., Hubstenbert J., Phillips G., Butler S. (1990). "Micropropagation of members of the Cactaceae Subtride Cactinae". HortScience, 115: 337-343.

EFFECT OF THE INTERACTION BETWEEN ORGANIC FERTILIZER AND MYCORRHIZAL INIFAP IN GROWING *Stevia rebaudiana*

(Efecto de la interacción entre abonos orgánicos y micorriza INIFAP en el crecimiento de *Stevia rebaudiana*)

Mónica Guadalupe Lozano-Contreras[+*a], Genovevo Ramírez-Jaramilo[b], Rodrigo Cauich-Cauich[a]

[a]Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campo Experimental Mocochá
[b]INIFAP-CIRSE. Centro de Cooperación para el desarrollo de los trópicos

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: lozano.monica@inifap.gob.mx

Área del Conocimiento: Agrobiotecnología.

ABSTRACT
Stevia rebaudiana has become important in a very short period, currently applied technologies are focused on the use of inorganic fertilizers and agrochemicals, which implies a risk of contamination to the environment and those who directly consume the leaf. An alternative to reduce the risk for contamination of groundwater and soil degradation is the use of organic fertilizers and bio-fertilizers. The purpose of this study was to evaluate the influence of arbuscular mycorrhizal *Rhizophagus intraradices* in combination of various organic fertilizers on the development and performance *S. rebaudiana*, under a less harmful to the environment management. Five treatments a) bocashi 15 ton / ha + *R. intraradices*-INIFAP; b) sheep manure 15 ton / ha + *R. intraradices*-INIFAP; c) chicken manure (15 ton / ha + *R. intraradices*-INIFAP d) a control soil without fertilizer and without biofertilizer. The study treatments were distributed in a randomized block design. According to the results, the combination of *R. intraradices*-INIFAP and organic fertilizers are effective production per hectare of fresh leaf, the highest yield was introduced in the treatment *R. intraradices*-INIFAP + sheep manure y *R. intraradices*-INIFAP + bocashi (1140 y 900 kg/ha^{-1} respectively), the first cut.

Keywords: *Stevia rebaudiana*, bio-fertilizer, manure, organic nutrition

RESUMEN
Stevia rebaudiana ha cobrado gran relevancia en un periodo muy corto, actualmente las tecnologías que se aplican se enfocan al empleo de agroquímicos y fertilizantes inorgánicos, lo que implica un riesgo de contaminación al medio ambiente y para quienes consumen de forma directa la hoja. Una alternativa para disminuir el riesgo por contaminación de los mantos freáticos y la degradación de los suelos es el uso de abonos orgánicos y de biofertilizantes. El propósito del presente estudió, fue evaluar la influencia de la micorriza arbuscular *Rhizophagus intraradices* en combinación de diversos abonos orgánicos sobre el desarrollo y rendimiento *S. rebaudiana*, bajo un manejo menos nocivo al medioambiente. Se establecieron cinco tratamientos a) bocashi 15 ton/ha + *R. intraradices*-INIFAP; b) borregaza 15 ton/ha + *R. intraradices*-INIFAP; c) gallinaza (15 ton/ha + *R. intraradices*-INIFAP y d) un testigo suelo sin abono y sin biofertilizante. Los tratamientos bajo estudio fueron distribuidos en un diseño de bloques al azar. De acuerdo a los resultados obtenidos, la combinación de *R. intraradices*-INIFAP y abonos orgánicos son efectivos para la producción por hectárea de hoja fresca, el mayor rendimiento se presentó en el

tratamiento *R. intraradices*-INIFAP + borregaza y *R. intraradices*-INIFAP + bocashi (1140 y 900 kgha^{-1} respectivamente), al primer corte.

Palabras Clave: *Stevia rebaudiana*, biofertilizante, abono orgánico, nutrición orgánica

INTRODUCCIÓN

S*tevia rebaudiana* es una planta originaria de la cordillera de Amambay ubicada entre el sur de Brasil y el norte de Paraguay, región donde se ubican los indios guaranís y cuya planta consumen desde tiempos ancestrales conocida en su dialecto como Ka'a He'ë o hierba dulce. Esta planta tiene la característica de producir un edulcorante natural 300 veces más dulce que sacarosa y se ha perfilado como alternativa para el establecimiento de plantaciones comerciales en todo el país [1]. Para los productores de México es un cultivo innovador y muy rentable, presentando condiciones promisorias del mercado tanto nacional como internacional. El consumo ya sea como hierba o como productos industrializados, derivados de esta especie vegetal, se presenta muy interesante, pues está destinada a sustituir el uso de edulcorantes sintéticos como el Aspartame, Sacarinas, Ciclamatos, etc., productos que cada vez son más cuestionados por presentar riesgos para la salud de los usuarios [2]. Sin embargo la producción actualmente se lleva a cabo con programa de nutrición química complementaria, debido a que en la mayoría de los casos los suelos donde se cultiva no cuentan con la reserva nutrimental necesaria para suministrar al cultivo la cantidad de nutrientes requerida para expresar su potencial. Al respecto, se ha observado que los requerimientos nutricionales varían de acuerdo al tipo de suelo [3], la oferta ambiental de cada región [4] y la relación que existe entre el suministro de nutrientes y la producción de materia seca [5].

En el caso de control de plagas y enfermedades también emplean productos químicos para el control de enfermedades que atacan a esta planta en la fase de almacigo y una vez establecida donde se aplican diversos fungicidas. En el mundo, la tendencia por el consumo de productos libres de residuos tóxicos, sanos y amigables al ambiente es cada vez mayor, en el caso particular de la estevia es importante lograr una producción inocua, debido a que lo se consume directamente es la hoja. Es necesario que la producción y manejo de este cultivo se realicen aplicando tecnologías más amigables con el medio ambiente y la salud humana. Una posible manera de disminuir los impactos negativos ambientales resultantes del uso continuo de fertilizantes inorgánicos es la inoculación con biofertilizantes, como por ejemplo los hongos micorrízicos arbusculares [6] y el uso de abonos orgánicos, los cuales aparte de tener micro y macronutrientes, mejoran la estructura del suelo y disminuyen la erosión edáfica, además de favorecer la retención de la humedad en el suelo y ejercer un efecto regulador sobre la temperatura del suelo [7]. Por lo anterior, el propósito del presente estudió fue evaluar el efecto de abonos orgánicos-biofertilizante en el primer ciclo de desarrollo de *S. rebaudiana*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el Sitio Experimental Uxmal, localizado en el municipio de Muna, Yucatán, México (20°29´08.1" de latitud norte y 89°24´39" de longitud oeste, a una altitud de 50 msnm), perteneciente al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). La parcela se estableció en suelo Luvisol. Se emplearon esquejes de *S. rebaudiana* variedad criolla; de la planta madre se cortaron esquejes de aproximadamente 12 cm de largo de apariencia sana y sin heridas, estos se prepararon para su posterior inoculación el mismo día. Todos los esquejes fueron sumergidos en una solución con 0.7 g·L^{-1}de auxinas [ácido naftalenacético (ANA) y ácido Indolbutírico

(AIB)] y fósforo como enraizador durante 1 min, posteriormente se sumergieron otro minuto en una solución que contenía 1 L de agua con 150 g del hongo micorrízico arbuscular (HMA) *R. intraradices* micorriza-INIFAP (≥60 esporas g^{-1}) perteneciente a la colección nacional del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). El inóculo del HMA se incrementó mediante el sistema de camas reproductoras con raíces de *Sorghum vulgare sudanensis* Hicth [8]. Posterior a la inoculación se sembraron en un sustrato agrícola (Peat Foam®), la cual se humedeció previamente y se puso en charolas de unicel de 200 cavidades, donde se mantuvieron por 45 días.

Los tratamientos evaluados fueron: a) bocashi + *R. intraradices*; b) borregaza + *R. intraradices*; c) gallinaza + *R. intraradices* y d) un testigo suelo sin abono y sin inoculación de *R. intraradices*-INIFAP. Todos los tratamientos con abonos orgánicos se aplicaron a razón de 15 t ha^{-1} [9-11]. Los tratamientos bajo estudio fueron distribuidos en un diseño de bloques completos al azar.

Manejo agronómico. Los abonos se adicionaron 15 días antes del trasplante y se colocó acolchado plástico color plata/negro de 100 µ de espesor. Por debajo del acolchado se colocó el sistema de riego por goteo en doble hilera con emisores cada 20 cm y un gasto por gotero de un litro por hora de riego. No se presentaron problemas de plagas, aunque se presentaron algunas enfermedades fungosas causadas por *Alternaria* sp. y *Fusarium* sp. las cuales fueron controladas con sulfato de cobre pentahidratado en dosis de 3 mL L^{-1}. Se realizó una poda de formación a los 15 días después del trasplante y la cosecha se llevó a cabo a los dos meses posteriores al trasplante.

Variables evaluadas. Se midió la altura de 10 Plantas por parcela un flexómetro graduado en centímetros, peso en fresco de hoja por planta y rendimiento de hoja al primer corte en kg ha^{-1} (65 dds). Con la finalidad de determinar el peso seco de hoja y tallo, las muestras se sometieron a un secado en una estufa de desecación con circulación por aire forzado (Thelco Oven, de Thermo Scientific®), a una temperatura de 60°C durante 24 h. Para rendimiento se consideró el peso en fresco de toda la parcela útil por repetición. Análisis estadístico. Los datos obtenidos fueron analizados mediante el programa estadístico SAS (SAS Institute, 2004), con el procedimiento ANOVA y las medias fueron comparadas por la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

RESULTADOS

65 días después de la siembra, se observaron diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0.05$) entre los tratamientos inoculados con *R. intraradices*-INIFAP más la fertilización con abonos orgánicos. Se observó una relación positiva en los tratamientos que fueron inoculados previamente con *R. intraradices*. La combinación del abono orgánico de borregaza más *R. intraradices* registro una altura de 15.14 cm, mientras que la más baja fue el testigo con una altura de 11.38 cm (Tabla 1). En el caso de las características de peso fresco de hoja y tallo, todos los tratamientos fueron influenciados significativamente por la combinación de *R. intraradices*-INIFAP y los abonos orgánicos. Los tratamientos más sobresalientes para hoja en fresco fueron *R. intraradices*-INIFAP + borregaza, seguido de *R. intraradices*-INIFAP + gallinaza (19 y 15, respectivamente g ha^{-1}) (Cuadro 1).

Tabla 1. Efectos de los tratamientos en el desarrollo de *Stevia rebaudiana* Bertoni en el material Criollo de Paraguay, 65 días después de la siembra (dds) en respuesta a abonos orgánicos en suelos luvisoles del estado de Yucatán.

Rendimiento (kg/ha^{-1}) al primer corte 65 dds. Los datos indicaron diferencias significativas entre los tratamientos (P≤0.05) con respecto al rendimiento de la hoja, entre las plantas que fueron inoculadas con *R. intraradices*-INIFAP (Figura 1). El rendimiento máximo de la hoja fresca en el Tratamiento *R. intraradices*-INIFAP + borregaza (1140 Kg ha^{-1}) y *R. intraradices*-INIFAP + gallinaza (900 Kg/ha^{-1}) al primer corte, se puede correlacionar a la mayor altura de la planta que se presentó. En comparación con el Testigo (464 Kg/ha^{-1}), donde la emisión de hoja fue menor y de baja calidad. Mientras que la producción de hoja seca, fue mayor en *R. intraradices*-INIFAP + bocashi (270 Kg/ha^{-1}) y *R. intraradices*-INIFAP + borregaza (246 Kg/ha^{-1}), con relación al testigo (168 Kg/ha^{-1}).

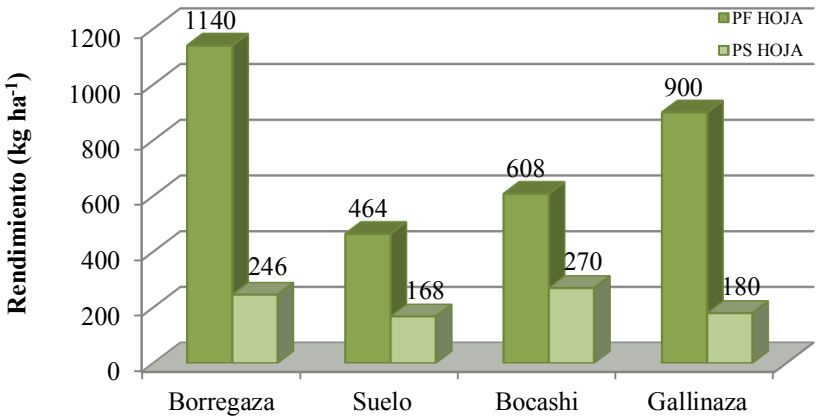


Figura 1.

TRATAMIENTOS		*VARIABLES*	
		AP (cm)	*PF HOJAS (g)*
R. intraradices-INIFAP	*Borregaza*	15.14a	19.0a
	Suelo	13.00ab	7.73c
	Bocashi	14.78a	10.14bc
	Gallinaza	11.38b	15.00ab

Rendimiento al primer corte (65 dds) de *Stevia rebaudiana* Bertoni, inoculada con Micorriza-INIFAP.

DISCUSIÓN

La variedad criolla está constituida por una mezcla de varios tipos de plantas (varios genotipos), que varían en sus características morfológicas y fenológicas. En su conjunto presenta un porte bajo, llegando a alcanzar un promedio de altura de 60 cm, esto en combinación con la variación en la época de siembra y la densidad de plantas [12], que pudieron afectar el crecimiento óptimo de la planta en este estudio, el cual se estableció durante el ciclo de O-I. La estevia es una planta de día corto y su floración se presenta durante los meses de septiembre a diciembre [13], en el caso de la variedad criolla esta presenta una abundante floración en comparación a otras variedades, lo que afecta considerablemente la presencia de follaje como se apreció en este estudio, otro factor es el reportado por Jarma *et al.*, [14], donde la presencia de altos niveles de radiación puede incrementar significativamente la biomasa de las hojas con respecto a la del tallo. Otros estudios relacionados [15] se sugiere que el crecimiento máximo obtenido en plantas de estevia, puede ser atribuido a la función de la mezcla de abonos orgánicos y biofertilizantes al tener mejor movilización de nutrientes en la planta, como en este caso donde la producción fue significativamente favorecida debido a los abonos y la micorriza utilizada.

CONCLUSIONES

La inoculación de *S. rebaudiana* Bertoni con *Rhizophagus intraradices* y la aplicación de abonos orgánicos promueven mayor desarrollo de plantas y una mejor nutrición. La combinación de *R. intraradices*-INIFAP + borregaza, son una alternativa positiva para incrementar el rendimiento de Stevia.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo recibido de la SAGARPA a través del proyecto “Investigación y transferencia de tecnología sobre el empleo de biofertilizantes y abonos orgánicos en la agricultura”

REFERENCIAS

[1] Soria-Ruiz J., Fernández-Ordoñez, Y. M., Sotelo-Ruiz, E. D., Medina-García, G., May-Lara, C., Ramírez-Jaramillo, G. (2013). Producción de stevia (*Stevia rebaudiana*, Bertoni) en el Estado de México. Memorias del VII Simposio Internacional de Stevia. Mérida, Yucatán. México. 214.

[2] Ramírez-Jaramillo, G., May-Lara, C., Moguel-Ordoñez, Y. (2013). Determinación del potencial Productivo de *Stevia rebaudiana* Bertoni, en México. Memorias del VII Simposio Internacional de Stevia. Mérida, Yucatán. México. 158.

[3] Yan, X., P. Wu, H. Ling, G. Xu, F. Xu y Q. Zhang. (2006). Plant nutriomics in China: An overview. *Ann. Bot*. (98), 473-482.

[4] Jarma Orozco, Alfredo. (2008). Estudios de adaptación y manejo integrado de estevia (*Stevia rebaudiana* Bert.): nueva alternativa agroindustrial del Caribe colombiano. Una revisión. *Rev. Colomb. Cienc. Hort*. (2), 109-120.

[5] Marschner, H. (2002). Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, New York, NY., 280-286.

[6] Adesemoye, A.O., Torbert, H.A. and J.W. Kloepper. (2009). Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. *Microbiol. Ecol*. (58), 921-929.

[7] Shintani M, Leblanc H, Tabora P. (2000). Bokashi, abono orgánico fermentado; Tecnología Tradicional Adaptada para una Agricultura Sostenible y un Manejo de Desechos Modernos. (1 ed.). Escuela de Agricultura de la Región Tropical Humedad. San José, Costa Rica.: 14-25.

[8] Díaz, A., Garza, I., Pecina, V., Monte, N. (2008). Respuesta del sorgo a micorriza arbuscular y *Azospirullum* en estrés hídrico. *Revista Fitotecnia Mexicana*. (31), 24-42.

[9] Vieira, M.C., Rodrigues, W.B., Zárate, N.A.H., Ramos, D.D., Luciano, A.T., Gonçalves, W.V., Carnevali, T.O. (2012). Produção da fáfia [Pfaffia glomerata (Spreng.) Pedersen] com cama-de-frango e fósforo incorporados ao solo. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*. (14), 235-241.

[10] Parra-Delgado, J. M., T. J. Velázquez-Alcaraz, E. Quero-Gutiérrez, L. Partida-Ruvalcaba, T. Díaz-Valdés, B. Galván-Piña y F. Ayala-Tafoya. (2014). Uso de composta, minerales primarios amorfos y microrganismos para la producción y calidad de tomate. *Revista Intropica*. (9), 102 – 110.

[11] De la Cruz, L. E., Osorio, O. R., Martínez, M. E., Lozano del Rio, A. J., Gómez, V. A., Sánchez, H. R. (2010). Uso de compostas y vermicompostas para la producción de tomate orgánico en invernadero. *Interciencia*. 35(5), 363-368.

[12] Jarma Orozco, A., Araméndiz Tatis, H., Leguízamo, A.C. (2011). Estabilidad fenotípica y densidades de planta de genotipos de estevia (*Stevia rebaudiana* Bert.) en la región Caribe de Colombia. *Acta Agronómica*. (60) 165-175.

[13] Yadav A K, Singh S., Dhyani, D., Ahuja, P.S. (2011). A review on improvement of stevia. *Can. J. Plant Sci*. (91), 1-27.

[14] Jarma Orozco, A., Rengifo, T., Araméndiz-Tatis, H. (2005). Aspectos fisiológicos de estevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) en el Caribe colombiano: I. Efecto de la radiación incidente sobre el área foliar y la distribución de biomasa. *Agron Colombiana*, (23), 207-216.

[15] Umesha, K., Smitha, G.R., Sreeramu, B.S., Waman, A. A. (2011). Organic manures and bio-fertilizers effectively improve yield and quality of stevia (*Stevia rebaudiana*). *J. Appl. Hort*. (13), 157-162.

SALICYLIC ACID AND CHITOSAN EFFECT ON SEEDLING PRODUCTION OF POBLANO PEPPER (*Capsicum annuum* L.)

Marisol Hernández [a*+], José Ángel Robles Cervantes[b], Hugo Cesar Cisneros López[b], Silvano Ochoa Galaz[b], Julio Cesar León Vargas, Raúl René Robles Lacayo[b]. Luis Patricio Guevara Acevedo[b]

[a] Estudiante de Ingeniería en Innovación Agrícola Sustentable, Instituto Tecnológico de Roque
[b] Instituto Tecnológico de Roque

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: roca.8692@gmail.com

Área del Conocimiento: Agrobiotecnología

ABSTRACT
Poblano pepper production (*Capsicum annuum*) in Guanajuato state in February and March reach the best prices in the market due to limitations like low temperatures at production areas. Having quality seedlings with good resistance to abiotic stress will decrease seedling losses at post transplanting period. Elicitor application in seedlings improves resistance to low temperatures stress. Therefore the objective of this investigation was to evaluate the effect of elicitors in poblano pepper seedling production under low temperature stress. The 3H variety (Harris-Moran®) was planted in a microtunnel of commercial seedling production on December 2014 in polyethylene trays with 338 cavities and 7.5 mL volume, elicitors were applied 15 days after the trays were placed in the greenhouse with a completely random design with 10 repetitions and a check with adherent application, the experimental unit consisted in a single plant. Elicitors used were salicylic acid (AS) with 10^{-4}, 10^{-5} y 10^{-6} µM and chitosan (Q) with 1, 67 and 100 $\mu g mL^{-1}$ doses and with 1% Bionex® as adherent with manual application each 8 days during 4 weeks, one tray was used for each treatment. Variables evaluated were total plant length, stem length, root length, stem diameter, fresh weight, chlorophyll content and dry weight. Evaluations were done twice a week. Agronomic variable results were submitted to a variance analysis and a main comparison (Tukey, $\alpha = 0.05$). Q applications at 67 µg mL^{-1} dose every 8 days on poblano pepper seedlings increased plant length, stem length, root length and biomass.

Keywords: Elicitors, seedling, chitosan, salicylic acid.

EVALUATION OF AN ORGANIC FERTILIZER PRODUCED IN CIAD MAZATLAN PERFORMANCE ON CULTIVATION Zinnia (*Zinnia elegans*)

[Evaluación de un abono orgánico producido en CIAD Mazatlán sobre el rendimiento en el cultivo de Zinnia (*Zinnia elegans*)]

Cynthia Lizeth Jocobi-Aguilar[a*], María Carolina Ceballos-Bernal[a+], Miguel Ángel Sánchez-Rodríguez[a], Virginia Guadalupe Ramírez-Lizarraga[a]

[a] Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Unidad Mazatlán

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: carolinac@ciad.mx

Área del Conocimiento: Agrobiotecnología.

ABSTRACT
Organic agriculture is becoming more extensive in the agricultural sector for their beneficial advantages, such as reducing environmental pollution and for economic reasons, since you can get biofertilizer by a traditional way, using the resources that farmers have on their farms. Flowers, like other crops, require proper management to achieve high yields and crop quality. This research was conducted at the Center for Food Research and Development, AC, in order to determine the quality of biol produced, evaluate different biol dose and the use of organic fertilizer and commercial chemical fertilizer on performance culture Zinnia (Zinnia elegans), and compare them. Biol was measured: temperature, pH, organic matter, manganese, copper, zinc, nitrogen, phosphorus, salmonella, helminth eggs, total and fecal coliforms. The treatments used were T1 (Biol 1: 1), T2 (Biol 1: 3), T3 (Biol 1: 5), T4 (Bio Marine), T5 (Fertiplus) and T6 (water) with a daily application of 300 mL per plant. The variables evaluated on the crop were germination time, stem height, number of leaves, formation of button and flower diameter. The T1, reached the highest altitude (43 ± 8.30 cm) and diameter of the button (4.10 ± 0.09 cm) so it was considered the best fertilizer with respect to others and was the dilution that obtained the best results. The other two dilutions respect to biol T2 and T3, also showed favorable results but in lower percentage. The use of biological contributes to improving the quality of production, with an emphasis on stem height and diameter of the flower, physiological processes influenced by plant hormones and other factors which can be found naturally in this fertilizer.

Keywords : organic agricultura; ornamental plants; biol.

RESUMEN
La agricultura orgánica es cada vez más extensiva en el sector agrícola por sus beneficiosas ventajas, como son disminuir la contaminación ambiental y por razones económicas, ya que se puede obtener biofertilizante de una manera artesanal, aprovechando los recursos que posee el agricultor en sus granjas. Las flores, al igual que otros cultivos, requieren de un adecuado manejo para lograr altos rendimientos y calidad en las cosechas. La presente investigación se realizó en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., con la finalidad de determinar la calidad del biol producido, evaluar diferentes dosis de biol y el uso de un abono orgánico y un abono químico comercial sobre el rendimiento en el cultivo de Zinnia (*Zinnia elegans*), y compararlos. Al biol se le midió: temperatura, pH,

materia orgánica, manganeso, cobre, zinc, nitrógeno, fosforo, salmonella, huevos de helmintos, coliformes totales y fecales. Los tratamientos utilizados fueron T1 (Biol 1:1), T2 (Biol 1:3), T3 (Biol 1:5), T4 (Bio marine), T5 (Fertiplus) y T6 (agua) con una aplicación diaria de 300 mL por planta. Las variables evaluadas sobre el cultivo fueron tiempo de germinación, altura del tallo número de hojas, formación del botón y diámetro de la flor. El T1, alcanzo mayor altura (43 ± 8.30 cm) y diámetro del botón (4.10 ± 0.09 cm) por lo que se consideró el mejor fertilizante con respecto a los demás y fue la dilución que obtuvo los mejores resultados. Las otras dos diluciones respecto al biol el T2 y T3, también mostraron resultados favorables pero en menor porcentaje. El uso del biol contribuye a mejorar la calidad de la producción, con énfasis en la altura del tallo y diámetro de la flor, procesos fisiológicos influenciados entre otros factores por fitohormonas las cuales se pueden encontrar de manera natural en este fertilizante.

Palabras Clave: Agricultura orgánica, biofertilizante, plantas de ornato; biol.

INTRODUCCIÓN

En México, la producción de plantas de ornato es de aproximadamente 7 mil hectáreas y se concentra en siete estados: Distrito Federal, Morelos, Michoacán, Puebla, Guerrero, Veracruz y Colima. Sinaloa, se considera un importante estado demandante de flores y plantas de ornato que necesitan ser traídas del centro del país, lo que representa un alto costo. La riqueza que poseen los suelos de Sinaloa y la gran diversidad de climas existentes son un buen potencial para producir flores con la eficacia y calidad que el mercado estatal requiere, sin embargo se requiere de estrategias para fortalecer la búsqueda y validación de paquetes tecnológicos para especies de plantas de ornato que el mercado sinaloense demanda. Dentro de las posibles causas por las que no se cultivan plantas de maceta en el estado de Sinaloa están: la falta de conocimiento sobre su propagación, manejo y comercialización; la idea de que los climas tropicales o semitropicales no son aptos para producirlas [1].

El autor considera que el cambio del uso de los abonos orgánicos por los abonos químicos en la fertilización de cultivos, actualmente está propiciando que el suelo sufra de un agotamiento acelerado de materia orgánica y de un desbalance nutrimental, con el tiempo pierda su fertilidad y capacidad productiva. Además, el uso inadecuado de fertilizantes químicos o el abuso de ellos, sin tomar en cuenta la falta de otros nutrimentos que limitan la productividad de los cultivos, conduce al surgimiento de problemas del medio ecológico y al deterioro de otros recursos naturales. Los abonos orgánicos (residuos de origen animal y vegetal), por las propias características en su composición son formadores de humus y enriquecen al suelo con este componente, modificando algunas de las propiedades y características del suelo como su reacción (pH, disponibilidad de fosforo, calcio, magnesio y potasio, y desde luego la población microbiana, haciéndolo más propio para el buen desarrollo y rendimiento de los cultivos [2].

En toda actividad agropecuaria se produce una cantidad considerable de desechos orgánicos, que al no ser manejados adecuadamente, contaminan el ambiente alterando el ecosistema y la calidad de vida de la población. Para mejorar esta situación, se prevé la aplicación de nuevas tecnologías que permitan el tratamiento y procesamiento de los desechos orgánicos convirtiéndolos en excelentes productos que servirán para renovar y conservar los suelos, mejorar la productividad de los cultivos y la calidad ambiental [3].

La técnica empleada para mejorar esta situación es la utilización de los biodigestores, llamado también fermentador o biorreactor, el cual es un contenedor cerrado, hermético o impermeable donde se

pueden multiplicar microorganismos en forma anaerobia o aerobia, con el propósito de aumentar la biomasa a fin de producir un metabolito de interés o de realizar la bioconversión de una molécula de interés [4].

CIAD Mazatlán a través de su programa institucional "Veta Verde", realizo la instalación y operación de un biodigestor para llevar a cabo la transformación de sustratos orgánicos, en gas metano y biol, que puedan ser utilizados, el primero, como fuente de energía, el segundo, como fertilizante de áreas verdes. Por tal motivo, se realizó la presente investigación con la finalidad de evaluar el biol sobre el rendimiento en el cultivo de plantas de ornato, así como un fertilizante orgánico y químico (ambos adquiridos de manera comercial).

METODOLOGÍA

El trabajo de investigación se realizó en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., ubicado en Mazatlán, Sinaloa.

Para la evaluación del biol producido en la institución se llevaron a cabo varios tratamientos los cuales incluyeron biol diluido con agua potable de la ciudad de Mazatlán: T1 (Biol 1:1), T2 (Biol 1:3), T3 (Biol 1:5), el uso de un fertilizante orgánico comercial: T4 (Bio marine), el uso de un fertilizante químico comercial: T5 (Fertiplus) y un control: T6 (agua potable de Mazatlán), con una aplicación diaria de 300 mL por planta. La duración del bioensayo fue de 60 días.

Para comprobar la calidad del biol se tomó una muestra, llevando a cabo una serie de análisis físico-químicos y microbiológicos. Los parámetros analizados fueron los siguientes: temperatura, pH, materia orgánica, calcio, manganeso, cobre, zinc, nitrógeno, fosforo, salmonella, huevos de helmintos, coliformes totales y fecales, siendo importante señalar que los análisis al biol se hicieron en la dilución 1:1.

La siembra de semillas de zinnia se realizó de la siguiente manera:

Se colocó el sustrato en la bolsa de siembra y reservando una pequeña cantidad para tapar las semillas.

1. Las semillas se colocaron a una profundidad no mayor a 1 cm, se cubrieron con una capa ligera del mismo sustrato; se regaron dos o tres veces por semana y se colocaron en un lugar sombreado.
2. Una semana después aparecieron las primeras hojas cotiledones (las hojas primordiales que se encuentran en el germen de la semilla).
3. Posteriormente cuando las plántulas tuvieron un par de hojas verdaderas, se sacaron a la luz directa para fortalecer su desarrollo.

Las variables evaluadas sobre el rendimiento en el cultivo fueron tiempo de germinación, altura del tallo número de hojas, formación del botón y diámetro de la flor.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en la presente investigación fueron los siguientes:

a) Evaluación de la calidad del fertilizante orgánico "biol" mediante análisis fisicoquímicos y microbiológicos

En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos de los análisis realizados al biol en la dilución 1:1, donde se pueden observar que los coliformes totales y fecales sobrepasan los límites permisibles de la norma, fosforo y nitrógeno obtuvieron valores muy bajos.

Tabla 1. Concentración de parámetros físicos, químicos y microbiológicos en el biol producido en CIAD Mazatlán.

Parámetros	Promedio	Límites permisibles
pH	7.7 ± 0.0	6.7 – 8[1]
C.T., NMP/100 mL	7,500	2,000[2]
C.F., NMP/100 mL	2,400	2,000[2]
% Fosforo	0.0045 ± 0.000	
% Nitrógeno	0.001648	
Cobre (mg/L)	<0.20	4 mg/L[2]
Zinc (mg/L)	<0.20	10 mg/L[2]
Manganeso (mg/L)	<0.10	0.15 mg/L[2]
HH (h/L)	Ausente	1 – 5[2]
SVT(%MO)	0.04	
% Humedad	99.83	
Temperatura °C	30.6 ± 0.1	20 - 40°C[3]
Salmonella	Ausente	

Fuente: [1]Lopez, 2003; [2]NOM-EM-034-FITO-2000; [3]Allen, 2010

b) Comparación de los rendimientos de los tres diferentes tipos de abonos utilizados sobre el cultivo de Zinnia (*Zinnia elegans*).

Se contabilizo el número de días a transcurrir desde el día de la siembra hasta el día de las primeras germinaciones, que se llevó a cabo a partir del cuarto día.

Se observa cómo a partir del día 4 aparecieron las primeras plántulas en todos los tratamientos con la mínima diferencia del número de plantas por tratamiento. El T4 (Biomarine) y el T5 (Fertiplus) dejaron de aparecer plántulas en el día 7 obteniendo un total de 14 plántulas cada uno. Mientras que el T1 (Biol 1:1), T2 (Biol 1:3), T3 (Biol 1:5) y el T6 (agua) terminaron de germinar en el día 8. La literatura citada dice que se necesitan unos cinco a siete días para que la semilla de zinnia germine.

En la tabla 2 se encuentran los promedios de la altura del tallo de los diferentes tratamientos con respecto a los días en que se llevó a cabo la medición, se obtuvieron tres mejores rangos, donde los tratamientos T1 (Biol 1:1), T2 (Biol 1:3) y T3 (Biol 1:5) se ubicaron dentro de los primeros con un promedio de 43 ± 8.30, 39.75 ± 5.65 y 37.07 ± 2.87 respectivamente siendo los mejores y superando a los fertilizantes comerciales.

Tabla 2. Promedio de los tratamiento para la altura del tallo (cm) de Zinnia (*Zinnia elegans*).

	Alturas alcanzadas (cm)			
Tratamientos	15 días	30 días	45 días	60 días
T1 (Biol 1:1)	6.45 ± 1.21	13.27 ± 2.28	32.54 ± 9.21	43.00 ± 8.30
T2 (Biol 1:3)	5.92 ± 1.38	12.75 ± 1.76	28.75 ± 6.96	39.75 ± 5.65
T3 (Biol 1:5)	6.71 ± 0.82	13.07 ± 1.32	29.15 ± 3.13	37.07 ± 2.87
T4 (Bio marine)	6.42 ± 1.22	13.00 ± 1.35	26.92 ± 4.23	34.57 ± 3.10
T5 (Fertiplus)	6.53 ± 0.74	11.21 ± 1.25	26.64 ± 4.89	36.00 ± 3.41
T6 (agua)	7.41 ± 0.79	11.36 ± 1.46	25.63 ± 5.29	35.09 ± 4.65

En la tabla 3, se muestra los promedios de los tratamientos para el diámetro de la flor (cm), se puede observar que el T1 (Biol 1:1) ocupa el primer lugar con un promedio de 4.10 ± 0.09 cm, los T2 (Biol 1:3), T3 (Biol 1:5) y T4 (Bio marine) con un promedio de 3.98 ± 0.07 cm, 3.86 ± 0.12 cm y 3.37 ± 0.17 cm

respectivamente, los promedio más bajos son del T5 (Fertiplus) y T6 (agua). Cabe indicar que todos los promedios están dentro del rango señalado para esta especie que va de 2.5 – 5 cm.

Tabla 3. Promedio de los tratamiento para diámetro de la flor (cm) de Zinnia (*Zinnia elegans*).

Tratamientos	Diámetro alcanzado a los 60 días (cm)
T1 (Biol 1:1)	4.10 ± 0.09
T2 (Biol 1:3)	3.98 ± 0.07
T3 (Biol 1:5)	3.86 ± 0.12
T4 (Bio marine)	3.37 ± 0.17
T5 (fertilplus)	2.95 ± 0.08
T6 (agua)	2.90 ± 0.08

DISCUSIONES

El pH es uno de los parámetros del que hay que hacer un mayor seguimiento debido a la sensibilidad de los microorganismos a los cambios que se producen en el interior del biodigestor, evitando la acidificación del mismo. Las condiciones óptimas para una digestión anaerobia son a un pH de 7 - 7.2 pudiendo tener una fluctuación entre 6.7 y 8.0 según lo demuestra López [5]. Para esta muestra se obtuvo un pH de 7.7 ±0.0, lo cual indica un buen funcionamiento del biol.

El biol analizado presenta una baja presencia de materia orgánica de 0.04%, comparándolo con un estudio realizado por Guanopatín [6] en donde presenta la composición de dos tipos de bioles diferentes, el biol de bovino contiene 2.2 % y el biol de gallinaza contiene 2.5 % y por ultimo Limón [7] realizo la medición al biol sin diluir obteniendo de 0.10 – 0.11%

El biol presento 0.0045% de fosforo, comparándolo con otros trabajos como el que realizo Torres [8] en donde presenta la composición de 0.329 %, mientras que otro trabajo llevado a cabo por Esprella y Lira [9] obtuvieron 0.05 % y por ultimo un trabajo realizado por Sistema Biobolsa [10] presenta 1.40 %, lo cual indica que el biol está por debajo de estos 3 bioles analizados. Esta variación entre el biol analizado y el de los autores citados, puede deberse a diferentes factores, entre ellos el tipo de alimento que consume el animal, si el estiércol de vaca utilizado es fresco o seco, si se introduce al biodigestor en el momento o se almacena.

El biol analizado presenta 16.48 mg/L (0.001648 %) de nitrógeno total, comparándolo con otros trabajos Torres [8], obtuvo 0.2 % de nitrógeno total, mientras que otro trabajo llevado a cabo por Tutillo [11], obtuvo 0.0025 %.

Las cantidades de cobre y zinc encontradas en el biol fueron <0.20 mg/L respectivamente, se encuentran dentro de los límites especificados en la NOM-EM-034-FITO-2000 que son de 4 mg/L y 10 mg/L respectivamente, comparándolo con el trabajo de Tutillo [11], obtuvo 1.82 mg/L de cobre y 8.93 mg/L de zinc valores muy por encima de los resultado que se obtuvieron del biol.

Como se observa en la tabla 1 los valores para coliformes totales y coliformes fecales sobrepasan los límites de 2000 NMP/100mL que menciona la NOM-EM-034-FITO-2000 [12]. Es importante mencionar que dicha norma realiza estas especificaciones refiriéndose a que los fertilizantes serán utilizados en frutas y hortalizas y en este caso el biol se está evaluando en el rendimiento de plantas ornamentales.

Por otro lado con referente a salmonella, se presentó como ausente, lo cual indica que en lo que respecta al límite indicado por la norma, si cumple con el lineamiento especificado.

Con referente a los huevos de helmintos, el valor de la muestra es ausente, por lo que el biol si está dentro de los límites establecidos en la norma ya mencionada, la cual indica un promedio de Huevos de Helminto 1 – 5 huevos/L.

Es importante señalar que a los 60 días de iniciado el experimento se presentó una plaga de hormigas, afectando a cinco tratamientos: T2 (Biol 1:3), T3 (Biol 1:5), T4 (Bio marine), T5 (Fertiplus) y T6 (agua), siendo importante señalar que el T1 (Biol 1:1) no llego a ser afectado, esto se puede deber a que una de las ventajas del biol es el aumento de la resistencia a plagas y enfermedades debido a que mejora la actividad de los microorganismos benéficos del suelo y ocasiona un mejor desarrollo de raíces, hojas y en las flores.

CONCLUSIONES

Respecto a la calidad del biol en comparación con otros trabajos se concluye que el biol presenta una baja cantidad de materia orgánica, fosforo y nitrógeno pero a pesar de su deficiencia de nutrimentos fue el que mejores resultados tuvo en el rendimiento del cultivo de las plantas de ornato. El uso del biol contribuye a mejorar la calidad de la producción, con énfasis en la altura del tallo y diámetro de la flor, procesos fisiológicos influenciados entre otros factores por fitohormonas las cuales se pueden encontrar de manera natural en este fertilizante. Además al preparar el biol, se le da un buen manejo a los desechos de animales, disminuyendo con ello la contaminación al ambiente. Se inicia una nueva línea de investigación con respecto al manejo y propagación del cultivo de plantas de ornato.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Unidad Mazatlán por brindarme el espacio y la infraestructura donde desarrollar este trabajo. Al programa institucional Veta Verde, por el apoyo para la utilización del área del vivero.

REFERENCIAS

[1] Fundación Produce Sinaloa. 2009. Paquete tecnológico para producción de plantas de ornato. Sinaloa, 1-13 p.

[2] Trinidad, Santos, A. (1996). Abonos orgánicos. México, 1-8.

[3] Jiménez, E. V. (2011). Aplicación de biol y fertilización química en la rehabilitación de praderas, “Aloag-Pichincha”. (Tesis profesional, Escuela Politécnica del Ejército, Carrera de Ciencias Agropecuarias): 88 p.

[4] López, C., López, O. A. (2009). Diseño, construcción y puesta en operación de un biodigestor anaerobio continúo para el laboratorio de ingeniería química de la facultad de ciencias químicas de la universidad veracruzana. (Tesis profesional, Universidad Veracruzana, Facultad de Ciencias Químicas): 100 p.

[5] López, A. (2003). Valorización del estiércol de cerdo a través de la producción de biogás. Bogotá: Artes Gráficas, 1- 114.

[6] Guanopatín, M. R. (2012). Aplicación de biol en el cultivo establecido de alfafa. (Tesis profesional, Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ingeniería Agronómica):93 p.

[7] Limón, M. G. (2014). Implementación de un biorreactor en CIAD Mazatlán, Sinaloa. (Tesis profesional, Instituto Tecnológico de Mazatlán, Ingeniería Bioquímica):92 p.

[8] Torres, L. M. 2012. Evaluación de 6 abonos orgánicos, como complemento a la fertilización tradicional en el cultivo de rosas (rosa sp.) variedad freedom en la “empresa anniroses S.A. Tabacundo-Ecuador 2012. (Tesis profesional, Universidad Politécnica Salesiana, Ingeniería Agropecuaria): 110 p.

[9] Esprella, M. y Lira, M. (2012). Producción de biofertilizante a partir de residuos orgánicos mediante la implementación de un sistema biodigestor para la aplicación sobre cultivos en parcela. (Tesis profesional, Instituto Universitario de Tecnología): 136 p.

[10] Sistema Biobolsa. (2012). Manual de biol, aplicaciones de biol en diferentes cultivos agrícolas.

[11] Tutillo, M. (2010). Efecto de tres abonos orgánicos líquidos, aplicados al área foliar y al suelo, en el desarrollo del cultivo de rosa (Rosae sp.) variedad Leonor, en el Cantón Pedro Moncayo, Provincia de Pichincha. (Tesis profesional, Universidad Técnica del Norte, Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales): 85 p.

[12] NOM-EM-034-FITO-2000. Norma Oficial Mexicana (con carácter de emergencia), requisitos y especificaciones para la aplicación y certificación de buenas prácticas agrícolas en los procesos de producción de frutas y hortalizas frescas.

EVALUATION OF THE COLONIZATION PROCESS AND DETERMINATION OF THE BENIFICIAL EFFECTS OF THE BANANA ENDOPHYTIC BACTERIA

(Evaluación del proceso de colonización y determinación de los efectos benéficos de bacterias endófitas de banano)

Gloria M. Macedo Raygoza[a*], Miguel J. Beltrán García[b]

[a]Universidad Autónoma de Baja California, Instituto de Ingeniería, Mexicali, Baja California, CP 21280, [b]Universidad Autónoma de Guadalajara, Departamento de Química ICET, Zapopan, Jalisco, CP 45129

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: mbeltran71@hotmail.com

Área del Conocimiento: Agrobiotecnología.

ABSTRACT
Banana is the fourth crop more important worldwilde after corn, rice and wheat. It is also a crop that is affected by diseases caused by plant pathogens, causing excessive use of pesticides. The chemical crop management affects the sustainability of the soil, which causes the decrease soil productivity and increased use of fertilizers. Nitrogen is very important because it is the main mineral element limiting plant growth, and in commercial crops causes reduction in labile soil nitrogen reserves and affect microbial communities. In this research work we evaluate the colonization and growth stimulation in micropropagated banana plants by *Klebsiella variicola* an endophytic bacteria, and its effect on soil conditions lack of nutrients (beach sand). 6 treatments were used: 1) active *Klebsiella variicola*, 2) inactive *Klebsiella variicola*¸ 3) active *Escherichia coli*, 4) inactive *Escherichia coli*, 5) mineral solution MMN and 6) sterile water (5 plants per assay). For determine colonization we recover bacteria (endophyte and epiphytic) after two month inoculation with sterile water washes for epiphytic bacteria and ethanol and chlorine washes for endophytes. After 15 days post-inoculation all the plants from the treatment with inactive *K. variicola* was dead also some of the plants from the control treatment. After 2 month the plants with the active *K. variicola* treatment were the ones with more biomass reaching 1g more than the other treatments, besides it was the only experiment were all the 5 plants lived. In the case of *E. coli* treatments, the active treatment has lower biomass than the inactive, so we can suppose the bacteria is releasing toxic metabolites to the plant. When we measured the colonization in plants we couldn't recover *K. variicola* nor epiphytic or endophytic, does this suggest that the plant is taking the bacteria as nutriment to compensate the lack of soil nutrients.

Keywords: Banana, endophyte, nitrogen.

DEVELOPMENT OF A SOLUBILIZING PHOSPHATE PRODUCT AND A PLANT GROWTH PROMOTER BASED ON A MICROBIAL CONSORTIUM WITH IMPACT ON THE BIOFERTILIZERS INDUSTRY

(Desarrollo de un producto solubilizador de fosfatos y promotor de crecimiento vegetal basado en un consorcio microbiano con impacto en la industria de biofertilizantes)

Yanett Ivett Gallegos Diaz [a+]

[a] GreenCorp Biorganiks de México S.A de C.V , Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada del Instituto Politécnico Nacional (CIBA-IPN).

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: yanett_diaz_@hotmail.com y.gallegos@biofertilizantes.mx

Área del Conocimiento: Agrobiotecnología.

ABSTRACT
Synthetic fertilizers have low efficiency (≤50%) to be absorbed by crops, not incorporated by plants fertilizer has an adverse environmental impact. Given this situation and increasing awareness about environmental care and evidence of environmental damage caused by the agrochemicals, this work was to develop a solubilizing phosphate product and plant growth promoter based on a microbial consortium. Were isolated, characterized and identified microorganisms crop beans (Phaseolus vulgaris) and soybean (Glycine max) being evaluated by means of microbiological techniques such as determining nitrogen fixation, synthesis of auxin and solubilization of phosphates. Compatibility was determined and selected microorganisms with industrial potential which underwent growth kinetics, determining culture medium for profitable business. Of the main challenges that arise when develope technologies of micro-organisms is the low resistance of these to different environmental conditions and technology so that the effect of inert additives in the microbial consortium was evaluated on 12 prototypes that were developed to evaluate its stability and biofertilizer function. Finally successful prototype formulation for commercial production were determined. As a result of this work five molecularly identified as microorganisms were selected; Leclercia adecarboxylata, Enterobacter asburiae, Cedesea davisae and Enterobacter cloacae. The culture medium evaluated "M1" is a cost effective means for the company and an option for scaling. It was possible to achieve stability and profitability of the prototypes evaluated and their bioavailability. Successful prototypes were "P6" and "P12" which entered at an experimental stage in the greenhouse and subsequently field for commercial release.

Keywords : Biofertilizers , solubilizing phosphate, plant growth promoters, microorganisms.



OPTIMIZATION OF A LIQUID MEDIA FROM WORM LEACHATE FOR FUNGAL BIOMASS PRODUCTION

Andrea Gutiérrez-Santa Ana[a*], Alexis Preciado[a], Ileana Reyes[a], Miguel J. Beltrán-García[a+]

[a]Departamento de Química, Universidad Autónoma de Guadalajara

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: mbeltran71@hotmail.com

Área del conocimiento: Agrobiotecnología.

ABSTRACT
Plant growth relies in a combination of chemical fertilizers and management factors that decrease both fertility and soil health reduction. The use of microorganism to produce bio-formulations in order to reduce environment damage and improve soil fertility has been reported as an ecological alternative. *Trichoderma* species has been suggested as plant growth promoter and protection against pathogen due to their ability in nitrogen fixation and auxin production. The use of commercial culture media (like Potato Dextrose Agar/Broth) is expensive and cannot support fungal mass production for crop application. The optimization of a culture media for ideal conditions to fungal activity is important in agro-industry applications. Worm leachate now, is used as a liquid fertilizer with a highly content of nutrients and humic acids that might be used as a cost-effective inoculant for fungal bio-formulations. *Trichoderma asperellum* a soil-isolated strain was inoculated in a culture media of worm leachate concentrate added with 2 % of molasses as carbon source. Fungal biomass was evaluated in different dilutions of the composed media with pH 6.5 and supplemented with 0.2 % of NH_4Cl and $NaNO_3$ as the nitrogen sources. Final biomass was collected after 5 days, when the experiment was carry out, filter and dry to a constant weight. Biomass was measure and compared with PDB media. The liquid media concentrated and initial pH were factors for growth inhibition. Our results showed that leachate (50%) plus NH_4^+ as the ideal condition, however for field aplications 25% could be a better option as a suitable medium, we observed a non-significative diference between leachate 50% and 25%. Worm leachate turned out to be a better growth promoter of fungal biomass compare with comercial medium (PDB).

Keywords*: Trichoderma;* Fertilizer; *Leachate.*

MOLECULAR AND METABOLOMIC CHARACTERIZATION OF *Pseudomonas* STRAINS ISOLATED FROM SOILS AND PLANTS

(Caracterización molecular y metabolómica de cepas de *Pseudomonas* aisladas de suelos y plantas)

Saúl Alejandro Medina Salazar[a*], Emmanuel Martínez Castro[a], Gisela Aguilar Benítez[a], Juan Manuel Pinos Rodríguez[b], José Pablo Lara Ávila[a+]

[a] Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Autónoma de San Luis Potosí;
[b] Centro de Biociencias, Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: pablo.lara@uaslp.mx

Área del Conocimiento: Agrobiotecnología.

ABSTRACT
Genus *Pseudomonas* is a complex of species belonging to γ-Proteobacteria group that colonized a wide variety of aquatic and terrestrial ecosystems, reflecting a large potential for adaptation to changing environmental conditions. Also, several species have potential biotechnological applications and some others are important pathogens in humans, animals, plants and insects. The present project aims to correlate physiological and biochemical versatility with genomic diversity, in order to gain insights in understanding the ecological role of the genus *Pseudomonas*. In this work, we propose performing the molecular and metabolomic characterizaton of *Pseudomonas* strains isolated from soil and plants, through: (1) phylogenetic analysis of 16S rRNA, *gyrB, rpoB* and *rpoD* sequences; (2) analysis of LOPAT (Levan, Oxidase, Potato rot, Arginine decarboxylase, Tobacco hypersensitive response) profile and (3) biochemical test related to plant-microorganism interaction. This project was financed by FAI-UASLP-2014 (C14-FAI-04-05.05) and PROMEP-2014 (DSA/103.5/14/7437).

Keywords: Genotyping, Metabolomics, Phenotyping.

ABA REGULATES CHLOROPLASTS MOVEMENT IN PLANTS OF *Opuntia streptacantha*

(ABA regula el movimiento de cloroplastos en plantas de *Opuntia streptacantha)*

Diana Marcela Arias-Moreno[a*], María de la Luz Guerrero-González[a], Laura Yáñez-Espinosa[b], Juan Francisco Jiménez-Bremont[c], Pablo Delgado-Sánchez[a+].

[a] Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Soledad de Graciano Sánchez, SLP., México.
[b] Instituto de Investigación de Zonas Desérticas, Facultad de Ingeniería, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, SLP., México.
[c] División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, San Luis Potosí, SLP., México.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: pablo.delgado@uaslp.mx

Área del Conocimiento: Agrobiotecnología.

ABSTRACT
Chloroplasts move in response to abiotic stress factors mainly by excess light and drought stress. Also has been proposed that induction of chloroplasts movement could be mediated by the phytohormone abscisic acid (ABA). However, this mechanism is known very little especially for desert plants with CAM photosynthesis (Crassulacean Acid Metabolism). *Opuntia streptacantha* is a specie that can survive under extreme environmental conditions, therefore is considered an excellent model for ecophysiological, anatomical and molecular studies. Through exogenous application of ABA in seedlings of *O. streptacantha*, we studied the movement of chloroplasts. Cladodes segments were immersed in different concentrations of ABA to 0 (control), 1, 50 and 100 µM for 30, 60, 120 and 180 minutes under light conditions. In cells from control seedlings (0 µM ABA) were observed fewer chloroplasts and distributed in the cytoplasm without grouping. At 30 minutes the concentration of 100 µM ABA, were observed a greater number of chloroplasts, which were grouped in the cytoplasm. In other concentrations tested, were observed that the chloroplasts were gathering toward the center of the cell according to the exposure time in ABA. Likewise, our results showed that when the concentration of ABA increased in plant tissues, chloroplasts rearranged faster and in different ways. This leads us to infer that this phytohormone activates signaling pathways for induction of the movement of chloroplasts and avoid photodamage to the photosynthetic process and thus it is a main physiological strategies abiotic stress tolerance.

Keywords: Nopal; CAM plants; water deficit.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

EXTRACTION OF ANTIMICROBIAL COMPOUNDS PRODUCED BY STRAINS OF *Trichoderma* (*T. asperellum, T. hamatun y T. tawa*) AND EVALUATION OF THE ANTIBIOTIC EFFECT AGAINST ENTERIC BACTERIA.

(Extracción de compuestos antimicrobianos producidos por cepas de *Trichoderma* (*T. asperellum, T. hamatun* y *T. tawa*) y la evaluación de su efecto antibiótico contra bacterias entéricas)

Saúl Josué Ramírez-Picón[a*], Marcela de la Mora-Amutio[a], Tesuya Ogura[a], Julia del Carmen Martínez-Rodríguez [a], Miguel Juan Beltrán-García [a+]

[a] Lab 311, Investigación y Desarrollo. Depto. de Química, DDCyT, Universidad Autónoma de Guadalajara. Av. Patria 1201, Lomas del Valle. CP 45129, Zapopan, Jalisco, México

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: jbeltran@edu.uag.mx

Área del Conocimiento: Agrobiotecnología.

ABSTRACT
There is a global need to develop effective antibacterial therapies to defeat pathogenic bacteria, particularly against Gram -negative bacteria, because they are typically resistant to many antimicrobials and antibiotics due to the impermeability of their outer membrane and the adquisition of resistance mechanisms.
To confront these challenges, it is necessary to find new effective compounds which have broad antifungal spectrum activity. Fungi of the *Trichoderma* genus are widely used as biofungicides for crops worldwide because they produce antibiotics and lytic enzymes against pathogenic fungi. However, little information is available on the antagonism of *Trichoderma* against bacteria. The aim of this study is to assess the antibiotic effect of organic extracts obtained from three strains of Trichoderma endophytes: *T. asperellum, T. hamatun* y *T. tawa*. The strains will be grown in both Czepek -Dox and potato dextrose. Metabolites of interest will be extracted from the culture medium to be tested against five different pathogenic strains: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Streptococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumonie* (ATCC 700603) y *Salmonella tiphy* (ATTC 6539). As a second phase tests will be performed against enteric pathogenic bacteria isolated from sick patients.

Keywords: *Trichoderma spp*; pathogenic bacteria; antimicrobial; antibiotics.

SOLUBILISATION OF INSOLUBLE INORGANIC PHOSPHATE BY ENDOPHYTIC BACTERIA

(Solubilización de fosfato inorgánico por bacterias endófitas)

David Rodríguez Rodríguez [*a], Miguel J. Beltrán-García [a]

[a]Departamento de Química, Universidad Autónoma de Guadalajara, Zapopan, Jalisco, CP. 45129,

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: mbeltran71@hotmail.com

Área del Conocimiento: Agrobiotecnología.

ABSTRACT
The importance of new approaches to enhance commercial crops, have led to the agricultural industry to use microorganisms that have significant properties for plant growth stimulation. Among the features required, it seeks the solubilisation and acquisition of phosphates by plants in different environmental conditions. The presence of available phosphates are needed for plant growth, however there are a highly content of insoluble phosphorus in the soil, that can hardly being assimilated by the plants due to the availability in soils, especially by pH. Fixed phosphorus is usually presented as acids iron phosphate or aluminium, whereas in alkaline soils tend to precipitate as calcium phosphate. Actually, phosphate solubilisation involve organic acids and phosphatases secretion. For phosphate solubilisation, it is commonly used a NBRIP culture media. One hundred and five endophytic bacterial strains of different genus and species were analysed. This bacteria were grown in modified NBRIP with hydroxyapatite as the source of phosphate and adjusted to three pH values: 4.5, 7 and 8.5. We found 17 of these bacteria were able to clarify the medium taking them as positive for solubilisation of phosphates. The bacteria were continuously passed from a NBRIP to another fresh modified NBRIP medium. Also, we found that bacteria in acid pH have shown a mayor solubilizing activity and maintained the pH at 4.5 ± 0.5. In medium with neutral pH we found a less solubilizing activity than other pH conditions. Finally the alkaline pH medium drastically increases both the bacterial growth and the phosphate solubilisation with reduction of pH, to 3.9 ± 0.55. This behaviour suggests bacteria produce acids decreasing pH and buffering the media in a certain pH. Also, modified medium eliminates false positives in concerning to solubilisation using Ca_3PO_4. We are searching a relation of PO_4 solubilisation of these bacteria with enzymatic activities of alkaline and acid phosphatases.

Keywords: Phosphates; organic acids; alkaline phosphatases; acid phosphatases.

MICROBIAL BIOSYNTHETIC POTENTIAL OF FROM FOREST SOILS AND COMPOSTS

(Potencial biosintético microbiano de suelos forestales y compostas)

Emmanuel Martínez-Castro [a*], Saúl Alejandro Medina-Salazar [a], Ana Luz Romero-García [b], Mayra Janeth Esparza-Araiza [b], Ramón Jarquin-Gálvez [a], Juan Gualberto Colli-Mull [c], Ángel Gabriel Alpuche-Solís [b], José Pablo Lara-Ávila [a+]

[a] Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Autónoma de San Luis Potosí;
[b] División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C;
[c] Instituto Tecnológico Superior de Irapuato

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: pablo.lara@uaslp.mx

Área del Conocimiento: Agrobiotecnología.

ABSTRACT
Soils constitute complex and dynamic biological systems with different levels of taxonomic and functional diversity in the context of microbial genetic resources that support ecosystems by driving the biogeochemical cycles. Microbial natural products are low molecular weight secondary metabolites with a high level of chemical diversity; their medical and biotechnological applications are well known. The biosynthetic pathways require non ribosomal peptide synthetase (NRPS) and polyketide synthase (PKS) genes. The aim of this work is to perform a genetic screening of biosynthetic potential of bacterial strains isolated from forest soils and composts through the detection and phylogenetic analysis of NRPS and PKS genes, the high level of molecular diversity emphasizes the richness of microbial genetic resources present at forest soil to promote its conservation and restoration. This project was financed by FAI-UASLP-2014 (C14-FAI-05.05) and PROMEP-2014 (DSA/103.5/14/7437).

Keywords: NRPS, secondary metabolites, PKS.

DYNAMIC OF STORAGE COMPOUNDS DURING THE MATURATION OF "CHAN" SEED (*Hyptis suaveolens* L. POIT)

[Dinámica de los compuestos de reserva durante la maduración de la semilla de chan (*Hyptis suaveolens* L. Poit)]

Ma. Yessenia Neri Muñoz[a*+], Juan Alberto Osuna Castro[b], Martín Eduardo Ávila Miranda[a], Carlos Arias Castro[a], Martha Alicia Rodríguez Mendiola[a], Norma Alejandra Mancilla Margalli[a]

[a], Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Tlajomulco, km 10 carr. a San Miguel Cuyutlán, Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco, México.
[b], Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Colima, km 45 autopista Colima-Manzanillo, Tecomán, Colima, México

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: y_neri@hotmail.com

Área de conocimiento: Agrobiotecnología.

ABSTRACT
Carbohydrates, lipids and proteins, are the main storage compounds of seeds. Their regulation and their metabolic dynamic have been elucidated in model seeds as *Arabidopsis*, soybean and cereals. Leguminous seeds (dicots) are characterized by high protein content; meanwhile, cereals (monocots) present a high content of starch and gluten. Pseudoceral seeds such as amaranth and quinoa have shown a balanced nutritional content, besides to rheological properties for baking, similar to cereals grains but gluten free; however, there is not report about the biochemical changes during the development of this kind of seeds. Since the importance of seeds for human diet and their nutraceutical properties of pseudocereals, the **main** aim of this work was to define the dynamical changes of main nutritional components during development and maturation of chan seed (*Hyptis suaveolens* L. Poit), a pseudocereal. **Hypothesis**, process of storage compounds during maturation of chan seed differ to widely reported for dicots such as soybean and *Arabidopsis*. **Methodology,** the inflorescence of 20 plantlets produced in greenhouse were collected 85 days after sowing (DAS), and seeds were classified into nine stages according to morphological features (size, weight, color and moisture). Metabolites such as lipids, reducing sugars, soluble total carbohydrates, starch, polyphenols, free amino acids and total protein were quantified. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA and *T*-test with significance level of $P < 0.05$. **Results,** the changes in chromaticity, as well as the increase of dry weight and decrease of the moisture, were significantly different for each groups of analyzed seeds, confirmed nine stages of growth seed. Starch, proteins, polyphenols and lipids accumulation started at 2 and 3 stages, reaching the maximum concentration during stage 6 and were sustained for up to stages 9. Unlike described for soybean and *Arabidopsis,* that metabolize the stored starch during seed maturity, in chan seed this metabolite is preserved. According to description of phonological phases of dicots plants, the 1 and 2 stages corresponding to development seed phase, whereas 3 to 9 stages corresponding to mature seed.

Keywords: seeds, pseudocereal, storage compounds, seed maturity.

ENDOPHYTIC BACTERIA ISOLATED FROM WILD *A. vilmoriniana* COLLECTED IN THE JALISCO STATE: EVALUATION AS PLANT GROWTH PROMOTERS FOR *A. tequilana*.

(Bacterias endófitas de *A. vilmoriniana* del Estado de Jalisco: Evaluación como promotoras de crecimiento de *A. tequilana*)

Leslie Yael Carbajal Huerta[a*], Miguel Juan Beltrán-García[a], Gloria Margarita Macedo-Raygoza[b], Aurora Xihuitl Huerta Robles[c], Paolo Di Mascio[d]

[a] Laboratorio 309, Departamento de Química ICET, Universidad Autónoma de Guadalajara, Patria 1201, Lomas del Valle, Zapopan, Jalisco, México. C.P. 45129
[b,c] Universidad Autónoma de Baja California, Instituto de Ingeniería.
[d] Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidad de Sao Paulo.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: mbeltran71@hotmail.com

Área del Conocimiento: Agrobiotecnología.

ABSTRACT
Recent studies in our laboratory showed that endophytic bacteria is the best choice for developing bio-fertilizers. Our interest lies in isolate and identify culturable bacteria from wild *A. vilmoriniana,* that can make more efficient this process, determining the agronomical potential of them to see the impact the bacteria can have being inoculated into microbes-free Agave plants. Therefore, we are trying completing the first stage of a formulated-bioinoculants that we can apply in *A. tequilana,* the popular agave for tequila production. In our experiments, we evaluate the agronomical traits of the culturable bacteria isolated from Agave *bulbillos* such as phosphate solubilization, protease and cellulolytic activity, siderophores and auxin synthesis. In addition we also evaluate positive effects of 2 isolated potentially benefical bacteria into micro-propagated *Agave*. The bacteria were identified for 16SrNA sequencing and MALDI-TOF analysis. Here we present results of thirty-isolated microbes, grouped in *Pantoea agglomerans, Enterobacter asburiae and Enterobacter kobei*. The isolated bacteria have the capacity of phosphate solublization, were nitrogen-fixing with cellulolytic activity. They were not positive for siderophores, proteases activity and auxin synthesis. This agronomical traits support their use as bio-fertilizers. To evaluate the impact of these bacteria on the plant growth, we inoculated them by 3 months and we observed 2 new leaves-induced per plant and double biomass, and lightly changes of the plant pigmentation compared with control plants.

Keywords: Agave, Endophytic Bacteria, Biofertilizer, Agronomical traits.

ABIOTIC STRESS IMPACT ON DEVELOPMENT AND PHYSIOLOGY OF TOMATO (*Solanum lycopersicum)*

[Impacto del estrés abiótico sobre el desarrollo y fisiología del jitomate *(Solanum lycopersicum)*]

Erick Martínez Ojeda*[a], Claudia Santacruz Vázquez[b], Verónica Santacruz Vázquez[b], Roberto Ruiz Medrano[c], Beatriz Xoconostle Cázares[c], J. Jesús Hinojosa Moya[a+]

[a] Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Facultad de Ingeniería Química, Unidad Regional Acatzingo
[b] Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Facultad de Ingeniería Química
[c] Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: jesus.hinojosa@correo.buap.mx

Área del Conocimiento: Agrobiotecnología

ABSTRAC
Environmental stress conditions such as drought, heat, salinity, cold, or infection by pathogens have a dramatic effect on growth and crops production under those conditions. During and every day, plants exposition of only one abiotic stress condition is very difficult. Field plants are simultaneous exposed to more than one biotic or abiotic stress combinations, such as drought and high temperatures, drought and low temperatures, soil salt high levels and high temperatures, or any abiotic factors in combination with biological infection by pathogens attack, are natural conditions which surround ours crops.
Therefore, it is interesting to study physiological and molecular responses of plants growing in combined stress conditions, since little is known about acclimatization molecular mechanisms of plants exposed at two or more different stresses combination, particularly, macronutrients with temperature. The general objective of this work was to study the physiological responses of tomato plants (*Solanum lycopersicum*) under potassium deficiencies (K^+) and low temperatures. Our hypothesis raised that; exposition of plants to those conditions will be a source of molecular information for gene isolation and characterization in response to those conditions. Thus we could produce seeds of which plants could have agricultural interests with adaptability to abiotic stress combinations. *In-vitro* culture of tomato plants was a part of the general methodology. Seedlings were employed for some general physiological and metabolic measurements. Such as biomass, photosynthetic activity and starch accumulation. Preliminary results are only approaches that permit us to generate basic information in relation to the possibility of produce improved seeds with the capacity to adapt to these conditions.

Keywords: abiotic stress combination; plant physiology

RESUMEN

Las condiciones de estrés medioambientes como sequía, calor, salinidad, frio, o infección por patógenos tienen un dramático impacto en el crecimiento y producción de los cultivo en condiciones ambientales. La exposición simultánea de las plantas a una o más condiciones como sequía y calor, salinidad y calor,

o cualquier factor abiótico combinado con la infección por patógenos son condiciones naturales a las que se exponen las plantas día a día. Por lo tanto resulta interesante estudiar las respuestas fisiológicas y moleculares de las plantas que crecen en condiciones combinadas de estrés, puesto que poco se sabe respecto a los mecanismos moleculares de aclimatación de las plantas a una combinación de dos o más diferentes estreses, particularmente, macronutrientes con temperatura. El objetivo elemental de este trabajo fue estudiar las respuestas fisiológicas de plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum*) ante una combinación en deficiencias de potasio (K^+) y bajas temperaturas. La hipótesis planteada radica en que las plantas cultivadas bajo dichas condiciones serán fuente de información molecular para clonar y caracterizar los genes que respondan a dichas condiciones; de esta manera generar plantas de interés agrícola con capacidad de adaptación al estrés abiótico combinado. La metodología general consistió en la propagación *in-vitro* de plantas de jitomate; con las plántulas se realizaron algunas determinaciones fisiológicas y metabólicas generales, como biomasas, actividad fotosintética y acumulación de almidón. Los resultados preliminares generados son tan solo un acercamiento que nos está permitiendo generar evidencias referentes a la posibilidad de generar semillas mejoradas con capacidad de adaptación a esas condiciones.

Palabras Clave: estrés abiótico combinado; fisiología vegetal

INTRODUCCIÓN

La población mundial está incrementando de manera alarmante, se espera que alcance de nueve a diez billones de pobladores para el año 2050, resultado evidente de ello es el incremento en la demanda de alimentos. Por tanto, para cubrir las necesidades alimenticias la producción deberá aumentar en un 70% a una velocidad mucho mayor que el crecimiento poblacional, lo cual representa un enorme reto teniendo en cuenta las restricciones que impone la disponibilidad de áreas agrícolas, es decir; la productividad se ve afectada puesto que gran parte los campos cultivables han llegado a su máximo aprovechamiento, incluso pueden desaparecer debido al aumento de las urbanizaciones. Adicionalmente, problemas ambientales resultado del cambio climático son otro factor que pone en riesgo la seguridad alimentaria global [1, 2, 3]. A consecuencia del cambio climático las plantas están expuestas a un amplio rango de estrés abiótico; tales como sequía, salinidad, calor, frio, intensidad de la luz, ozono, estrés anaeróbico y por nutrientes [4]; cada uno de ellos se ha estudiado, de manera individual, ampliamente [5].

El estrés abiótico es la causa primaria de las pérdidas de cultivos en el mundo, reduciendo la producción promedio de los cultivos más importantes por más del 50% [6]. Por mencionar, incrementos en la salinidad de las tierras resulta en 30% de pérdidas durante los siguientes 25 años [7]. De manera particular, la sequía y las temperaturas extremas son las principales causas de pérdidas considerables por lo que representan una grave amenaza para la sostenibilidad en los rendimientos, incluso llevando a pérdidas totales [8, 9].

En relación con el estrés por nutrientes, el potasio (K^+) es uno de los tres principales nutrientes de las plantas que sustentan la producción, el rendimiento y la calidad en el cultivo. Su absorción y acumulación en las células vegetales, constituye del 2 al 10% del peso seco de la planta [10]. Mientras que su deficiencia afecta significativamente múltiples procesos fisiológicos, incluyendo la fotosíntesis y

translocación de los productos de asimilación, por lo tanto, afecta el crecimiento global de la planta y su desarrollo. Siendo el catión más importante y abundante en las células de plantas vivas, juega un papel crucial en algunos procesos fundamentales, que incluyen la activación de enzimas, el transporte a través de las membranas, la neutralización de aniones, y osmorregulación [11].

Ante las deficiencias de potasio (K^+) y magnesio (Mg) las plantas acumulan azucares en hojas, raramente incrementan la biomasa de las raíces, hay un cambio en la fotosíntesis asociado con menor concentración de clorofila [12].

Referente a las temperaturas extremas, hay que mencionar que existen algunos modelos predictivos en los que se indica que para fechas no muy lejanas habrá un incremento en la frecuencia y amplitud de estrés por calor. Por lo que se esperan temperaturas altas acompañadas de sequías pronunciadas. Es decir, bajo condiciones naturales la combinación de dos o más tipos de estrés, como sequía y salinidad, salinidad y calor, y combinación de sequía con temperaturas extremas, o alta intensidad de luz son condiciones comunes que generarán pérdidas millonarias en los campos de todo el mundo. De ahí la necesidad de generar cultivos con capacidad de tolerancia potencializada a las diferentes combinaciones de estrés abiótico.

Por consiguiente el objetivo de nuestro grupo de investigación es generar cultivos que absorban y usen los nutrientes eficientemente bajo un efecto combinado de estrés por macronutrientes y bajas temperaturas, de la mano con limitantes de agua. La información que se presenta, es tan solo el inicio de las estimaciones en las respuestas fisiológicas elementales en plantas de jitomate que deberán de ser complementadas con el estudio molecular fino que nos llevará a comprender las redes de interacción génica y su posterior manipulación mediante ingeniería genética.

METODOLOGÍA

Semillas de jitomate fueron desinfectadas con etanol al 20% (v/v) e hipoclorito de sodio al 20% (v/v), enjuagándose por último con agua esterilizada. Las semillas secas fueron sembradas en cajas Petri conteniendo medio MS para su establecimiento *in-vitro*. El cultivo *in-vitro* se realizó para una combinación de potasio a concentraciones estándar (A) y bajas (B). Los mismos cultivos fueron sometidos a temperatura ambiente y bajas temperaturas, 25°C y 4°C, respectivamente. En el segundo caso las plántulas sujetos de estudio fueron cambiadas de 25°C a 4°C durante 72 horas. Dichos tratamientos arrojó las siguientes combinaciones AA ($+K^+$, 25°C) y BB ($-K^+$, 4°C). El crecimiento de las plántulas se realizó en un cuarto de cultivo con condiciones controladas de 16 horas luz y 8 horas oscuridad a una humedad relativa de 60%.

El monitoreo fisiológico consistió en el registro del tiempo y eficiencia germinal. Se registraron las longitudes de raíces, tallos y áreas foliares mediante el análisis de imágenes con el programa ImageJ/1.46. Posteriormente la planta fue seccionada en raíces, tallos y hoja. Dichos tejidos fueron empleados en las mediciones de pesos frescos y secos. Este último se obtuvo deshidratando los tejidos durante 48 horas a 70°C. Finalmente los tejidos estresados y no estresados fueron teñidos con Yoduro de Potasio siguiendo el protocolo descrito por Hermans y Verbruggen [13].

Se realizó el diseño de oligos degenerados (tabla 1) a partir del alineamiento múltiple de secuencias para el gen relacionado con fotosíntesis (RuBisCO) el cual fue amplificado mediante PCR a partir de gDNA y gradiente de temperatura.

RESULTADOS

Considerando que uno de los índices más empleados en agricultura para evaluar el estrés abiótico es el valor de biomasa y producción, realizamos la cuantificación de biomasa vegetal mediante el registro de los pesos frescos y secos (figuras 1 y 3a).

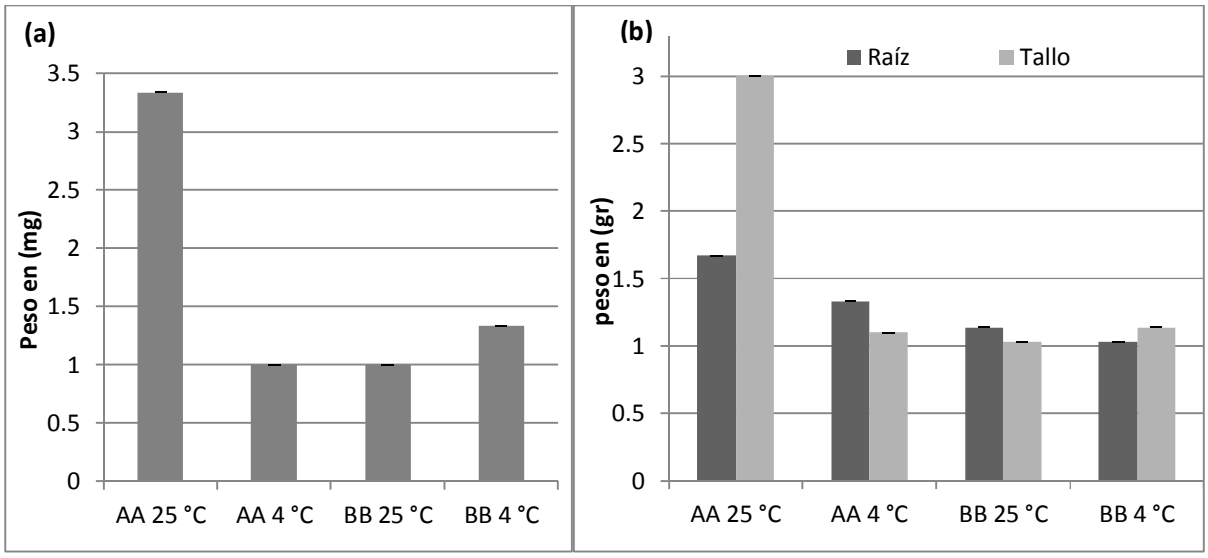


Figura 1. Acumulación de biomasa base seca en hojas (a), tallo y raíces (b) de las plantas de jitomate.

Podemos observar que las plantas estresadas por K^+ y temperatura desarrollan menor número de hojas y de menor extensión. La biomasa seca en hojas de la condición limitante de K^+ y estresadas a 4°C no muestra una tendencia lógica respecto a la biomasa de las hojas estresadas solo por K^+ (figura 1a), este ensayo deberá de repetirse. Las raíces tienden a reducir su tamaño conforme el estrés es más severo; finalmente, el crecimiento de los tallos es muy semejante al de las hojas, es decir, bajo las condiciones de estrés combinado parece que hay un ligero incremento en tamaño respecto al crecimiento mostrado en los tallos estresados sólo por el nutriente (figura 1b).

Igualmente se realizaron las mediciones de las diferentes partes de la planta, esto es, la determinación del área foliar y longitudes de raíces y tallos (figura 2).

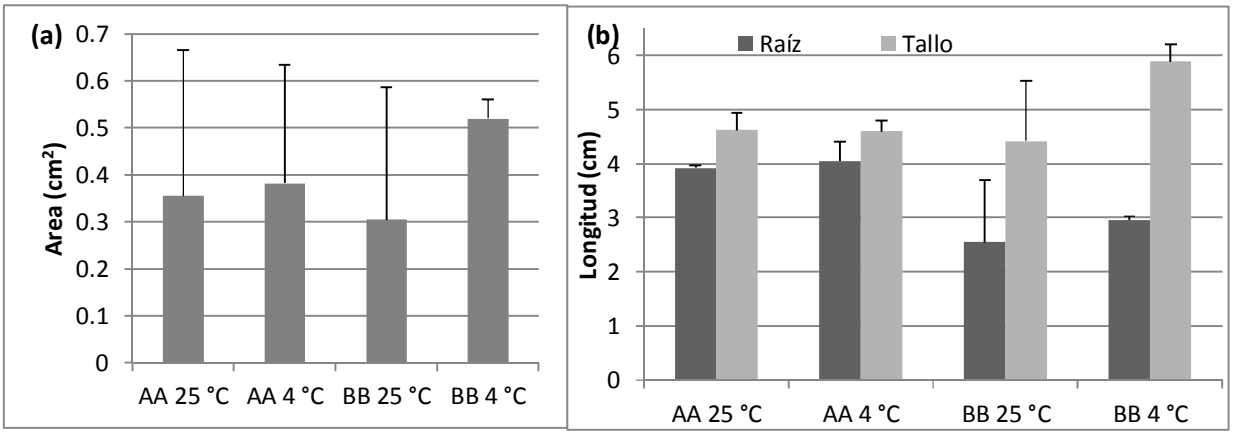


Figura 2. Extensión de hojas (a), tallos y raíces primarias (b) reflejando el crecimiento alterado de las plantas estresadas de manera individual y combinada.

Podemos apreciar que en los diferentes tratamientos no hay una correlación entre la tendencia del área foliar (figura 2a) y la acumulación de biomasa en tallos y hojas (figura 2b).

Finalmente, fue posible estimar el efecto individual y combinado del estrés por nutrientes y bajas temperaturas con la actividad metabólica de las plantas (figura 3).

Se puede observar que cuando las plantas son estresadas por nutrientes hay un ligero incremento en la biomasa fresca, y este incremento se manifiesta principalmente con reducción en, crecimiento aéreo, tallos y hojas, con mayor desarrollo de raíces. Es decir, hay un incremento del 17% al 27% en raíces, y un decremento del 83 al 75% en la parte aérea. Bajo el estrés combinado de temperatura y limitantes de K^+, se aprecia aún una reducción adicional en el desarrollo de la raíz hasta del 19%. Mientras que la biomasa superficial o externa incrementa respecto al estrés por K^+ hasta un valor del 81%. Dos unidades menos respecto a las plantas control. De manera global podemos observar que bajo estrés individual por bajas temperaturas se desarrollan menos las raíces, con una mayor acumulación de biomasa en hojas y tallos (figura 3 a y b).

Las imágenes de las figura 3c, nos permiten apreciar que a condiciones estándar la planta acumula carbohidratos en sus hojas. Cuando la planta es estresada por K^+ a temperatura constante de 25°C (BB 25°C), se aprecia la menor acumulación de carbohidratos en hojas y presencia importante en tallos.

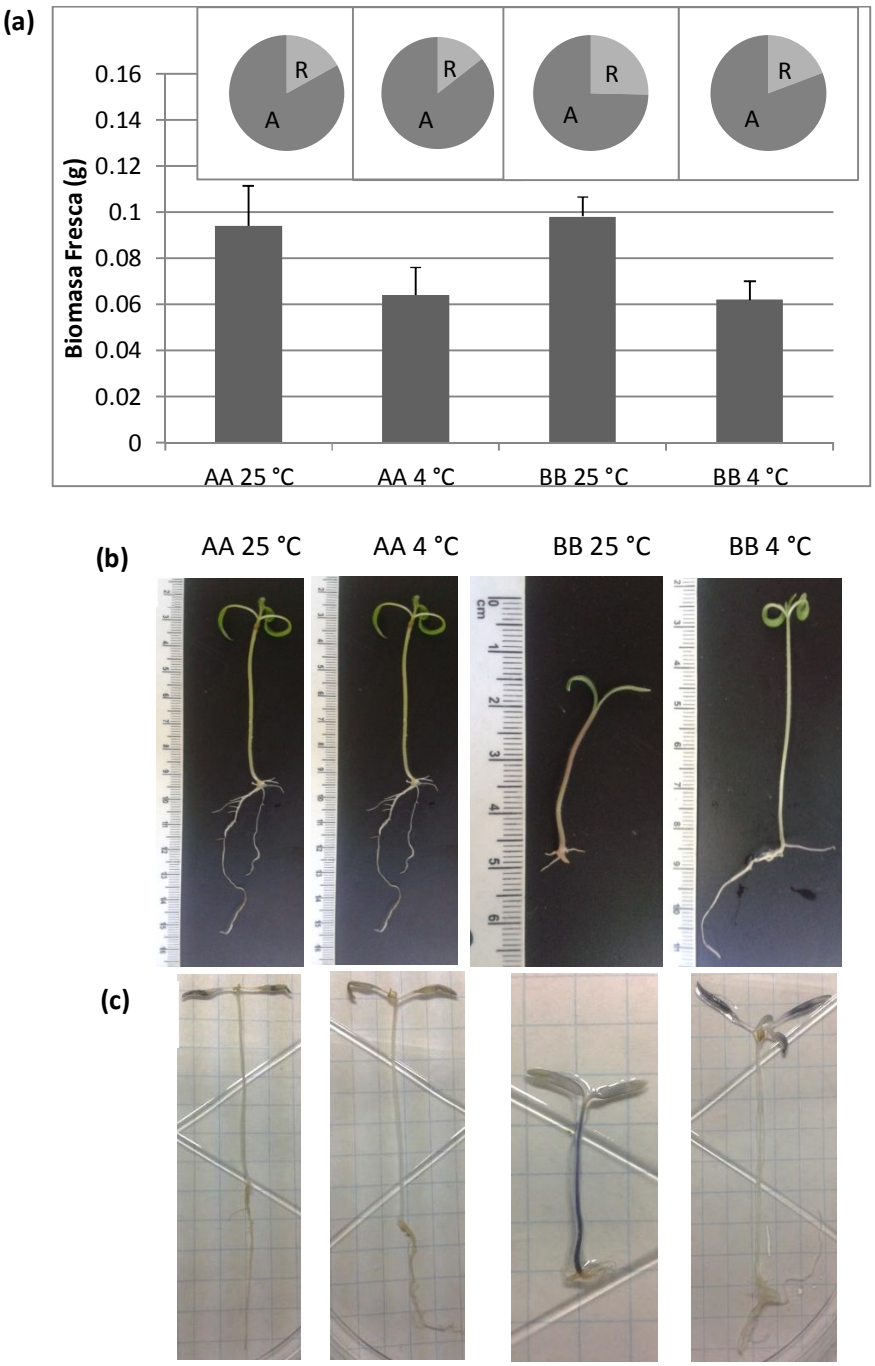


Figura 3. Efecto del estrés individual y combinado sobre la morfología y metabolismo de carbohidratos en plantas de jitomate. a) histogramas de biomasa total en base fresca; b) desarrollo morfológico de las plantas; c) acumulación de carbohidratos en diferentes partes de las plantas.

Cuando la planta es estresada por temperatura (AA 4°C) parece que la eficiencia fotosintética y metabólica de carbohidratos se reduce con menor acumulación de carbohidratos en hojas. Bajo la combinación de estreses (BB 4°C), no se aprecia una señal clara de carbohidratos en toda la planta.

Es bien sabido que las plantas son sistemas biológicos inteligentes que se adaptan a las condiciones locales para su crecimiento. Esta adaptación genera un desbalance en las relaciones de nutrientes; por mencionar N:C, P:K, K:C, etc., a ello las plantas responden para mantener un balance u homeostásis. Estas alteraciones y ajustes son el resultado de cambios a nivel de genes que se encienden y se apagan a consecuencia de los cambios externos. Por lo tanto concluimos que es de vital importancia la identificación de esos genes (figura 4) para relacionarlos con la fisiología que las plantas desarrollan, de esta manera podremos trabajar con construcciones genéticas para generar semillas mejoradas con capacidad de adaptación a condiciones particulares y de esta manera proponer alternativas para combatir la gran problemática nutrimental consecuencia del cambio climático.

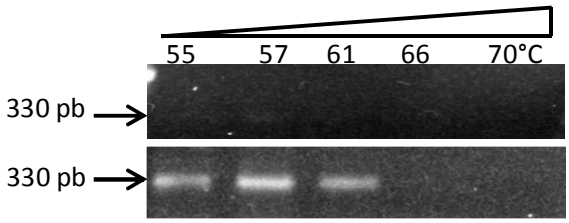


Figura 4. Amplificación de RuBisCo empelando como templado el DNA genómico de jitomate silvestre (panel superior) y saladet (panel inferior). Amplicones obtenidos mediante gradiente de temperatura y primers degenerados (tabla 1).

Se puede apreciar que el amplicón se logra a temperaturas de entre 55 y 61°C siendo muy claro para RuBisCo del jitomate saladet (figura 4). Estos fragmentos serán clonados y secuenciados para el diseño de primers específicos.

Tabla 1. Secuencia de oligonucleótidos degenerados para el gen RuBisCo.

Gen	Secuencia	Producto (pb)
Ribulose Bisphosphate Carboxylase	F: 5´ GARACNCTNYTN WCN TAY YTN CCN GAY YT 3’	330
	R: 5´ GG RTT YTA NGC HAT YAA NGA HAT YCA 3´	

DISCUSIONES

Como ya se ha mencionado, la germinación, crecimiento, desarrollo y fructificación de las plantas es influenciada por diversos factores. La evaluación del efecto del medio de cultivo suplementado con K^+ sobre las plantas de jitomate muestra que a los siete días las plantas de jitomate germinaron en un 95%; en cambio la ausencia de K^+ mostró que a los cinco días las planas aún no germinaban, sin embargo después de un periodo mayor a quince días las plantas iniciaban a germinar alcanzando un una eficiencia entre el 90 y 95%. Con el paso de los días después de la germinación se observó que su crecimiento era muy lento, perdían su pigmentación verde tornándose a un color café pálido y finalmente la muerte de la planta. Debido a ello se cambió la estrategia de trabajo lo cual consistió en crecer todas las semillas en medio MS completo. Una vez que tenían un crecimiento *in-vitro* adecuado, las plantas eran estresadas pasándolas a medio MS deficiente en K^+ y posteriormente eran estresadas por temperatura durante 72 horas a 4°C. Con esta estrategia fue posible realizar el monitoreo fisiológico. Se cree que la poca o nula relación del área foliar y acumulación de biomasa (figura 2a) puede deberse a que en las determinaciones de pesos secos se consideraron los peciolos como parte de las hojas. Mientras que en las mediciones de las áreas foliares, no son tomados en cuenta. También hay que tener presente que las mediciones de las áreas foliares son el promedio de todas las hojas, maduras y jóvenes, esto es, hojas de diferentes tamaños; ello explica las desviaciones tan grandes. Mientras que en la cuantificación de biomasa seca, solo fueron analizadas dos o tres hojas por planta. Es importante mencionar que cada medición se realizó por triplicado.

Por otra parte, parece que las raíces responden al estrés por nutrientes y bajas temperaturas incrementando la longitud de la raíz primaria, el crecimiento aéreo de las plantas es menor en plantas estresadas por nutrientes. Efecto contrario que se observa en tallos (figura 2b). La mayor acumulación de uno de los azucares solubles en hojas cuando la planta es estresada por ambos factores abióticos (figura 3c) puede deberse a bajo esas condiciones estresantes se inhibe la translación de azúcares desde los tejidos fuente a los tejidos destino, lo cual pudiera relacionarse con el incremento en la actividad de alguna de las enzimas relacionadas con la síntesis de azúcares.

Los resultados muestran que no hay relación entre la eficiencia de fotosíntesis con el tamaño y numero de hojas, es decir las deficiencias de K^+ conducen a menor número y tamaño de las hojas, con una reducción en el grado de fotosíntesis por unidad de área y en conjunto una reducción en fotoasimilados disponibles para el crecimiento de las plantas debido la menor elongación celular que se refleja con menos pesos o biomasa fresca y seca. Consecuencia de la menor acumulación de carbohidratos en toda la planta estresada por ambas condiciones, se espera que dichas plantas tengan menor productividad y calidad en sus frutos. Lo anterior como resultado tanto de la menor acumulación de fotosintatos y reducción en el transporte por el floema desde las hojas hasta los frutos.

Las alteraciones morfológicas que las plantas estresadas desarrollan es un indicativo claro que a nivel celular y molecular se activan diversos tipos de respuestas. Por ejemplo respuestas de activación y/o inhibición de receptores y transportadores de señales, respuestas que dependen de la concentración externa de nutrientes y factores ambientales. Este tipo de respuestas involucra señalización local. Igualmente, respuestas que dependen del estado nutrimental en el interior de la planta, y este tipo de respuestas depende de la señalización a larga distancia. Dichos eventos serán aterrizados al estudiar genes y sus transcritos como el de RuBisCo.

CONCLUSIONES

Los avances iniciales permiten concluir que el estrés individual o combinado por potasio y/o bajas temperaturas altera dramáticamente el desarrollo de las plantas de jitomate. Igualmente, modifica de manera importante el metabolismo de carbohidratos que pudiera estar de la mano con una menor taza de fotosíntesis debido a las modificaciones que estos tipos de estrés generan en el tamaño y número de hojas. Concluimos que nuestro aporte es tan solo un acercamiento que nos está permitiendo generar evidencias que en este momento son meras suposiciones referentes a las posibilidades de generar semillas mejoradas con capacidad de adaptación a esas condiciones. Por lo tanto es esencial el estudio molecular que nos permitirá validar y probar nuestras suposiciones. Siendo la Ingeniería vegetal uno de los campos de investigación más prometedores en la ciencia de las plantas, radicalmente para entender las respuestas moleculares, fisiológicas y genéticas a las condiciones ambientales, así como la aplicación de herramientas moleculares para mejorar su tolerancia y aclimatación.

AGRADECIMIENTOS

A la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado de la BUAP por el apoyo económico para realizar parte del presente trabajo. Al Laboratorio de Biotecnología Molecular de Plantas del CINVESTAV, a cargo del Dr. Roberto Ruiz y Dra. Beatriz Xoconostle, por el apoyo con equipos, espacios, reactivos y sugerencias para que ésta propuesta tenga visión escalada a la parte aplicada en la generación de semillas mejoradas. Al Licenciado en Lenguas Modernas de la BUAP profesor Juan Miguel Lazcano Hernández, por su apoyo en la traducción al inglés

REFERENCIAS

[1] Clarke JL, Daniell H. (2011), “Plastid biotechnology for crop production: present status and future perspectives”, Plant Mol Biol., 76(3-5):211-20.

[2] Waraich, E., Ahmad, R., Halim, A., & Aziz, T. (2012), “Alleviation of temperature stress by nutrient management in crop plants: A review”, Journal of Soil Science and Plant Nutrition, 12(2): 221-244.

[3] Yadav S. (2010), “Cold stress tolerance mechanisms in plants. A review”, Agronomy For Sustainable Development 30(3):515-527

[4] Bailey-Serres J, Voesenek LA. (2008), “Flooding stress: acclimations and genetic diversity”, Annual Review of Plant Biology, 59: 313–339.

[5] Mittler R, Blumwald E. (2010), “Genetic engineering for modern agriculture: challenges and perspectives”, Annual Review of Plant Biology, 61: 443–462.

[6] Sanghera, G. S., Wani, S. H., Hussain, W., & Singh, N. B. (2011), "Engineering Cold Stress Tolerance in Crop Plants", Current Genomics, 12(1):30-43

[7] Wang W, Vinocur B, Altman A. (2003), "Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance", Planta 218(1):1-14

[8] Ashraf M. (2010), "Inducing drought tolerance in plants: Recent advances", Biotechnology Advances 28: 169–183.

[9] Jiang SY, Bhalla R, Ramamoorthy R, Luan HF, Venkatesh PN, Cai M, Ramachandran S. (2011), "Over-expression of OSRIP18 increases drought and salt tolerance in transgenic rice plants" Transgenic Res. Oct 26.

[10]. Leigh RA, Wyn Jones RG. (1984), "A hypothesis relating critical potassium concentrations for growth to the distribution and functions of this ion in the plant cell" New Phytol., 97:1–13.

[11]. Clarkson DT, Hanson JB. (1980), "The mineral nutrition of higher plants", Annu. Rev. Plant Physiol. 31:239–98.

[12] Amtmann A, Troufflard S, Armengaud P. (2008), "The effect of potassium nutrition on pest and disease resistance in plants", Physiol. Plant., 133:682–91.

[13] Hermans, C., y Verbruggen, N. (2005). "Physiological characterization of Mg deficiency in Arabidopsis thaliana", Journal Of Experimental Botany, 56(418): 2153-2161.



Solanum lycopersicum WT, A POTENTIAL CANDIDATE TO GENERATE TOLERANT PLANTS AT ADVERSE CONDITIONS

(Solanum lycopersicum WT, un candidato potencial para generar plantas tolerantes a condiciones adversas)

Efraín López Esteves *[a], Sofía Gámez Rojas [a], Claudia Santacruz Vázquez [b], Verónica Santacruz Vázquez[b], Roberto Ruiz Medrano[c], Beatriz Xoconostle Cázares, J. Jesús Hinojosa Moya[a+]

[a] Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Facultad de Ingeniería Química, Unidad Regional Acatzingo
[b] Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Facultad de Ingeniería Química
[c] Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: jesus.hinojosa@correo.buap.mx

Área del Conocimiento: Agrobiotecnología

ABSTRAC
Plants growing in open fields are exposed to a diversity of external factors that negatively affects development, growth, and crop yield. In few unfavorable environmental conditions result plant adaptation, on the other hand crops complete losses, consequently significant economic impact. On the other hand, plants have the ability to adjust or modify their genetics and metabolic pathways to adapt themselves to the environmental conditions that surround them. During these molecular adaptation processes, plants develop subtle changes at the molecular level, sequence and order of their genes. These changes have allowed the evolution, families, species and several varieties of plants conformation. On the other hand, in our field sampling we founded a wild tomato (*Solanum lycopersicum WT)* variety which has shown interesting features of resistance to natural biotic or abiotic stress conditions in open filed. Wild seeds were germinated in greenhouse and showed growth ability, fruiting and propagation under water low levels, temperatures, nutrients and around of insect populations. Is to say, wild tomato plants, apparently, adapts and tolerates local environmental conditions. Therefore, our work objective is to employ the wild tomato as a research model plant to generate improved commercial varieties. The hypothesis proposed suggest that our wild plant could be a potential candidate for basic molecular studies such as cloning and characterization of tolerance genes, transcriptome, gene transfer between plants to obtain improved seeds of agricultural interest. Methodologically, plants were grown in greenhouse and *in-vitro* culture; different tissues were employed for genomic DNA extraction, genes PCR amplification and cloning. Bioinformatics analysis, functional study, graft assays, its molecular characterization, stresses tolerance assays on progenies, will be the last part. Preliminary results show four genes PCR amplification and some grafts.

Keywords: wild tomato, molecular characterization, grafts

RESUMEN

De manera natural las plantas están expuestas a una diversidad de factores externos que impactan negativamente el crecimiento, desarrollo y productividad. En muchos de los casos el efecto negativo es sumamente extremoso resultando las pérdidas de cultivos. Por otro lado, las plantas tienen la capacidad de modificar sus rutas genéticas y metabólicas para adaptarse a las condiciones del medio que las rodea. Durante esos procesos de adaptación, en muchos de los casos sufren cambios sutiles a nivel molecular en el orden y secuencia de sus genes. Esos cambios ha permitido la evolución, formación de familias, especies y diversas variedades de plantas. Por otro lado, durante nuestro trabajo de campo encontramos una variedad muy peculiar de jitomate silvestre. Al propagarla a nivel de invernadero observamos su capacidad de crecimiento, fructificación y propagación en condiciones extremas de agua, temperatura, nutrientes y ataque de insectos. Esto es, respondió de manera contraria al fenómeno natural y lógico esperado. Por lo tanto, el objetivo del trabajo es emplear esta planta silvestre como modelo de investigación para generar variedades mejoradas. La hipótesis planteada es que esta variedad silvestre de jitomate, pudiera ser un candidato potencial para realizar estudios moleculares diferenciales, de transcriproma y de transgénesis para generar semillas mejoradas en cultivos de importancia agrícola. De manera metodológica se realizó la propagación de plantas en *in-vitro* y en invernadero. Con dicho material se realizó la extracción del gDNA el cual fue empleado como molde para la amplificación de diversos genes de interés. Dichos genes serán clonados y secuenciados para su posterior análisis bioinformático y estudios de funcionalidad. Igualmente realizamos ensayos de injertos, con dicho material se realizará la caracterización molecular, pruebas de resistencia de las progenies a diversas condiciones. Los resultados preliminares muestran la amplificación de cuatro genes de interés y la generación de injertos diversos.

Palabra clave 1: jitomate silvestre; Palabra clave 2: caracterización molecular

INTRODUCCIÓN

La población mundial está incrementando de manera alarmante, lo que se refleja en la necesidad de producir suficientes alimentos teniendo siempre presente la conservación de los recursos ecológicos y energéticos de nuestro planeta. Cada vez es más limitado el acceso o consumo de alimentos que integran la canasta básica. De entre los principales factores que influyen se pueden mencionar los elevados costos debido a la producción insuficiente, frutos con calidad nutrimental deficiente, y especies de importancia en peligro de extinción. Aunado a ello diversidad de factores externos dificultan e impactan la actividad agrícola y existencia de las especies vegetales. Retomando, en la canasta básica de alimentos de la población de los mexicanos se encuentra el frijol, maíz, arroz, numerosos cultivos de hortalizas, frutas y verduras. En dicha lista se incluye el jitomate (*Solanum lycopersicum*) perteneciente a la familia de las solanáceas.

Los miembros que integran las solanáceas son extremadamente diversos en la naturaleza. Consisten de aproximadamente 3000 especies divididas en 90 géneros, de éstos aproximadamente 1500 especies pertenecen al género *Solanum*. Son una familia económicamente importante donde se incluyen hortalizas, plantas medicinales y ornamentales; por mencionar, dentro de las hortalizas se incluye al jitomate, papa, berenjenas y pimientos; algunas plantas medicinales como la Atropa, Datura, Hyoscyamus y Withania; plantas ornamentales como Petunia y Nicotiana. Aunque las solanáceas son diversas en hábitats, muestran un alto grado de conservación en la secuencia y orden de los genes [1].

El jitomate (*Solanum lycopersicum L.)* formalmente y antes conocido como *Lycopersicon esculentum Mill* con una producción de 146 millones de toneladas en el 2010 es el vegetal con mayor producción en el mundo [2]. *Solanum lycopersicum var. cerasiforme* (por ejemplo, jitomate Cherry) es una de las primeras formas domesticadas que ha dado lugar a los cultivos modernos del jitomate. A pesar de su domesticación la diversidad genética entre las nuevas y variedades silvestres es muy baja, en orden menor al 5%; lo cual se ha atribuido a su naturaleza autógama o autofecundable.

El jitomate se ha empleado como planta modelo para estudiar la funcionalidad de algunos genes como la resistencia a bacterias causantes del moteado [3], interacciones con hongos como el moho de la hoja [4] y la expresión de genes inducidos por daño mediante derivados de lípidos y péptidos, ácido jasmónico y sistemina, respectivamente [5], maduración del fruto en plantas mutantes [6], entre otros procesos. En las últimas décadas se ha logrado un avance muy importante en la generación de jitomates mejorados tolerantes a varios tipos de estreses bióticos y abióticos [7] con frutos de mayor calidad y valor nutritivo [8,9]. El jitomate se ha valorado como un cultivo esencial en nuestra dieta. Se ha reportado ser efectivo para el tratamiento de algunas formas de cáncer [10] y fotoprotección de los rayos ultravioleta [11]. Se ha empleado para definir las funciones de varios genes de desarrollo, y en el proyecto internacional para secuenciar su genoma. Lo anterior es la base para entender la funcionalidad de los genes bajo condiciones particulares en éste u otro sistema vegetal.

Durante las expediciones de muestreo del grupo de trabajo, en una población del estado de Guerrero se encontró una planta de jitomate silvestre con similitudes a *S. cerasiforme y/o S. pimpinellifolium*. Se observó su empleo en alimentación de animales de corral y otros animales domésticos. Es importante mencionar que la planta colectada presentó características peculiares como: capacidad de crecimiento a bajas temperaturas y limitantes de agua, curiosamente, cuando fue regada de manera frecuente, la planta llegaba a morir. Presentó resistencia a plagas, su crecimiento tipo arbustivo, fue letal para las plantas de porte bajo que la rodean. Además de su importancia económica, muchos aspectos, desde su origen, y sobretodo moleculares, se desconocen; en conjunto con las características antes mencionadas, nos hace suponer y proponerla como una planta candidata potencial en los estudios moleculares para obtener variedades mejoradas a condiciones medioambientales adversas. Teniendo presente de que a pesar del efecto de domesticación la diversidad genética entre las nuevas formas y las variedades silvestres es muy baja.

METODOLOGÍA

Semillas de jitomate silvestre (problema) y de saladet (control) fueron propagadas en invernadero, *in-vitro* sobre medio Murashige y Skoog (MS), y en diferentes soluciones hidropónicas: Germination Medium (GM), Basal Nutrient Solution (BSM) y solución Hoagland. Los cultivos *in-vitro* e hidropónicos se realizaron en condiciones controladas de 16 horas luz y 8 horas oscuridad a una humedad relativa del 60%. La metodología del cultivo hidropónico fue realizado replicando las recomendaciones para el cultivo de *Arabidopsis thaliana* [12]. Con dicho material vegetal, se recolectó tejido de diferentes partes de las plantas problema (jitomate Silvestre) y control (jitomate comercial Saladet). El tejido fue almacenado a -20°C hasta su empleo en la extracción de DNA genómico (gDNA). Para lo anterior 100 mg de material vegetal fue triturado manualmente empleando pistilos estériles continuando con el

aislamiento de DNA mediante un sistema comercial DNeasy Plant mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemania). La integridad del gDNA fue analizada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y su concentración fue medida mediante UV-Vis con el Nanodrop. Aproximadamente 100 ng de cada gDNA fue empleado como templado para las reacciones de PCR con gradiente de temperatura con los primers degenerados para cuatro pares de genes (tabla 1) que servirán para la caracterización filogenética, de evolución, y de domesticación de ésta planta silvestre.

El gDNA se almacenó a -20 °C hasta su empleo en las correspondientes reacciones de PCR. Para esas reacciones se trabajó con aproximadamente 100 ng. La reacción consistió de una desnaturalización inicial de 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de una secuencia de 94°C por 30 segundos, gradiente de 55-70°C durante 30 segundos, y 72°C por 5 minutos. Con una DNA polimerasa de Invitrogen empleando el equipo T-1000 Professional Basic Gradient Thermocycler (Biometra, Germany).

Tabla 1. Secuencia de oligonucleótidos degenerados de los genes seleccionados para la caracterización de la planta de jitomate silvestre.

Gen	**Asignación**	**Secuencia (5´---------3´)**	**Producto esperado (pb)**
Chlorophyll A/B binding Polypeptide	CAB	F: TGG YTN GCN TAY GGN GTK GTN ATH AAY	477
		R: YTT RTG YTA NGG NCC NAC NCC NGT NAC	
Vacuolar Invertase	VAC	F: TTY MGN GAY CCN ACN ACN GCN TGG YTN	591
		R: NGM NTY NGMRAGNAGRAGNGMNTGNCC	
Partial Sequence; 25S-18S Ribosomal RNA Intergenic spacer (RNA gene)	ITS	F: AGG CGG ACG TCA TGG GCG TCC TGT GGG	882
		R: GAA GGC GAG CGC GGC KGT CYT TCG CWA	
Ribulose Bisphosphate Carboxylase	RUB	F: GARACNCTNYTN WCN TAY YTN CCN GAY YT	330
		R: GG RTT YTA NGC HAT YAA NGA HAT YCA	

Por último las muestras fueron separadas mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (m/v) y visualizados mediante florescencia con bromuro de etidio expuestas a luz UV. Los amplicones del tamaño esperado (tabla 1) fueron purificados y clonados en el vector comercial de pDrive Cloning Vector (QIAGEN PCR Cloning Kit). Se realizó la transformación por choque térmico de células químicamente competentes *E. coli DH5α* y la selección mediante liberación de insertos mediante reacciones de restricción empleando la enzima *EcoR1*. Finalmente las clonas positivas de cada inserto serán enviadas al servicio de secuenciación.

RESULTADOS

La planta se localizó en los campos agrícolas de San Juan del Reparo situado en el municipio de Juan R. Escudero en el estado de Guerrero. Este lugar se encuentra a 230 m sobre el nivel del mar; el clima es del tipo Subhúmedo-Cálido con temperatura promedio anual de 22℃. El mes de enero se considera el mes más frio, y mayo como el más caluroso con una oscilación térmica menor a 5°C, es el más húmedo. La temporada de lluvias es en verano de hasta 1400 mm, siendo septiembre es el mes más lluvioso, la dirección del viento casi todo el año es de sur a norte [13]. Con algunas observaciones a campo abierto, cultivo en invernadero y en laboratorio, hemos encontrado que presenta un índice de germinación mayor al jitomate Saladet. Parece que germina y crece más lento pero con más fuerza y vigor.

Es una planta imponente en el terreno. Su crecimiento es tipo arbusto comportándose como una plaga agresiva, siendo nociva o letal para las plantas de porte bajo que crecen en su entorno. Posiblemente al privarlas de la luz y espacio. No tolera las podas, su crecimiento arbustivo, le permiten regular la luz y temperatura, lo que a su vez se traduce en conservar la poca humedad del suelo (figura 1).



Figura 1. Crecimiento en invernadero del jitomate silvestre. Crecimiento tipo arbustivo (a), frutos verdes al descubierto (b), morfología de las flores (c), y frutos pequeños de tamaño variable (d).

Esta variedad prolifera en temporadas secas (sin riego y cuidado alguno). Cuando se riega, la planta empieza a degenerar hasta su muerte. Aunque en invernadero se ha observado que se adapta a las humedad de la época de lluvias. Se ha adaptado a esas condiciones (sequia) en algunas regiones del estado de Puebla, que se ha conjuntado con su crecimiento en temporadas frías; siendo las fechas en la que empieza a aparecer en campo abierto. A campo abierto, su crecimiento se ve afectado en temporada de lluvias, pasando esta etapa, la planta reaparece. Los chapulines no tienen afinidad o gusto por esta variedad de jitomate. Es decir, atacan a cualquier cultivo, menos a esta variedad de jitomate, su único depredador visualizado es una hurraca, pero más que depredador puede ser el medio que propaga las semillas. Pudiera ser más resistente a algunos patógenos que afectan los cultivos de jitomate.

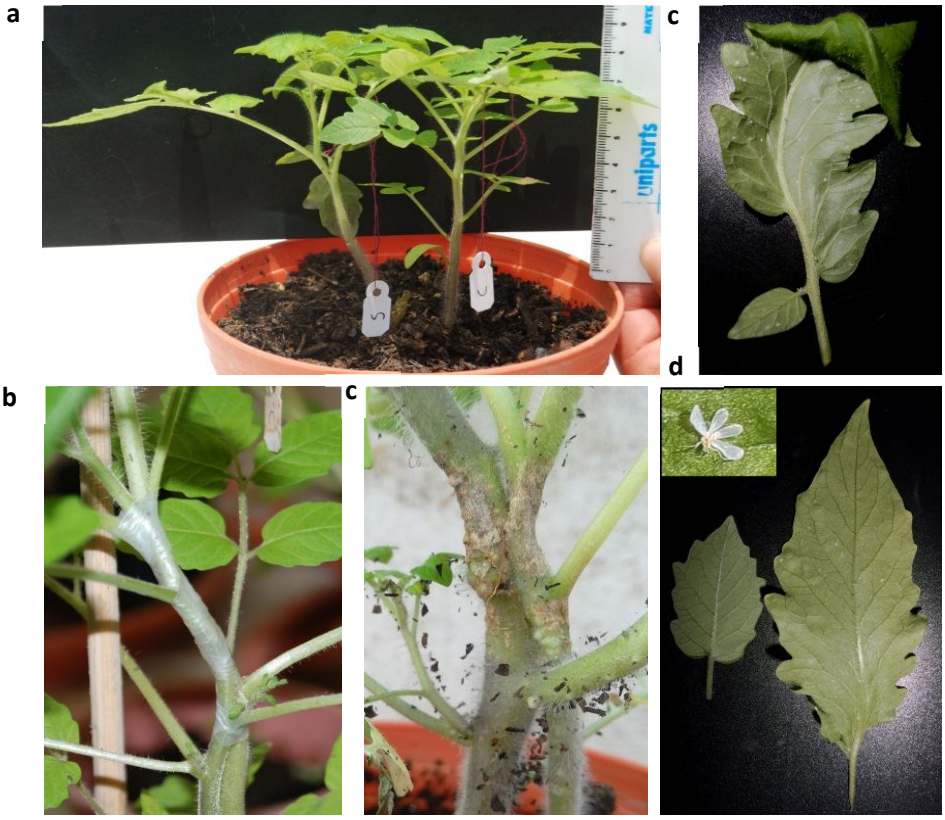


Figura 2. Cultivo de las dos variedades de jitomate silvestre y control (a), marcados como C (posiblemente Cherry) y S (Saladet), respectivamente; para los preparativos de injertos por contacto (b). Unión de las dos variedades de jitomate 15 días después de realizado el contacto manual en condiciones de ambiente controladas (c). Afecto de la mosquita blanca en hojas del jitomate control mostrando alta población del insecto y enrollamiento de las hojas (d). Hojas de injertos del jitomate silvestre (hoja del lado izquierdo) y control (hoja del lado derecho) mostrando una reducción importante en la presencia de mosquita blanca y ausencia del fenotipo alterado. Se aprecia la muerte de mosquita blanca en las hojas del jitomate silvestre.

Considerando algunas de sus importantes y posibles propiedades de resistencia y tolerancia, el jitomate silvestre lo empleamos para replicar fenómenos naturales que ocurren en la naturaleza para la transferencia de genes mediante mecanismos asexuales, es decir mediante injertos por contacto [14] (figura 2). Como se sabe esta alternativa ha permitido la combinación de genomas completos de dos o más diferentes especies lo que ha permitido la evolución, la adaptación o domesticación y el mejoramiento de dos o más especies. Con estas plantas se evaluará que los injertos hayan adquirido algunas de las propiedades de nuestra planta de estudio, el jitomate silvestre, además de que los productos o frutos tengan mejores características nutrimentales, por mencionar algo, y que las progenies sean fértiles para poder impactar la agricultura mediante la innovación agrícola, mediante la generación de nuevas especies. Es decir, contribuir con el desarrollo de la agricultura moderna y enfrentar los requerimientos alimenticios debidos al creciente en las poblaciones en conjunto con la problemática desencadenada por la deforestación y el calentamiento global.

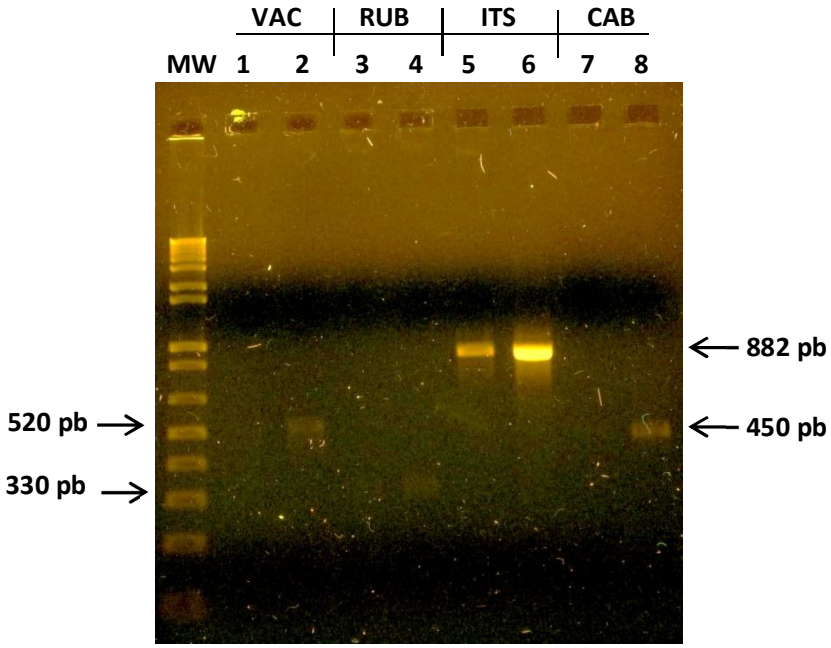


Figura 3. Amplicones purificados para su clonación. MW, marcador de peso molecular de 1Kb plus. Números impares corresponden al producto indicado (tabla 1) para jitomate silvestre; los pares corresponden los productos para el jitomate control.

Por otra parte y como se ha mencionado se realizará la caracterización molecular de la planta silvestre., para ello con el gDNA se realizaron reacciones de PCR con gradiente de temperatura y cuatro pares de oligonucleótidos degenerados (tabla 1). Como es de esperar se generó un patrón variable y amplio de amplificaciones que resultaría interesante caracterizar (figura no presentada).

Es importante mencionar que el gradiente de temperatura fue de 55 a 70°C. Las temperaturas óptimas para la amplificación de cada gen fueron de entre 55 y 60°C. Considerando los tamaños esperados de cada gen (tabla 1) se procedió a la purificación de los fragmentos correspondientes (figura 3) para su clonación el vector comercial pDive Cloning Vector. Se puede apreciar la buena calidad de cada producto; aunque concentraciones variables y bajas en algunos casos, los productos purificados son suficientes para proceder a su clonación.

Se ha trabajado en la transformación de células competentes y ha sido posible la obtención de algunas clonas positivas (figura 4)

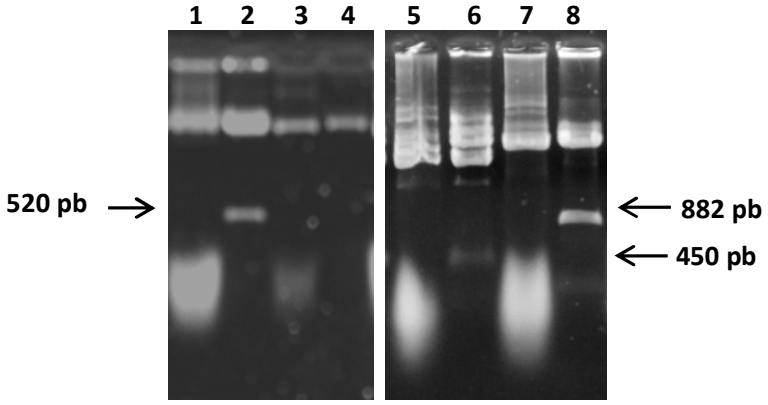


Figura 4. Análisis de restricción con plásmidos de algunas clonas candidatas mostrando la liberación de inserto para VAC del jitomate silvestre (carril 2, clona 20), para CAB de jitomate control (carril 6, clona 17), y para ITS de jitomate silvestre (carril 8, clona 10). Números impares corresponden a DNA plasmídico, números pares representan productos de las reacciones de digestión.

DISCUSIONES

Se ha mencionado que cuando los frutos del jitomate silvestre son verdes se encuentran al descubierto, es decir, son completamente visibles. Al madurar son cubiertos por el propio crecimiento arbustivo de la planta. Suponemos que eso se debe un fenómeno natural de protección a depredadores, ya que muchos animales e insectos son atraídos por el color del fruto.

Aprovechando las observaciones preliminares con la mosquita blanca resulta interesante retar el jitomate silvestre contra algunos patógenos comunes de Solanaceas; por mencionar al Virus del Rizado

Amarillo del Jitomate (TYLCV), entre otras cepas que serán obtenidas del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (SENASICA).

Hasta ahora se tiene solo un avance hacia la caracterización de cada uno de los genes., una vez realizado, se procederá al diseño de oligos específicos y la clonación completa del marco abierto de lectura cada gen. Hasta ese momento se podrá iniciar el análisis bioinformático para los estudios de filogenética y evolutivos de la planta silvestre.

Aunque no se presenta en la sección de resultados, los cultivos *in-vitro* y en soluciones hidropónicas fueron de utilidad para realizar las evaluaciones fisiológicas de toda la panta, incluyendo raíz. Se seleccionó la mejor solución hidropónica en la que se obtuvo mayor eficiencia de germinación, esta fue la solución Hoagland.

Será importante evaluar las características de la flor, fruto, hojas, raíces, antes y después del injerto, además del empleo de genes reporteros que demuestren la transferencia horizontal entre plantas, así como su movilidad a corta y larga distancia. Ello debido a que las características de flores y frutos, en general de las plantas injertadas, pudiera ser el resultado de la movilidad a través del floema de RNAs mensajeros.

Parece que el jitomate comercial adquiere características de la planta silvestre mediante transferencia horizontal de genes. Aunque no se tiene estimado para este proyecto sería interesante emplear esta planta para extraer y caracterizar los productos naturales que tienen el efecto contra la mosquita blanca, de ser así, se puede proponer como fuente de un bioplaguicida para aplicar en el control de plagas de jitomate y de otras plantas.

CONCLUSIONES

Aunque en los estudios de biología molecular existen diferentes plantas modelos de investigación como *Arabidospsis*, tabaco, arroz, y otras; esta variedad de jitomate puede ser una buena opción en los estudios clásicos de mejoramiento vegetal debido a su naturaleza de tolerancia a factores bióticos y abióticos que han sido observados. No dudamos que es en una fuente de información molecular básica, para asistir la selección y el aislamiento de genes de tolerancia, y en el futuro, poder generar semillas, de jitomate u otras plantas, mejoradas.

AGRADECIMIENTOS

A la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado de la BUAP por el apoyo económico para realizar parte del presente trabajo. Al Laboratorio de Biotecnología Molecular de Plantas del CINVESTAV, a cargo del Dr. Roberto Ruiz y Dra. Beatriz Xoconostle, por el apoyo con equipos, espacios, reactivos y sugerencias para que la propuesta tenga visión escalada a la parte aplicada en la generación de semillas mejoradas. Al Licenciado en Lenguas Modernas de la BUAP profesor Juan Miguel Lazcano Hernández, por su apoyo en la traducción al inglés.

REFERENCIAS

[1] Tanksley, S.D., Ganal, M.W., Prince, J.P., de Vicente, M.C., Bonierbale, M.W., Broun, P., Fulton, T.M., Giovannoni, J.J., Grandillo, S., Martin, G.B., Messeguer, R., Miller, J.C., Miller, L., Paterson, A.H., Pineda, O., Röder, M.S., Wing, R.A., Wu, W. and Young, N.D. (1992), "High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes", Genetics, 132: 1141–1160

[2] Faostat, http://faostat3.fao.org/home/index.html#VISUALIZE_TOP_20, consulta de marzo de 2014

[3] Pedley, K.F. and Martin, G.B. (2003), "Molecular basis of Pto-mediated resistance to bacterial speck disease in tomato", Annu. Rev. Phytopathol., 41: 215–243.

[4] Rivas, S. and Thomas, C.M. (2005), "Molecular interactions between tomato and the leaf mold pathogen Cladosporium fulvum", Annu. Rev. Phytopathol., 43: 395–436.

[5] Wasternack, C., Stenzel, I., Hause, B., Hause, G., Kutter, C., Maucher, H., Neumerkel, J., Feussner, I. and Miersch, O. (2006), "The wound response in tomato – role of jasmonic acid", J. Plant Physiol., 163: 297–306

[6] Giovannoni, J.J. (2007), "Fruit ripening mutants yield insights into ripening control", Curr. Opin. Plant Biol., 10: 283–289

[7] Otoni, W.C., Picoli, E.A.T., Costa, M.G.C., Nogueira, F.T.S. and Zerbini, F.M. (2003), "Transgenic Tomato", in: Plant Genetic Engineering. (Eds.: Singh, R.P. and Jaiwal, P.K.), Houston: Sci-Tech. Pub. Co., 5:41–131.

[8] Sévenier, R., van der Meer, I.M., Bino, R. and Koops, A.J. (2002), "Increased production of nutriments by genetically engineered crops", J. Am. Coll. Nutr., 21: 199S–204S.

[9] Dixon, R.A. (2005), "A two-for-one in tomato nutritional enhancement", Nat. Biotechnol., 23: 825–826.

[10] Basu, A. and Imrhan, V. (2007), "Tomatoes versus lycopene in oxidative stress and carcinogenesis: conclusions from clinical trials", Eur. J. Clin. Nutr., 61: 295–303.

[11] Stahl, W., Heinrich, U., Aust, O., Tronnier, H. and Sies, H. (2006), "Lycopenerich products and dietary photoprotection", Photochem. Photobiol., Sci., 5: 238–242.

[12] http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM12guerrero/municipios/12039a.html. Consulta de mayo de 2014

[13] Conn S.J., Hocking B., Dayod M., Xu B., Athman A., Henderson S., Aukett L., Conn V., Shearer .K. (2013), "Protocol: optimising hydroponic growth systems for nutritional and physiological analysis of Arabidopsis thaliana and other plants", Plant Methods., 5;9(1):4. doi: 10.1186/1746-4811-9-4.

[14] Fuentes I., Stegemann S.,, Golczyk H.,, Karcher D., Bock R. (2014), "Horizontal genome transfer as an asexual path to the formation of new species", Nature, 511(7508):232-5.

GENETIC DIVERSITY ANALYSIS IN VARIETIES OF ROSELLE (*Hibiscus sabdariffa* L.) BY CYP450 MARKERS

(Análisis de Diversidad Genética de Variedades de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) Mediante Marcadores CYP450)

Alejandro Rubio Melgarejo [ab]*, Moisés Cortés-Cruz[a+], María Luisa Machuca Sánchez[b], Leticia Mónica Sánchez Herrera[b], Yolotzin Apatzingan Palomino Hermosillo[b]

[a] Centro Nacional de Recursos Genéticos-INIFAP/ Boulevard de la Biodiversidad No. 400, Tepatitlán de Morelos C.P. 47600, Jalisco
[b] Universidad Autónoma de Nayarit, programa de Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias (CBAP) / Ciudad de la Cultura "Amado Nervo". Tepic, Nayarit. México. C.P. 63155 Tel. (311) 211 8800.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: cortes.moises@inifap.gob.mx

Área del Conocimiento: Agrobiotecnología.

ABSTRACT
Roselle crop (*Hibiscus sabdariffa* L.) is originary from Africa, belongs to the Malvaceae family and is cultivated in 15 states of Mexico. Current studies of roselle varieties show that its genetic diversity is the result of natural crosses and selection. However, in Mexico, there is a lack of information regarding varietal identification, population diversity and genetic structure. Although there are some studies about roselle, they only included few samples or different *Hibiscus* species. Considering this, the main objective of the present work is to estimate and characterize the genetic diversity of varieties of roselle cultivated in Mexico using molecular markers derived from cytochrome P450 (CYP450). Genomic DNA was obtained using a modified CTAB method from lyophilized leaf tissue from 63 different accessions from Nayarit, Guerrero, Colima and Puebla. The respective molecular analysis was performed using two different primer combinations, CYP1A1F/CYP2B6R and CYP2B6F/CYP1A1R by PCR. PCR products were resolved by vertical electrophoresis on 6% polyacrylamide gels and stained with silver nitrate. The basic genetic diversity parameters and principal coordinate analysis (PCoA) were performed with GenAlEx 6.5 software. Phylogenetic relationships were calculated using Neighbor-Joining (N-J) with MEGA 5.2 software. Results showed 100 % of polymorphism, and 0.420 Nei's Diversity Index. This value suggest moderate to high genetic diversity, in comparison with other previous studies (0.305, using AFLP´s markers). The PCoA identified four main groups (first three coordinates explain 74.76 % of variation). The N-J grouped two different main clusters, each one with two subgroups. These clusters allow the identification of the parental lines for the Nayarit sub-group, by placing them on the opposite ends of the dendogram, while the other materials showed no grouping trend to identify parietal's Nayarit materials, placing them at opposite sides of dendrogram while the rest of the materials showed no grouping trend.

Keywords: *Hibiscus sabdariffa* L; cytochrome P450; genetic diversity; principal coordinates.

RESUMEN
El cultivo de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) es originaria de África, pertenece a la familia Malvaceae. En nuestro país, es cultivada en 15 estados de la República. La diversidad genética presente en las

variedades actualmente utilizadas está dada principalmente por cruzamientos naturales y selección; no obstante existe un vacío en la identificación varietal, estudios sobre diversidad y estructura genética de las mismas. Aunque existen algunos estudios a nivel internacional, el número de muestras utilizado ha sido limitado o se han enfocado en otras especies de *Hibiscus*. Por tal motivo, es necesario estimar la diversidad genética de las variedades de Jamaica mediante marcadores moleculares. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar la diversidad genética de las variedades de Jamaica cultivadas en México con marcadores derivados del citocromo P450 (CYP450). Se incluyeron 63 accesiones originarias de Nayarit, Guerrero, Colima y Puebla. El DNA genómico se obtuvo a partir de tejido foliar liofilizado mediante el método de CTAB modificado. Para el análisis molecular se utilizaron las combinaciones de primers CYP1A1F/CYP2B6R y CYP2B6F/CYP1A1R. Se realizó la amplificación de los fragmentos por PCR y se visualizaron en geles de poliacrilamida (6%). Los parámetros básicos de diversidad genética y el análisis de coordenadas principales (ACoP) fueron realizados con el software GenAlEx 6.5. Las relaciones filogenéticas se identificaron con base a la metodología de Neighbor-Joining (N-J) con el software Mega 5.2. En los resultados se observó un 100% de polimorfismo y 0.420 de heterocigosidad esperada, siendo esta última considera como moderada a alta, en comparación con otros resultados previos (0.305, empleando marcadores AFLP´s). A través del ACoP las accesiones se separaron en cuatro grupos principales (los tres primeros ejes explican el 74.76 % de la variación), mientras que en el dendrograma N-J las muestras de Jamaica fueron separadas en dos grupos diferentes y cada uno con dos subgrupos y subdivisiones. Este último análisis separó claramente los progenitores que dieron origen a los materiales de Nayarit, ubicándolos en los extremos opuestos del dendrograma mientras que el resto de los materiales no mostraron ninguna tendencia en la agrupación.

Palabras Clave: *Hibicus sabdariffa* L; Citocromo P450; diversidad genética; coordenadas principales.

INTRODUCCIÓN

La jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.), también conocida como flor de jamaica, rosa de Jericó y roselle, es una planta dicotiledónea de la familia Malvaceae, que tiene su centro de origen en África [1, 2]. Actualmente es cultivada en regiones tropicales y subtropicales de Asia, Oceanía y América [3]. Esta planta fue introducida en México en el siglo XVII, desde entonces se ha cultivado en 15 estados del país, siendo Guerrero, Oaxaca, Michoacán y Nayarit los principales productores [4]. En cuanto a sus características morfológicas, la jamaica es una planta anual con tallo semileñoso, raíz pivotante, hojas alternas de color verde con bordes aserrados, peciolos largos y erguidos. Es una especie autógama con flores axilares y solitarias, presentando un número cromosómico 2n = 4x = 72 [5]. La corola es acampanada de color rosado o pálido. Esta se marchita y desaparece, dejando el cáliz libre. El fruto tiene una forma capsular que contienen un promedio de 20 semillas las cuales tienen un color negro [6]. De acuerdo a la variedad, el rendimiento del cáliz en toneladas oscila entre 0.5 a 2 toneladas por hectárea [3]. A pesar de la importancia de la jamaica, existe restringida información sobre la diversidad genética en esta especie. La mayoría de los estudios disponibles se han realizado con marcadores RAPD's y AFLP's donde el número de muestras utilizadas ha sido limitado o se han enfocado en otras especies del género *Hibiscus* [3]. Sin embargo, basados en las observaciones en campo, se sospecha que tiene una amplia diversidad genética, reflejado en su fenotipo, producto de la adaptación en los diferentes sitios de introducción. En la actualidad, los marcadores moleculares son herramientas que permiten cuantificar la diversidad genética, la elección del mismo dependerá del tipo de estudio. En plantas superiores, el citocromo P450 (CYP450) juega un papel importante en la síntesis de enzimas que intervienen el proceso de las biosíntesis de metabolitos y desintoxicación. Debido a su abundancia de esta familia de

genes en organismos vivos se ha explorado la posibilidad de emplearlos como marcadores universales en estudios genéticos [7]. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue analizar la diversidad genética de las variedades de jamaica cultivadas en México mediante el empleo de marcadores derivados del CYP450.

METODOLOGÍA

Se emplearon 63 accesiones de germoplasma de jamaica, las cuales fueron recolectadas en cuatro estados productores de México: Nayarit, Guerrero, Colima y Puebla. Estas accesiones son materiales mejorados y de uso común en estas regiones, obtenidos por la Universidad Autónoma de Nayarit y el Centro Experimental Iguala del INIFAP en el estado de Guerrero (Cuadro 1). Para la extracción de ADN, se emplearon hojas verdaderas de cada accesión después de 25 días de germinación. El método empleado fue el basado en CTAB con modificaciones [8].

Cuadro 1. Identificación de las accesiones de jamaica y procedencia.

No. Accesión	Variedad	Procedencia	No. Accesión	Variedad	Procedencia
1	Tempranilla negra	Colima	**33**	UAN 17	Nayarit
2	Tempranilla flor	Colima	**34**	UAN 26	Nayarit
3	Colima	Colima	**35**	UAN 27	Nayarit
4	Yersey acriollada	Puebla	**36**	UAN 23_1	Nayarit
5	Criolla roja	Puebla	**37**	UAN 12_1	Nayarit
6	Criolla roja violeta	Puebla	**38**	UAN 13_1	Nayarit
7	Criolla Huajicori	Nayarit	**39**	UAN 15	Nayarit
8	Negra UAN	Nayarit	**40**	UAN 24_1	Nayarit
9	Criolla morada	Colima	**41**	UAN 12	Nayarit
10	UAN 5	Nayarit	**42**	UAN 20	Nayarit
11	UAN 4	Nayarit	**43**	UAN 22	Nayarit
12	Criolla súper precoz	Colima	**44**	UAN 10_1	Nayarit
13	Criolla puebla precoz	Nayarit	**45**	UAN 29	Nayarit
14	Criolla precoz	Puebla	**46**	UAN 25_1	Nayarit
15	Negra Quiviquinta	Nayarit	**47**	UAN 19	Nayarit
16	China	Nayarit	**48**	UAN 30	Nayarit
17	UAN 6 Puga	Nayarit	**49**	UAN 9	Nayarit
18	UAN 31	Nayarit	**50**	UAN 16	Nayarit
19	UAN 6_1	Nayarit	**51**	UAN 18	Nayarit
20	UAN 16_2	Nayarit	**52**	UAN 21_1	Nayarit
21	UAN 6 Novillero	Nayarit	**53**	UAN 10_2	Nayarit
22	Morada x roja	Puebla	**54**	UAN 16_1	Nayarit
23	UAN 25	Nayarit	**55**	2 MQ_2	Guerrero
24	Bellotuda	Nayarit	**56**	$2Q_2$	Guerrero
25	UAN 7	Nayarit	**57**	4 Q_4	Guerrero
26	Tempranilla roja	Colima	**58**	6 Q_6	Guerrero
27	UAN 23	Nayarit	**59**	7 Q_7	Guerrero
28	UAN 11	Nayarit	**60**	$8Q_8$	Guerrero
29	UAN 24	Nayarit	**61**	9 cruza negra	Guerrero
30	UAN 21	Nayarit	**62**	10	Guerrero
31	UAN 8	Nayarit	**63**	11 coneja	Guerrero
32	UAN 13	Nayarit			

Análisis con marcadores derivados de CYP450. Para el análisis molecular fueron empleadas dos combinaciones de primers derivados del citocromo P450: CYP2B6F/CYP1A1R y CYP1A1F/CYP2B6R. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se realizó en un volumen total de 15 µL, conteniendo 50 ng de ADN, 0.66 µM de cada primer, 3 mM de $MgCl_2$ y 0.6X de REDTaq® ReadyMix™ PCR (SIGMA-ALDRICH). Las condiciones de amplificación fueron: una desnaturalización inicial de 5 min a 95°C, 35 ciclos de 45 s a 94°C, 45 s a 54°C, 90 s a 72°C y una extensión final de 10 min a 72 °C. Los productos de PCR fueron separados en geles de poliacrilamida al 6 % y se tiñeron con nitrato de plata [9]. Se elaboró una matriz de datos binarios a partir de la presencia y ausencia de bandas en los geles de poliacrilamida. Los parámetros básicos de diversidad genética calculados fueron el número de alelos (N_a), numero de alelos efectivos (N_e), heterocigosidad esperada (H_e) y porcentaje de polimorfismo (%P), los cuales se obtuvieron por medio del programa GenAlEX 6.5 [10]. Las relaciones filogenéticas entre las diferentes accesiones de jamaica fueron establecidas empleando la metodología de Neighbor-Joining (N-J) con el programa Mega 5.2 [11] además se realizó el Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) utilizando el programa GenAlEX 6.5.

RESULTADOS

Se detectaron un total de 22 loci, donde la combinación CYP1A1F/CYP2B6R reveló el número mayor de bandas polimórficas con un total de 12, mientras que la segunda combinación, CYP2B6F/CYP1A1R, detectó 10. Ambas combinaciones revelaron un 100% de polimorfismo. La H_e fue de 0.420, el número de alelos diferentes encontrados fue de 2 y el número de alelos efectivos fue 1.7. El PCoA mostró que las tres primeras coordenadas lograron explicar el 74.76 % de la variación. La proyección de las accesiones en las dos primeras coordenadas principales permitió distinguir cuatro grupos (Figura 1). El dendograma basado en el método N-J muestra que las 63 accesiones de jamaica fueron separadas en dos grupos diferentes y cada uno con dos subgrupos y subdivisiones (Figura 2), además, no se identificaron genotipos duplicados.

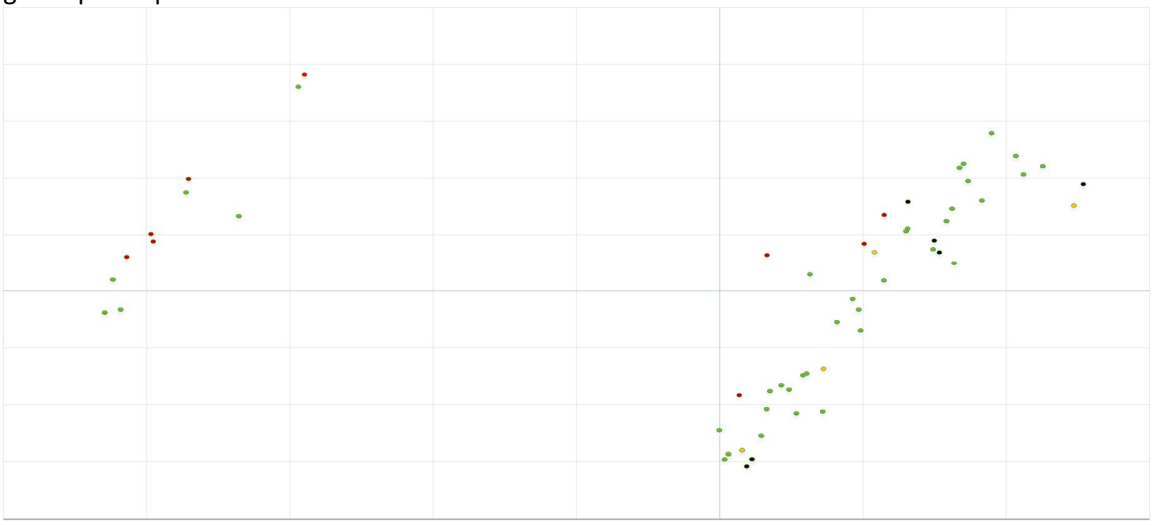


Figura 1 .La PCoA en dos dimensiones muestra la relación entre las 63 accesiones de jamaica con base en los datos de obtenidos con dos combinaciones de marcadores derivados del CYP450.Nayarit (verde), Guerrero (rojo), Colima (negro) y Puebla (amarillo).

DISCUSIÓN

La H_e en el presente trabajo (0.420) se considera como moderada a alta, en comparación con otros estudios previos (0.305), en el cual emplearon marcadores AFLP´s [12]. Además el CYP450 se ha utilizado en estudios de otras especies como (*Oryza sativa* L.) [13] y (*Curcuma amada* Roxb) [14], en los cuales han permitido tener niveles altos de diversidad genética. Esto demuestra que los marcadores derivados del CYP450 son útiles en la estimación de parámetros de diversidad genética. El análisis de correspondencia en dos dimensiones aplicado a las 63 accesiones de jamaica mediante las dos combinaciones (Figura 1), demostró que algunas accesiones tienen entre si una mayor relación genética ya que definió cuatro grupos principales aquellos que sus genotipos están genéticamente relacionados. [8]. Las relaciones genéticas entre las accesiones de jamaica se establecieron a partir de un dendograma donde se determinó que no existen genotipos duplicados y ubicó a los progenitores que dieron origen a los materiales de Nayarit, en los extremos del dendograma (Figura 2).Sin embargo, para el resto de los materiales, no se identificó ninguna tendencia en la agrupación. Al contrastar las PCoA con el dendograma N-J se observa claramente como los materiales no se agrupan de acuerdo a su lugar de procedencia.

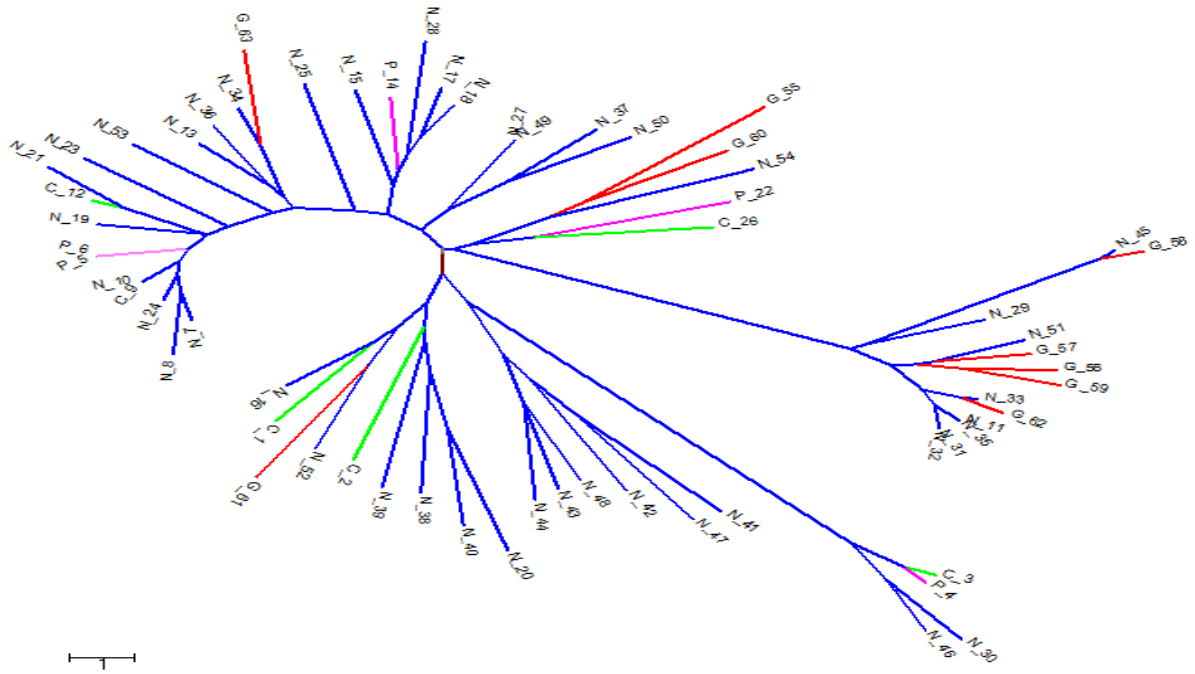


Figura 2. Dendrograma basado en N-J [15] muestra que las 63 accesiones de jamaica fueron separadas en dos grupos diferentes y cada uno con dos subgrupos y subdivisiones. Nayarit (Azul), Guerrero (rojo), Colima (verde) y Puebla (rosa).

CONCLUSIONES

La utilización de los marcadores del citocromo P450 en accesiones de *H. sabdariffa* L y su análisis separó claramente los progenitores que dieron origen a los materiales de Nayarit, ubicándolos en los extremos opuestos del dendrograma mientras que el resto de los materiales no mostraron ninguna tendencia en la agrupación.

En el presente estudio, empleando 63 accesiones de Jamaica, se identificaron altos niveles de diversidad comparado con otros resultados. Estos resultados indican que el CYP450 es una opción para el análisis de la diversidad genética ya que se puede encontrar mayor número de polimorfismos debido a la abundancia de esta familia de genes en los organismos vivos.
Además, no se encontraron accesiones duplicadas.

REFERENCIAS

[1] Maiti, R., Rodriguez, H., Satya, P. (2010), "Horizon of world plant fibres: an insight", Pushpa Publishing Hause, Kolkata.

[2] Solorzano, R., Macario, T. (2002), "Estudio de la factibilidad del cultivo, procesamiento y comercialización de la rosa de Jamaica ", ALTERTEC/SEPRAGO, Guatemala. 16 p.

[3] Gómez, J., Martínez, L., López, I., Silos, H., Ramírez, F., Andrade, I. (2008), "Multiple shoot regeneration of Roselle (*H. sabdariffa* L.) from a shoot apix culture system", International journal of Botany, 4(3):326-302.

[4]Domínguez, L., Sánchez, M., López, S., Morales, R. (2007), "Propiedades físicas de la semilla de Jamaica Criolla Mexicana (*Hibiscus sabdariffa* L.) en función de su contenido de humedad", Ciencias Agrícolas Informa, 16:30-36.

[5] Alcoces, N. (2009), "Estudios citogenéticos de *H. sabdariffa* L. (Malveacae)", UDO Agrícola, 9(3):595-598.

[6] Hidalgo, S., De León, W., Ruano, H., Cano, L. (2009),"Caracterización de trece genotipos de rosa de jamaica *Hibiscus sabdariffa* en Guatemala", Agronomía Mesoamericana ,20(1):101-109.

[7] Inui, H., Kodama, T., Ohkawa, Y., Ohkawa, H. (2000), "Herbicide metabolism and cross-tolerance in transgenic potato plants co-expressing human CYP1A1, CYP2B6, and CYP2C19" , Pesticide Biochemistry and Physiology, 66(2): 116-129.

[8] Huang, Q., Wang, X., Kong, H., Guo, y., Guo, A. (2013), "An efficient DNA isolation method for tropical plants", 12(19):2727-2732.

[9] Sanguinetti, C., Dias, E., Simpso, A. (1994),"Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels", BioTechniques, 17(5):914-921.

[10] Peakall, R., Smouse, P. (2012)," GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update", Bioinformatics, 28:2537-2539.

[11] Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011), "MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods", Molecular biology and evolution, 28(10): 2731-2739.

[12] Ponciano, K., Hidalgo, S. (2012), "Diversidad genética de rosa de jamaica en Guatemala revelada por marcadores AFLP", Agronomía mesoamericana, 23(1): 63-71.

[13] Yamanaka, S., Jatoi, S., San, S., Kothari, S., Htut, T., Watanabe, K. (2013), ”Genetic diversity of Myanmar rice and their implementation on management methods”, African Journal of Biotechnology, 10(8): 1290-1298.

[14] Jatoi, S., Kikuchi, A., Ahmad, D., Watanabe, K. (2010), “Characterization of the genetic structure of mango ginger (*Curcuma amada* Roxb.) from Myanmar in farm and genebank collection by the neutral and functional genomic markers“, Electronic Journal of Biotechnology, 13(6): 4-5.

[15] Saitou, N., Nei, M. (1987), ”The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees”, Molecular Biology and Evolution, 4:406-425.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

ENDOPHYTIC BACTERIA FROM DIFFERENT MAIZE VARIETIES AND EVALUATION OF ITS AGRONONOMIC PROPERTIES

(Bacterias endófitas de diferentes variedades de maíz y evaluación de sus propiedades agronómicas)

Brigitte Estefanía Lew Sánchez[a*], Itzayana Becerra Fuentes[a*], Miguel J. Beltrán García[a+], Gloria Margarita Macedo Raygoza[b], Claudia Ivette Cisneros Reyes[c]

[a]Departamento de Química, Instituto de Ciencias Exactas y Terrestres (ICET), Universidad Autónoma de Guadalajara (UAG). Av. Patria 1201, Col. Lomas del Valle, CP 45129, Zapopan, Jalisco, México. Instituto de ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California. Mexicali, Baja California.
[b] Instituto de ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California. Mexicali, Baja California.
[c] Centro de Investigación Biológica y Aplicada, Tlaxcala.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: mbeltran71@hotmail.com

Área del conocimiento: Agrobiotecnología

ABSTRACT
Maize is the most important agricultural crop in Mexico. Nowadays the usage of Nitrogen fertilizers is essential in maize production being necessary to maintain growth and grain yielding. However, the N-fertilizers application provokes susceptibility to diseases, soil degradation and enhances environmental contamination by volatilization or leaching. Our project is searching a bioformulation based on that plant-bacteria symbiosis, using the beneficial properties of endophytic bacteria isolated from different maize varieties to decrease N-fertilizers. Our main goal was the isolation and selection of endophytic bacteria, identifying which are capable to promote plant growth and organic nitrogen transfer using N15 marked compounds. Fifty hybrid maize (MH) and purple maize (MM) seeds, leaves, roots and grain of criollo maize were selected for the endophyte extraction. To obtain endophytes, 100 were washed and then macerated; the supernatant was diluted and plated on a nutrient agar. A total of 51 bacteria were isolated from maize species. The bacteria morphologies were: Gram positives rod 62.79%, 20.94% negative rods and 16.27% positive cocci. The isolated bacteria were tested for agronomic traits as auxin, proteases and siderophores production, Cellulolytic activity, phosphate solubilization, and nitrogen fixation. Ninety percent were positive for phosphate solubilization, 100% had the capability of fixing Nitrogen, 59% were positive for auxins with a strain of *Bacillus subtilis* as the best producer, 60% secreted siderophores and also could use cellulose as carbon source. Isolated endophytic bacteria were identified by amplification of 16S rRNA with the primers 27F and 1525R and by MALDI-TOF Mass Spectrometry, with 9 identified genera: *Bacillus Ochrobactrum Microbacterium Enterobacter Alcaligenes Staphylococcus Paenibacillus Corynecterium Brevibacterium.*

Keywords: Maize, Biocontrol, Bioformulation, Endophytic bacteria.

CHARACTERIZATION OF BACTERIAL LIPOPEPTIDE EXPRESSION OF ENDOPHYTIC BACTERIAL STRAINS USING MALDI-TOF AND GENE SEQUENCIATION

(Caracterización de la expresión de lipopéptidos bacterianos de cepas nativas usando MALDI-TOF y secuenciación de genes relacionados).

Esteban Beltrán-Gracia[a]*, Gloria Macedo-Raygoza[b], Aurora X. Huerta Robles[b], Juan Villafaña-Rojas[a], Miguel J. Beltrán-García[a+]

[a]Departamento de Química-ICET, Universidad Autónoma de Guadalajara.
[b]Instituto de ingenierias Universidad Autonoma de baja california, Mexicali Baja California

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: mbeltran71@hotmail.com

Área del Conocimiento: Agrobiotecnología.

ABSTRACT
Phytopathogenic fungi affecting crop and post-harvested vegetables are a major threat to food production and food storage worldwide. Intensive agrochemicals use has led to the emergence of resistant pathogens. Biological control is and alternative through the use of natural antagonistic microorganisms has come to change chemical pesticides for more rational and safe crop management. If the native strains can be reintroduced to an endophytic stage, this will probably shown an improvement for the plant health. The main objective in this work was to find a relationship between molecular techniques and mass spectra made by MALDI-TOF to detect bacterial lipopeptides. We used TSA medium for growth 12 endophytic bacteria isolated from different plants. The extraction of bacterial DNA then PCR analysis were for 13 genes. Bacterial strains were incubated in mineral medium for 48 hours, after biomass removal, a precipitation with 6N HCl and extraction with methanol was performed. Mass analysis was done on a Bruker-Daltonics Autoflex Speed operated in reflectron positive mode and DHB as matrix. Twelve bacteria showed some genes related to lipopeptides previously reported. A methanolic extract was used to detect and identify lipopeptides, performing MALDI-TOF mass spectrometry; these results correlated to the PCR analysis. *B.subtilis*, *B.tequilensis* and *B.amyloquefaciens* showed the highest number of positives genes for lipopeptide synthesis. It was interesting to find genes corresponding to lantibiotics such as Ericin and Sublancin which contain a non-proteinogenic amino acid (lantionin), The methanolic extracts were analyzed by MALDI-TOF and we found lipopetides compounds as: Surfactin, Iturin Fengycin and the lantibiotic Ericin that shows a peak mass range 2,900-3500 m/z.

Keywords: Lipopeptides,MALDI-TOF, endophytes, antifungal metabolites.

A SEED–TRANSMITTED BACTERIA FROM *Agave tequilana* WEBER

(Bacterias trasmitidas de semilla de *Agave tequilana Weber*)

Evelyn Yuritssy Garcia Ochoa[*a], Andrea Gutierrez Santa Ana[a], Gloria Macedo-Raygoza[b], Claudia Cisneros-Reyes [b], Miguel J. Beltrán-García[a+]

[a]Universidad Autónoma de Guadalajara, Departamento de Química.
[b]Universidad Autónoma de Baja California, Instituto de Ingeniería.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: mbeltran71@hotmail.com

Área del Conocimiento: Agrobiotecnología.

ABSTRACT
Endophytic bacteria that can be found within plant tissues bring benefits to ensure survival factors to the shortage of nutrients that increase plant biomass and reduce dependence of soil fertilization. Our objective were evaluate the effect some of these bacteria on the soil and the host plant, using bacteria isolated from the seeds. The *Agave tequilana* seed was collected and washed with Na-hypochlorite (3%) and 85% ethanol to eliminate microorganisms from the surface, the seeds were crushed in saline solution, while some washed seeds are placed directly on TSA agar. Tests were performed to identify features (73 bacteria). Amplifying a segment of 16S rDNA and MALDI-TOF mass spectrometer made the identification of bacteria. To evaluate the effect of the bacteria to increase biomass with bulbils, we used as support sterilized sand. After six months of inoculation of the plant with the selected bacteria we evaluate biomass increment. Also we evaluated biomass in plants watered with sterile water, mineral MMS solution and the E. coli a non-endophytic bacteria. The results of the identification of bacterial isolates obtained from the seed were: *Enterobacter cowanii, E. cloacae, Staphyloccocus sciuri, Streptomyces sp.* and *S. champauatii, Kocuria marina, Pantoea agglomerans, B. subtilis, B. pseudomycoides, M. oxydans, Achromobacter spanius, B. pumilus, B. safensis, A. denitrificans, P. aeruginosa, L. crispatus* and *B. tequilensis*. The results of increased biomass in the agaves treated with *B. tequilensis* showed that the inoculation with living bacteria was the condition that increases the biomass more efficiently. Currently, we are trying bulbils with *E. cloacae* and *K. marina. K. marina* an actinomycete first-reported in marine sediments.

Keywords: Agave, Seed-transmitted, Endophytes.

ASSOCIATED-SEED MICROORGANISMS IN *Agave* SPECIES: COMPARATIVE OF DIFFERENT MEXICAN AGAVES, ISOLATION, IDENTIFICATION AND BACTERIAL AGRONOMIC PROPERTIES

(Análisis de microbiota de semilla: comparativo de distintos agaves mexicanos, aislamiento, identificación y propiedades agronómicas bacterianas)

Jorge Alberto Peralta-Mendoza[a]*, Ana Leticia Trewartha-Humarán[a], Gloria Macedo-Raygoza[b], Claudia Ivette Cisneros Reyes[c], Paolo Di Mascio[d], Miguel Juan Beltrán García[a+]

[a]Universidad Autónoma de Guadalajara, Facultad de Ciencias Químicas, Zapopan, Jalisco 45020, 2 Departamento de Bioquímica., Instituto de Ingenierías,
[b]Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, Baja California.,
[c]Centro de Investigación Biológica y Aplicada, Tlaxcala.,
[d]Universidade de Sao Paulo, Brasil,

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: mbeltran71@hotmail.com

Área del Conocimiento: Agrobiotecnología.

ABSTRACT
There are more than 300 species of agave in whole world, and 75% existed in Mexico. Agaves have been exploited in various ways for over 10,000 years therefore is an important part of Mexican culture and iconography around the world. We are thinking of that Agave plants share similar microbiomes even though they are from different ecosystems and regions; also as secondary hypothesis, we expected that *Bacillus tequilensis* is a shared bacteria in all Agaves genus. At this first stage of our analysis, we isolated endophytic bacteria from two wild Agave species from two regions, the Agave "Raicilla" from Jalisco and the *Agave angustifolia* (used for Bacanora production) from Sonora. First we remove epiphytic microorganisms from seeds by chemical treatment and then we collected bacteria-emerged form seed placing directly on nutrient agar and macerated seeds after four weeks of incubation. 16S DNAr and MALDI-TOF mass spectrometry were used for identified the isolated bacteria. Also we evaluated the agronomic traits of these bacteria like nitrogen fixing activity, phosphate solubilization and siderophore and auxins (IAA) production. 51 bacteria were isolated form Agave Raicilla from 6 genera. The agronomic traits on Agave Raicilla-bacteria gave the follow results: 100% of nitrogen fixing activity and siderophore production, 49% produced auxins and 31% solubilized phosphates. From Agave Bacanora, we have isolated 59 bacteria from 7 genera. In Agave Raicilla, we found: *Bacillus, Enterobacter, Staphylococcus, Alcaligenes, Pseudomonas* and *Lactobacillus.* In Agave Bacanora, we have found: *Bacillus, Sphingomonas, Micrococcus, Staphylococcus, Listeria, Aeromonas and Lactobacillus* (further research is being made). If we compare microbiotas we can observe the genera: *Bacillus, Lactobacillus* and *Staphylococcus* were shared in both Agaves. Also, we have found *Bacillus tequilensis* in Agave Raicilla and on Agave Bacanora we found *Bacillus subtilis,* according to Mass Spectrometry MALDI-TOF, which is strongly related to *Bacillus tequilensis*, genomic analysis has to be made to confirm the identity.

Keywords: Endophytes; Biocontrol; Agave; *Bacillus tequilensis*.

A COMPARISON OF THREE METHODS TO OBTAIN MITOTIC METAPHASE CHROMOSOME PREPARATIONS IN *Polianthes tuberosa* L. VAR. 'SINGLE'

(Comparación de tres métodos para la obtención de preparaciones cromosómicas metafásicas en *Polianthes tuberosa* Var. 'Simple')

José Manuel Rodríguez-Domínguez [a,*], Sebastián González-Pérez [b], Rodrigo Barba-González [a], Ernesto Tapia-Campos [a,+]

[a] Unidad de Biotecnología Vegetal, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. / Av. Normalistas 800, Guadalajara, Jalisco, C.P. 44270, México.
[b] Universidad Tecnológica de la Selva / Entronque Toniná carretera Ocosingo-Altamirano Km 0.5 S/N Predio Laltic C.P. 29950 Ocosingo, Chiapas.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: etapia@ciatej.mx

Área del Conocimiento: Agrobiotecnología.

ABSTRACT
The genus *Polianthes* (Asparagaceae) is native to Mexico and includes 15 species three varieties and a few cultivars. *Polianthes tuberosa* L. 'Double' and 'Single' is the only species cultivated as ornamental comercial cultivar due to its importance as cut flower and essential oil in perfumery industry. The difficult preparation of plant metaphases, caused by the rigid cell wall and celular debris, has hampered the determination of chromosome number and the wide application of modern cytogenetic techniques to several species. Since the chromosome number of plants can provide useful information for various fields of research including karyotaxonomy, genetics, cytogenetics, plant breeding, ecology, biogeography and molecular biology, it is essential to obtain cytoplam-free metaphases with well-spread chromosomes preparations; for this reason, many different methods of making preparations for chromosome studies have been described: "Squash", "Splash", "SteamDrop", etc. The plant material used in this study was collected in Tantoyuca Veracruz, Mexico. Chromosome observations were made in root tips meristems treated with 1- bromonaphtalene (1:1000 water solution) overnight 4°C, fixed in 3:1 methanol:acetic acid (24 h) and preserved in 70% methyl alcohol 4°C. The root tips were placed in eppendorf tubes and incubated at 37°C for 3 h in a solution of enzyme containing 0.2% (w/v) cellulase + 0.2% (w/v) pectolyase + 0.2% (w/v) cytohelicase in 10mM citrate buffer (pH 4.5); the slides were made acoording to "Squash", "Splash", "SteamDrop" methods. All samples were stained with acetorcein at 2%. The "Squash" and "SteamDrop" methods were efficient showing well-spread and non-overlapping chromosomes but the "SteamDrop" showed also cytoplam-free metaphases.

Keywords: Asparagaceae; ornamental; cytogenetics.

RESUMEN

El género *Polianthes* (Asparagaceae) es nativo de México e incluye 15 especies, tres variedades y unos pocos cultivares. *Polianthes tuberosa* L. en sus variedades 'Doble' and 'Simple' es la única especie cultivada con fines ornamentales como flor de corte y para la extracción de aceites esenciales en la industria de la perfumería. La dificultad en la obtención de buenas metafases de células vegetales (debido a la pared celular rígida y a los desechos celulares), ha obstaculizado la determinación del número cromosómico así como la aplicación de técnicas citogenéticas modernas en varias especies. Puesto que el número de cromosomas en plantas puede proveer información útil en varios campos de investigación tales como cariotaxonomía, genética, citogenética, mejoramiento vegetal, ecología, biogeografía, y biología molecular, es esencial la obtención de preparaciones metafásicas con cromosomas bien dispersos y libres de citoplasma; para este fin, se han descrito diferentes métodos tales como las técnicas de "Squash", "Splash", "SteamDrop", etc. El material vegetal utilizado en este estudio fue colectado en el municipo de Tantoyuca Veracruz, México. Las observaciones cromosómicas se realizaron en ápices radiculares tratados con 1- bromonaftaleno (1:1000 en solución acuosa) durante toda la noche a 4°C, fijados en solución 3:1 metanol:ácido acético (24 h) y preservados en metanol al 70% a 4°C. Los ápices radiculares fueron colocados en tubos eppendorf e incubados a 37°C durante 3 h en una mezcla enzimática conteniendo 0.2% celulasa + 0.2% pectiolasa + 0.2% citohelicasa en buffer de citrato 10mM (pH 4.5); Las laminillas se prepararon de acuerdo a los métodos "Squash", "Splash" y "SteamDrop". Todas las muestras se tiñeron con acetorceína al 2%. Los métodos de "Squash" y "SteamDrop" fueron eficientes, presentando una buena dispersión cromosómica sin cromosomas traslapados; el método "SteamDrop" presentó además metafases libres de citoplasma.

Palabras Clave: Asparagaceae; ornamental; citogenética.

INTRODUCCIÓN

El género *Polianthes* pertenece a la familia Asparagaceae y a la subfamilia agavoidea, es endémico de México distribuyéndose en 18 estados del territorio mexicano, desde Chihuahua y Tamaulipas hasta el norte de Oaxaca, siendo Jalisco la entidad con el mayor número de especies [1]. El número de especies de este género ha variado según diversos autores, encontrándose alrededor de 15 diferentes, de las cuales, *Polianthes tuberosa* (tanto en su variedad "simple" como en su variedad doble") es la única que se utiliza con fines ornamentales como flor de corte y en la industria de la perfumería.

Estudios citogenéticos realizados en la especie *Polianthes tuberosa* var. "simple", han demostrado que es una especie diploide con un número cromosómico 2n=2x=60, siendo su número básico x=30 presentando un cariotipo bimodal consistente en cinco pares de cromosomas grandes y 25 pares de cromosomas pequeños [2,3].

La obtención de preparaciones cromosómicas con metafases libres de citoplasma y con una buena dispersión de cromosomas es un factor clave en estudios citogenéticos tales como conteos cromosómicos, aplicación de técnicas de bandeo, hibridación *in situ*, así como para la obtención de cariotipos e idiogramas. A diferencia de las células animales, las vegetales presentan una pared rígida, lo que hace que la obtención de preparaciones de buena calidad sea más difícil. Existen dos técnicas principales de preparaciones cromosómicas en plantas: "Squash" y "Splash" [4], la primera consiste en realizar un aplastado del tejido meristemático (brote o raíz) colocado entre un portaobjetos y un cubreobjetos a fin de disgregar el tejido y lograr la dispersión cromosómica, mientras que el segundo consiste en realizar una suspensión celular a partir del tejido meristemático la cual se gotea sobre un portaobjetos, permitiendo de esta manera la dispersión de los cromosomas. Con base en estudios relacionados con la dinámica de dispersión cromosómica [5,6], recientemente Kirov y cols. [7]

desarrollaron un nuevo método conocido como "SteamDrop", en el cual la humedad, la temperatura, y el tiempo de secado juegan un papel importante en la obtención de preparaciones citogenéticas de excelente calidad en varias especies vegetales. El objetivo del presente trabajo fue comparar los tres métodos para obtener preparaciones cromosómicas metafásicas en *Polianthes tuberosa* var. "Simple" a fin de determinar cuál de ellos es más eficiente.

METODOLOGÍA

Se utilizaron ápices radiculares provenientes de plantas de *Polianthes tuberosa* Var. "Simple" colectadas en una población cultivada localizada en Tantoyuca, Veracruz. Las raíces se cortaron a una longitud de 0.5-1.0 cm colectándose temprano por la mañana y se colocaron en una solución 0.1% de α-bromonaftaleno durante 24 hrs a 4°C, posteriormente se fijaron en una solución 3:1 de metanol:ácido acético y se almacenaron a -20°C hasta su uso posterior. Se utilizó solamente la región meristemática que presenta una alta división mitótica (reonocida por su color blanco lechoso) y se lavaron con agua mili-Q seguidos de un lavado en solución buffer de citrato (10 mM citrato trisódico y 10 mM ácido cítrico, pH 4.5), ambos lavados se realizaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se digirieron en una mezcla enzimática (0.2% celulasa RS, 0.2% pectoliasa Y23 y 0.2% citohelicasa disueltas en una solución 10mM de buffer de citrato, pH 4.5) durante 120 minutos a 37°C. Una vez digeridos, los ápices radiculares se distribuyeron en tres grupos a los cuales se les aplicó una de las tres técnicas a cada grupo: "Squash" (aplastado de la raíz entre el portaobjetos y cubreobjetos), "Splash" (de acuerdo al protocolo descrito por [4]) y "SteamDrop" (de acuerdo a [7]). Las preparaciones se tiñeron con aceorceína al 2% y se observaron al microscopio. Se evaluaron 100 metafases de cada tratamiento registrándose las metafases con cromosomas totalmente traslapados, con el 50% de cromosomas dispersos y con cromosomas totalmente dispersos, las 5 mejores se fotografiaron en un fotomicroscopio Leica con un aumento de 100X + 1.6X para realizar el conteo del número cromosómico.

RESULTADOS

El Cuadro 1 muestra el número de metafases evaluadas en las preparaciones correspondientes a los tres métodos de dispersión cromosómica, en donde se aprecia que tanto las técnicas de "Squash" como "SteamDrop" presentaron metafases de buena calidad con cromosomas totalmente dispersos.

Cuadro 1. Evaluación de metafases examinadas en preparaciones de ápices radiculares de Polianthes tuberosa Var. "Simple" utilizando tres métodos de dispersión cromosómica.

MÉTODO	No. DE METAFASES EXAMINADAS	METAFASES CON CROMOSOMAS TOTALMENTE TRASLAPADOS	METAFASES CON EL 50% DE CROMOSOMAS DISPERSOS	METAFASES CON CROMOSOMAS TOTALMENTE DISPERSOS
Squash	100	47	38	15
Splash	100	87	13	0
SteamDrop	100	61	31	8

En la figura 1 se muestran preparaciones obtenidas con los tres métodos de dispersión cromosómica en donde se observan metafases sin cromosomas traslapados cuando se aplicaron las técnicas de "Squash" y "SteamDrop" (Figura 1b y c). Sin embargo para la técnica de "Splash" no fue posible obtener metafases con cromosomas totalmente dispersos (Cuadro 1 y Figura 1a).

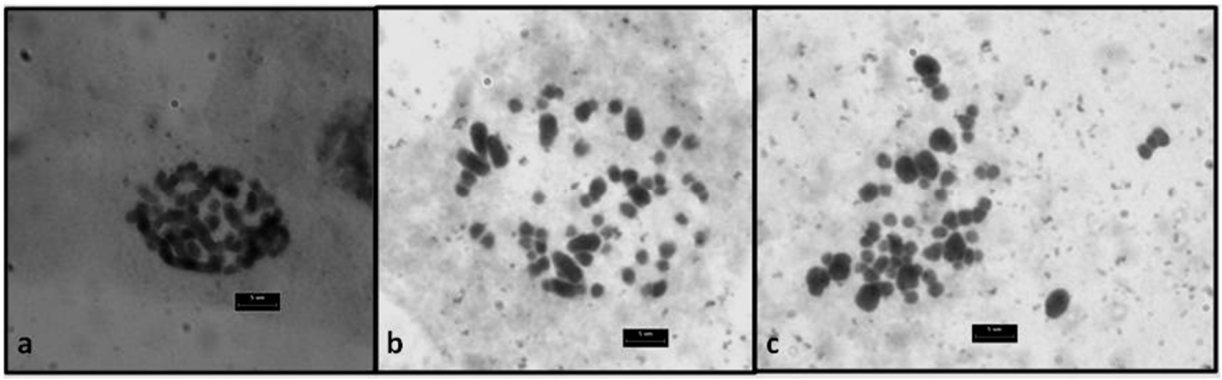


Figura 1. Preparaciones metafásicas obtenidas a partir de ápices radiculares de Polianthes tuberosa Var. "Simple" utilizando tres métodos de dispersión cromosómica. ***a)****"Splash".* ***b)****"Squash".* ***c)****"SteamDrop". Barra=5µm.*

En las preparaciones sin cromosomas traslapados obtenidas tanto de los métodos "Squash" y "SteamDrop" se realizó el conteo del número cromosómico para esta especie, el cual fue de 2n=60 presentando un cariotipo bimodal con 10 cromosomas grandes y 50 cromosomas pequeños (Figura 1b y c); los conteos se realizaron en al menos cinco metafases de cada tratamiento.

DISCUSIONES

Los resultados observados confirmaron que el número cromosómico en *Polianthes tuberosa* Var. "Simple" es 2n=60 tal y como había sido reportado anteriormente por otros autores [2,3]. Con respecto a los resultados obtenidos al comparar los tres métodos de dispersión cromosómica, se obtuvieron preparaciones de buena calidad solamente con los métodos "Squash" y "SteamDrop", y aun cuando se obtuvo una mayor cantidad de metafases con cromosomas totalmente dispersos con "Squash", la mayoría presentaban algunos restos de citoplasma (Figura 1b), hecho que no ocurrió en las preparaciones obtenidas con "SteamDrop" (Figura 1c), por lo cual podríamos recomendar el uso del método "Squash" para realizar conteos del número cromosómico en plantas de esta especie o de este género, sin embargo si se desean realizar preparaciones para hibridación *in situ* sería más conveniente utilizar el método "SteamDrop", ya que los restos de pared celular o citoplasma podrían actuar como una barrera que evite que la sonda se una al ADN u obstaculice la visualización de las señales en los cromosomas, sobre todo en sondas de una sola copia [8].

Por otra parte, referente al método "Splash", otros investgadores han tenido buenos resultados al aplicarlo en especies con cromosomas pequeños (longitud menor a 10µm) [4,9], sin embargo para nuestro estudio, dicho método no fue efectivo aun cuando la especie *Polianthes tuberosa* presenta cromosomas pequeños, lo cual posiblemente se debe a que es más difícil hacer preparaciones de unas especies que de otras, siendo quizás esta la razón por la cual se han reportado diversas metodologías para la obtención de buenas preparaciones en diferentes especies vegetales.

CONCLUSIONES

En *Polianthes tuberosa* var. "Simple" los métodos "Squash" y "SteamDrop" fueron más eficientes para la obtención de metafases con cromosomas totalmente dispersos comparados con las obtenidas por el método "Splash". Aun cuando se obtuvieron más metafases de buena calidad con "Squash", éstas presentaron restos de citoplasma, mientras que con "SteamDrop" se obtuvieron metafases libres de citoplasma.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento al Proyecto 190535 FOMIX Jalisco 2012, cuyo financiamiento hizo posible la realización de este Trabajo.

REFERENCIAS

[1] Solano, C. E. & Feria A.T.P. (2007), "Ecological niche modeling and geographic distribution of the genus *Polianthes* L. (Agavaceae) in Mexico: Using niche modeling to improve assessments of risk status", Biodiversity and Conservation, 16: 1885–1900.

[2] Behera, B. and Sen, S. (1999), "Chromosomal analysis and response to *in vitro* culture of different cultivars of *Polianthes tuberosa* L. (Agavaceae)", Nucleus, 42: 79-83.

[3] Jayasree, P. L., Srinivas, M. and Krishnan, R. (2001), "Cytological studies in tuberose varieties", Nucleus, 44: 196-201.

[4] Tapia-Pastrana, F. and Mercado-Ruaro, P. (2001), "A combination of the Squash and Splash techniques to obtain the karyotype and asses meiotic behavior of *Prosopis laevigata* L. (Fabaceae: Mimosidae)", Cytologia, 66: 11-17.

[5] Spurberck, J.L., Zinmeister, A.R., Meyer, K.J., Jalal, S.M. (1996), "Dynamics of chromosome spreading", American Journal of Medical Genetics, 61: 387-393.

[6] Hliscs, R., Mühlig, P., Claussen, U. (1997), "The spreading of metaphases is a slow process which leads to a stretching of chromosomes", Cytogenetics and Cell Genetics, 76: 167-171.

[7] Kirov, I., Divashuk, M., Van Laere, K., Soloviev, A., Khrustaleva, L. (2014), "An easy SteamDrop method for high quality plant chromosome preparation", Molecular Cytogenetics, 7: 21.

[8] Andres, R.J. and Kuraparthy, V. (2013), "Development of an improved method of mitotic metaphase chromosome preparation compatible for fluorescence in situ hybridization in cotton", The Journal of Cotton Science, 17: 149-156.

[9] Andras, S.C., Hartman, T.P.V., Marshall, J.A., Marchant, R., Power, J.B., Cocking, E.C. & Davey, M.R. (1999). "A drop-spreading technique to produce cytoplasm-free preparations from plants with small chromosomes", Chromosome Research, 7: 641-647.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND BIOCOMPOUNDS ON NON-VOLATILE FRACTION OF ESSENTIAL OILS FROM ORANGE AND LEMON

(Actividad antioxidante, antimicrobiana y biocompuestos en la fracción no volátil de aceites esenciales de naranja y limón)

Juana Suhey Ponce-Hernández[a+], Adriana Obregón-Cárdenas[a], Blanca Delia Muñoz-Gutiérrez[a], Juan José Ledezma[b], José Giovanni Aguirre Pérez[a*]

[a] Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C., Unidad Noreste.
[b] Frutech Corporation International.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: sponce@ciatej.mx

Área del Conocimiento: Agrobiotecnología.

ABSTRACT
Although Mexico ranks third in the major citrus production worldwide, its citrus agribusiness is one of the sectors with value-added deficit, as in the case of the essential oils, from which a non-volatile by-product with 15% yield is obtained. However, this fraction has hardly been studied at all. An important part of this fraction is made up of heterocyclic oxygen compounds (HOC) such as coumarins, psoralens and polymethoxylated flavones, which are known for their important pharmacological activities. For this reason, it is necessary to isolate HOCs that are important in the pharmaceutical industry and to determine the biological activity of the bioactive compounds obtained. Non-volatile fractions of essential oil of orange (NVN) and lemon (NVL) were subjected to extraction with different solvents. Four solvents including methanol and acetone with ratio 1:10 were selected. The extracted fractions with these solvents were analyzed by liquid chromatography coupled with mass spectrometry with single quadrupole and time of flight (LC/Q-TOF). Subsequently, the antioxidant capacity was evaluated by 1,1-diphenyl picryl hidrazyl radical capture *in vitro* and the antimicrobial activity by the method of microdilution against *E. coli* ATCC 25922. DPPH values of NVN extracts were 61 to 85% and 6 to 41% for NVL extracts. NVL extracts showed antimicrobial activity against *E. coli* ATCC 25922 while NVN extracts showed no antimicrobial activity against this strain; however, in both NVN and NVL extracts some HOC with biological activity were found making them excellent candidates for use as feedstock for the manufacture of products for human health, or as additives in the food industry.

Keywords: non-volatile compounds, essential oils, citrus, antioxidant, antimicrobial activity.

Palabras claves: compuestos no volátiles, aceites esenciales, cítricos, capacidad antioxidante, actividad antimicrobiana.

INTRODUCCIÓN

México es uno de los países líderes en la producción de cítricos a nivel mundial [1]. Los aceites esenciales de cítricos son algunos de los productos que pueden obtenerse a partir de los residuos de cítricos. Los aceites cítricos constituyen el sector más grande de la producción mundial de aceites esenciales [2]. Estos aceites esenciales están compuestos por una fracción volátil y una fracción no volátil. Los residuos no volátiles de los aceites esenciales han sido poco caracterizados, esta fracción corresponde de 1 al 15% del aceite esencial, el cual se obtiene como un producto de desecho y pueden contener compuestos como hidrocarburos, esteroles, ácidos grasos, ceras, carotenoides, cumarinas, psoralenos y flavonas polimetoxiladas [3]. Estos compuestos heterocíclicos oxigenados (CHO) han sido objeto de investigaciones debido al amplio rango de actividades biológicas que presentan, y que pueden ser importantes para la industria farmacéutica. Se ha reportado que estos compuestos presentan actividad antiinflamatoria, anticancerígena, antiviral, antioxidante, antimicrobiana, antitrombogénica y antiaterogénica, entre otras [4].

Los CHO como las cumarinas y polimetoxiflavonas presentes en los residuos no volátiles de aceites esenciales de cítricos son difíciles de sintetizar químicamente. Estos compuestos tienen una alta demanda y muy poca disponibilidad en el mercado, por lo cual pueden ser comercializados a precios superiores en comparación con los aceites esenciales. Las polimetoxiflavonas se encuentran principalmente en los compuestos no volátiles de la naranja, mandarina y toronja. En la fracción no volátil del limón están presentes mayormente compuestos de la familia de cumarinas y psoraleno [5], de los cuales también se han reportado otras variedades de funcionalidad [6]. Debido al amplio espectro de las actividades biológicas de los componentes de los no volátiles de aceites esenciales de los cítricos, algunas empresas en el noreste de México están interesadas en el estudio de estos compuestos para su aprovechamiento.

En el presente trabajo se estudió la presencia de CHO en la fracción no volátil de aceites esenciales de naranja y limón, para ofrecer una alternativa para mejorar la gestión de los subproductos sólidos no volátiles durante la producción de aceites esenciales de cítricos, que son considerados como “desechos”. Además se realizaron estudios para determinar la funcionalidad de los compuestos obtenidos de los residuos no volátiles de aceites esenciales de naranja y limón. En base a esto, se puede deducir que las moléculas bioactivas presentes en la fracción no volátil de aceite esencial de naranja y limón, podrían ser utilizadas en diversos sectores comerciales como en la industria farmacéutica, cosmética, alimentaria y en la industria química en general.

METODOLOGÍA

Los compuestos no volátiles de aceite esencial de naranja (NVN) y aceite esencial de limón (NVL) fueron proporcionados por la empresa Frutech International Corporation de México, ubicada en la carretera Monterrey-Reynosa Km. 12.5, Guadalupe, Nuevo León.

Extracción con solventes

Los residuos NVN y NVL fueron sometidas al proceso de extracción según la metodología descrita por Akbarian [7]. Se utilizaron diferentes solventes para observar la solubilidad de las muestras (19 mezclas para cada muestra). Se seleccionaron cuatro solventes en orden de polaridad descendiente (metanol,

acetona, éter de petróleo y hexano). El volumen final de los extractos fue concentrado con nitrógeno. Las fracciones insolubles fueron lavadas y secadas.

Caracterización cromatográfica

Los extractos de las fracciones de NVN y NVL extraídos con acetona y metanol fueron analizados por cromatografía de líquidos de alta resolución con tiempo de vuelo y detector de espectroscopia de masas (HPLC-QTOF), acoplada a electrospray con temperatura de vaporización de 550°C. Se empleó una columna cromatográfica C18. Como fase móvil se utilizó Metanol/Agua (+1% acido fórmico).

Actividad antioxidante

La actividad antioxidante se realizó mediante ensayos *in vitro* de captura del radical libre 2,2'-difenil-1-picril hidrazilo (DPPH). Las muestras con DPPH se leyeron en un espectrofotómetro a $D.O._{500\ nm}$ a los 15, 30 y 60 minutos. Se realizó una curva de calibración con Trolox. La capacidad para atrapar al catión DPPH se expresó como capacidad antioxidante en equivalentes de Trolox a los 30 min.

Actividad antimicrobiana

Para evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos y las fracciones insolubles de los residuos NVN y NVL, se empleó el método de microdilución en placa, para calcular las concentraciones mínimas inhibitorias de los extractos frente a *E. coli* ATCC 25922. Se realizó una incubación a 37°C por 24 horas.

RESULTADOS

Extracción con solventes

Se observó un mejor rendimiento de los compuestos NVN y NVL con los solventes acetona, metanol, hexano y éter de petróleo. En la Figura 1 se muestra la extracción sólido-líquido de los residuos NVN con acetona (NA), metanol (NM), hexano (NH) y éter de petróleo (NE). La mezcla de los NVN muestra una menor cantidad de fracción insoluble con los solventes hexano y éter de petróleo. Además se observa una coloración diferente en las extracciones con hexano (NH), probablemente por los compuestos extraídos de los residuos NVN (naranja).



Figura 1. Solubilidad de los residuos NVN con acetona (NA), metanol (NM), hexano (NH) y éter de petróleo (NE).

Figura 2. Solubilidad de los residuos NVL con acetona (LA), metanol (LM), hexano (LH) y éter de petróleo (LE).

En la Figura 2, se observan los extractos de las fracciones NVL con los mismos solventes respectivamente, y se observa una mejor solubilidad con acetona. Las fracciones insolubles de las extracciones de los NVL se observan en menor proporción que las fracciones insolubles de los NVN.

Caracterización cromatográfica

Los extractos de los residuos NVN con acetona y metanol, fueron analizados por cromatografía de líquidos acoplado a espectro de masas con tiempo de vuelo (LQTOF). En la Tablas II se muestran los compuestos encontrados en las extracciones con acetona de las fracciones NVN (naranja). En la Tablas III se muestran los compuestos encontrados en las extracciones con metanol de las fracciones NVL (limón).

TABLA II

Caracterización cromatográfica de los extractos de los compuestos **NVN** obtenidos de la extracción con **Acetona**.

	Compuesto	Masa molar	Abundancia	Área
1	Nobiletin	402.12	79.4	87050989
2	Citropten	206.05	89.12	81909017
3	Bergapten	216.04	87.99	41653381
4	Heptamethoxyflavone	432.13	80.32	12972616
5	Sinensetin	372.12	68.9	11450967
6	Tangeretin	372.12	68.9	11450967
7	Methylpentadecanoate	256.24	93.91	5044466
8	Bergamottin	338.15	71.35	1194185
9	Methylhexadecanoate	270.25	74.07	133852

TABLA III

Caracterización cromatográfica de los extractos de los compuestos **NVL** obtenidos de la extracción con **Metanol**.

	Compuesto	Masa molar	Abundancia	Área
1	Bergapten	216.04	81.96	112199465
2	Citropten	206.05	84.74	35957021
3	Sinensetin	372.11	72.45	7087971
4	Tangeretin	372.11	72.45	7087971
5	Nobiletin	402.12	80.29	2794705
6	Heptamethoxyflavone	432.14	81.02	1099890
7	Methylpentadecanoate	256.24	90.77	170967
8	Methylhexadecanoate	270.26	81.81	63878

La caracterización cromatográfica de las extracciones de los residuos de los compuestos NVN y NVL con acetona y metanol, fueron analizadas para la detección de los compuestos observados en las Tablas II y III, sin embargo, los cromatogramas muestran otros compuestos que no fueron analizados, es por esta razón que no se determinó el porcentaje de los compuestos encontrados en las extracciones de las ceras. Los extractos con metanol de los NVN y los extractos con acetona de los compuestos NVL,

muestran los algunos de los mismos componentes, pero en menor proporción. Se utilizó el mismo método para la caracterización cromatográfica de las fracciones insolubles de las extracciones de los residuos NVN y NVL, donde se encontraron los mismos componentes buscados en los extractos.

Actividad antioxidante

La capacidad para atrapar al catión DPPH de los extractos de los NVN y NVL se muestra en la Tabla IV.

TABLA IV

Comparación de la actividad antioxidante de los extractos de los compuestos NVN y NVL extraídos con acetona (A), metanol (M), hexano (H) y éter de petróleo (E).

COMPUESTOS NVN			COMPUESTOS NVL		
MUESTRAS	% INHIBICIÓN	mM Trolox	MUESTRAS	% INHIBICIÓN	mM Trolox
1-NS-A	84 ± 0.006	0.92	5-NS-A	36 ± 0.004	0.40
2-NS-M	85 ± 0.016	0.93	6-NS-M	41 ± 0.045	0.47
3-NS-H	61 ± 0.001	0.68	7-NS-H	6 ± 0.002	0.08
4-NS-E	74 ± 0.002	0.82	8-NS-E	6 ± 0.011	0.09

Actividad antimicrobiana

La concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos de los NVL con metanol poseen se observa en la Tabla V, frente a *E. coli* ATCC 25922. Mientras que no se logró observar una actividad antimicrobiana frente a esta cepa, de los compuestos NVL.

TABLA V

Concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos de las fracciones NVN y NVL extraídos con acetona (A), metanol (M), hexano (H) y éter de petróleo (E).

Extracto	CMI
LSA	5 mg/mL
LSM	2.5 mg/mL
LSH	10 mg/mL
LSE	10 mg/mL

DISCUSIONES

Los compuestos encontrados en las fracciones NVN y NVL, son los metabolitos reportados en la literatura con mayor proporción en los compuestos no volátiles de aceites esenciales de cítricos, sin embargo los cromatogramas muestras otros picos, correspondientes a otros compuestos aún no identificados. Por lo que se requiere realizar una identificación más completa de los compuestos

encontrados, además de realizar extracciones consecutivas con diferentes solvente, para separar los compuestos. Además estos resultados nos dan una idea de los compuestos presentes en las matrices de estudio, para estandarizar un protocolo de extracción optimizado, y para identificar bibliográficamente las posibles funcionalidades de cada compuesto. Por esta razón que se utilizaron cuatro solventes, debido a que no se conocía el perfil real de biocompuestos.

Por otra parte, también nos percatamos de que es necesario hacer un mejor lavado de las fracciones insolubles, para detectar una evaluación real de las actividades antimicrobianas y antioxidantes de los compuestos presentes en esas fracciones.

En cuanto a la funcionalidad de los extractos, se observó que los extractos de los residuos NVN mostraron una buena capacidad antioxidante, pero no demostraron actividad antimicrobiana frente a *E. coli* ATCC 25922. Sin embargo, sucedió lo contrario con los extractos residuos NVL, que poseen actividad antimicrobiana frente a esta cepa, pero no se observó capacidad antioxidante. Estos resultados coinciden con algunos reportados en la literatura.

CONCLUSIONES

La creciente demanda de compuestos biactivos de origen natural para varios sectores industriales desde el alimenticio hasta el farmacéutico está llevando a las investigaciones a la búsqueda de métodos de extracción eficientes y amigables para el medio ambiente. Los resultados de este trabajo etiquetan a los no volátiles de aceites esenciales como excelentes candidatos para extraer compuestos biactivos. Lo anterior se corroboro en la caracterización cromatográfica de los NVN y NVL, en donde se identificaron moléculas como Nobiletin de gran importancia comercial. Por otra parte, se observó la capacidad antioxidante de los compuestos NVN y la actividad antimicrobiana de los compuestos NVL frente a *E. coli* ATCC 25922. Aún faltan muchos estudios para realizar, sin embargo, estos resultados dan la pauta para más investigaciones de estos compuestos.

AGRADECIMIENTOS

A la empresa Frutech International Corporation de México.

REFERENCIAS

[1] SAGARPA (2015) [En línea] http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/sanluispotosi/boletines/Paginas/BOL1301112.aspx (01 de Agosto de 2015).

[2] Blanco, C., Grane, N., Nieto, M. (1995), "Comparative study of Colombian citrus oils by high-resolution gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry", Journal of Chromatography, 697: 501-513.

[3] Tranchida, P.Q., Bonaccorsi, I., Dugo, P., Mondelloa, L., Dugo, G. (2012), "Analysis of Citrus essential oils: state of the art and future perspectives. A review", Flavour Fragrance Journal, 27: 98-123.

[4] Viera, J., Vignale, B., Dellacassa, E., Pistón, M. (2014), "Antioxidantes como vía de una dieta saludable: evaluación en entrecruzamientos de mandarinas", Revista de ADEQ, 2: 50-56.

[5] Marti, G., Boccard, J., Mehl, F., Debrus, B., Marcourt, L., Merle, P., Delortb, E., Barouxb, L., Sommerb, Rudaza, S., Wolfender. (2014), "Comprehensive profiling and marker identification in non-volatile

citrus oil residues by mass spectrometry and nuclear magnetic resonance", Food Chemistry, 150, 235-245.

[6] Chouchi, D., Barth, D. (1994), "Rapid identification of some coumarin derivatives in deterpenated citrus peel oil by gas chromatography", Journal of Chromatography A, 672 (1): 177-183.

[7] Akbarian, A., Golian, Giliani, Kermanshahi, H., Zhaleh, S., Akhavan, A., DeSmet, S., Michiels. (2013), "Effect of feeding citrus peel extracts on growth performance, serum components, and intestinal morphology of broilers exposed to high ambient temperature during the finisher phase", Livst Sci 157 (2-3): 490-497.

DEVELOPMENT OF A MICROENCAPSULATED BIOFERTILIZER BASED ON AN ENDOPHYTIC BACTERIA CONSORTIUM OF AGAVE (*Agave tequilana* WEBER VAR. AZUL)

(Desarrollo de un biofertilizante microencapsulado a base de un consorcio bacteriano endofítico de Agave)

Lourdes Bautista Aguilar[a]*, Andrea García Quezada[a]*, Marcela De la Mora Amutio[a], Tetsuya Ogura[a], Julia del Carmen Martínez Rodríguez[a+]

[a]Lab 311, Investigación y Desarrollo, Depto de Química, DDC y T, Universidad Autónoma de Guadalajara. Av. Patria 1201, Col. Lomas del Valle, CP. 45129, Zapopan, Jalisco, México. Tel. (52+) 01 33 36488824 Ext. 32433.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: juliam@edu.uag.mx

Área del Conocimiento: Agrobiotecnología.

ABSTRACT
Agave azul (*Agave tequilana* Weber var. Azul) is considered one of the most important crops in Jalisco, Mexico; due to increasing demand for tequila and its derivatives .Currently the usage of chemical fertilizers on agave crops has increased with the final purpose of crop yield increase. In Mexico, Agave plantations occupy the 20th place in chemical fertilizers applications with 116,300 ha treated, causing environment pollution and soil depletion. Endophytes are beneficial microorganisms that live inside plant tissues and shown to be a promising alternative to natural fertilization. In our working group we have isolated endophytic bacteria from Agave azul plants with in vitro growth promoting activity, they have also shown an antagonistic effect against the fungus *Fusariumoxysporum* known as the causal agent of agave wilt .The objective of this study is to formulate a microencapsulated with these endophytic bacteria as a biofertilizer alternative for this important crop and also functioning as a shield against pathogens. Different formulations will be tested in a greenhouse assay with agave crops.

Keywords: *Agave tequilana*; biofertilizers; microencapsulated; bacterial endophytes.

DIAGNOSTIC STUDY OF PRODUCTION UNITS UNDER GREENHOUSE CONDITIONS, AT SALVATIERRA MUNICIPALITY, GUANAJUATO, MÉXICO

(Estudio de diagnóstico de las unidades de producción en condiciones de invernadero, en el Municipio de Salvatierra, Guanajuato. México)

María Isabel Cardoso Abonce [a], Pedro Eduardo Moreno-Zacarías [b*+].

[a] Egresada de la carrera de Ing. En Innovación Agrícola Sustentable. Instituto Tecnológico Superior de Salvatierra. Guanajuato, México.
[b] Coordinador de la carrera de Ing. En Innovación Agrícola Sustentable. Instituto Tecnológico Superior de Salvatierra. Guanajuato, México.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: pemz.oficial.itess@gmail.com

Área del Conocimiento: Agrobiotecnología.

ABSTRACT
The municipality of Salvatierra has approximately around a dozen functioning greenhouses; however, there is no current picture of the growers in the area. The study aims to recognize the framework under which agricultural, commercial, financial and planning practices. We identified eight active production units, has been visited and data was obtained via a closed survey. The use of medium technology is emphasizes, where 44% have an infrastructure supported by acceptable water management, agro-chemicals and temperature control. Regarding crop management, less than a half (44%) has have good agricultural practices. In behalf of management, 75% do not has have a strategic plan and (63%) are indebted to aid in production costs. Growers, has not associate in order to sell their products by which they resolve to their own means (100%). Nevertheless, the eight production units employ 108 people. They recognize that must overcome these obstacles even though 50% have growth expectations, and they recognize that they must train or hire staff to support them, as they consider that 88% of workers do not meet task expectations. The results showed us that Salvatierra´s growers must to modify their working scheme in order to generate greater competitiveness, by which the Instituto Tecnológico Superior de Salvatierra, has an area of opportunity.

Key words: Salvatierra, greenhouse, diagnosis

RESUMEN
El municipio de Salvatierra tiene aproximadamente una docena de invernaderos en funcionamiento, sin embargo, no existe una fotografía actual de los productores de la zona. El estudio tiene el objetivo de reconocer el marco bajo el cual realizan sus prácticas agrícolas, comerciales, financieras y de planeación. Se identificaron ocho unidades de producción activas, visitándoles directamente, obteniendo los datos a través de una encuesta cerrada. Destaca el uso de una mediana tecnología, en donde el 44% tiene una infraestructura soportada por un aceptable manejo de agua, agroquímicos y control de temperatura. En función del manejo del cultivo, menos de la mitad (44%) realiza prácticas agrícolas adecuadas. En el campo administrativo, el 75% no tiene una planeación estratégica así como un endeudamiento (63%)

para soportar los costos de producción. Los productores no se asocian para vender sus productos por lo que recurren a sus propios medios (100%). Aun así, las 8 unidades de producción dan trabajo a 108 personas. Reconocen que deben superarse, ya que el 50% tiene expectativas de crecimiento, y reconocen que deben preparar o contratar personal que los apoye en éste, ya que consideran que el 88% de sus trabajadores no cumplen las expectativas para sus tareas. Estos resultados abren la puerta para que los productores modifiquen su forma para generar una mayor competitividad. Aquí es donde el Instituto Tecnológico Superior de Salvatierra, tiene un área de oportunidad.

Palabras Clave: Salvatierra, Invernaderos, diagnóstico

INTRODUCCIÓN

El municipio de Salvatierra tiene aproximadamente una docena de invernaderos en funcionamiento, ys se pretende obtener la mayor información posible con el fin de detectar la problemática que afecta su desarrollo y prosperidad, con el fin de elevar su nivel de calidad y competitividad, ya que la agricultura protegida al igual que la agricultura a cielo abierto es una de las actividades de mayor potencioal y las tareas las pueden realizar tanto el género masculino como el femenino [1].

El estudio tiene el objetivo de generar un estudio de diagnóstico de las capacidades de producción, administración y manejo de las unidades de producción bajo condiciones de invernadero.

El diagnóstico fue desarrollado en el Municipio de Salvatierra Guanajuato, y la cabecera municipal, está situada en los 100° 53´ 46´´ longitud oeste del meridiano de Greenwich y a los 20° 12´ 56´´ latitud norte, su altura sobre el nivel del mar es de 1,749 metros.(Figura 1). El clima es templado y húmedo durante todo el año. La temperatura máxima es de 33.4 °C y la media anual es de 18.1 °C; la mínima de 2 °C. La precipitación pluvial es de 730 milímetros anuales. De las tierras aptas para la agricultura son 34,880 hectáreas, equivalentes al 56 % de su extensión, de las cuales 15,257 son de riego. En cuanto a la tenencia de la tierra, 29,629 es ejidal y 21,141 está bajo el régimen de pequeña propiedad [2]. Otro factor que demanda de invernaderos más tecnificados es el hortícola [3].

El desarrollo acelerado de estas nuevas tecnologías en la agricultura mexicana se debe entre otros factores a que el país tiene condiciones estratégicas que no tienen otras regiones, así como búsqueda de alternativas de inversión en el sector agrícola, ya sea para aumentar la productividad de una empresa establecida o cuando se piensa iniciar una nueva [4].

METODOLOGÍA

Por medio de la Dirección de Desarrollo Rural, del Municipio de Salvatierra, Gto., se elaboró un listado de cada una de las unidades de producción agrícola en condiciones de invernadero que se localizan dentro de los límites municipales. El criterio de selección para el diagnóstico fue que se encontrara en funcionamiento. La aplicación de la encuesta está dirigida hacia el dueño o encargado de la empresa, el tipo de preguntas que se utilizaron fueron, en función de la información que nos interesa compilar [5]. La encuesta se divide en los siguientes criterios: uso de la propiedad, estado actual de la instalación, tipo de estructura y diseño interior, producción, manejo, comercialización, apoyos y financiamiento, mano de obra y documentación oficial y planeación.



Fuente: Enciclopedia de los Municipios y Delegaciones de México.
Figura 1.- Mapa del municipio de Salvatierra, Gto.

RESULTADOS

Cabe resaltar, que a pesar de tener 29 comunidades en donde se tienen registradas en la Dirección de Desarrollo Rural, solamente ocho fueron identificados como invernaderos en funcionamiento y producción activa. El cultivo predominante es el Pimiento (seis productores), le siguen Jitomate y Pepino, con un productor respectivamente. Destaca el uso de una mediana tecnología, en donde el 44% tiene una infraestructura soportada por un aceptable manejo de agua, agroquímicos y control de temperatura. Lo cual se describe en los siguientes párrafos

De lo anterior cabe resaltar que el 75% de los productores, posee instalaciones de tecnología nacional, de las cuales el 100% tiene reservada un área para los sistemas de riego, el 75% tiene un área de atención, el 63% cuenta con un sitio para almacenamiento de agroquímicos y este mismo porcentaje presenta un sitio para resguardar herramienta. En contraste, se observó el poco cuidado que tienen para su aseo y alimentación, ya que sólo el 25% tiene un área para regaderas y el 13% un lugar habilitado como comedor. Es de llamar la atención que ninguno de los entrevistados hizo referencia hacia realizar análisis físico-químicos del agua y suelos del área de cultivo, Figura (2). Por lo que respecta al manejo de los cultivos, la mayoría de los productores (84%) emplean las prácticas culturales habituales para el cultivo en curso y aplican algún tipo de tecnología. Entre éstas se destacan: 88% usa fertilización química, 75% controla plagas y enfermedades con agroquímicos, la mayor parte – 88%- controla malezas de forma manual y el 88% solicita apoyo de un técnico. Figura (3).
En cuanto a la comercialización de sus productos cabe destacar que tres de los ocho productores exportan su producción y el resto lo distribuye en los mercados nacional, estatal y local. De manera común, estos productos son distribuidos a través de un intermediario (88%) y solo uno trabaja bajo agricultura por contrato (12%), resalta que los productores no se asocian para vender sus productos por lo que recurren a sus propios medios (100%). La mayor parte cuenta con créditos para el soporte de su producción (63%) y el resto, (38%) trabaja con el producto de sus ventas. Es importante hacer notar que los ocho productores entrevistados no tienen ningún tipo de certificado, y siete, se encuentran en proceso de certificarse, en cuatro diferentes áreas.

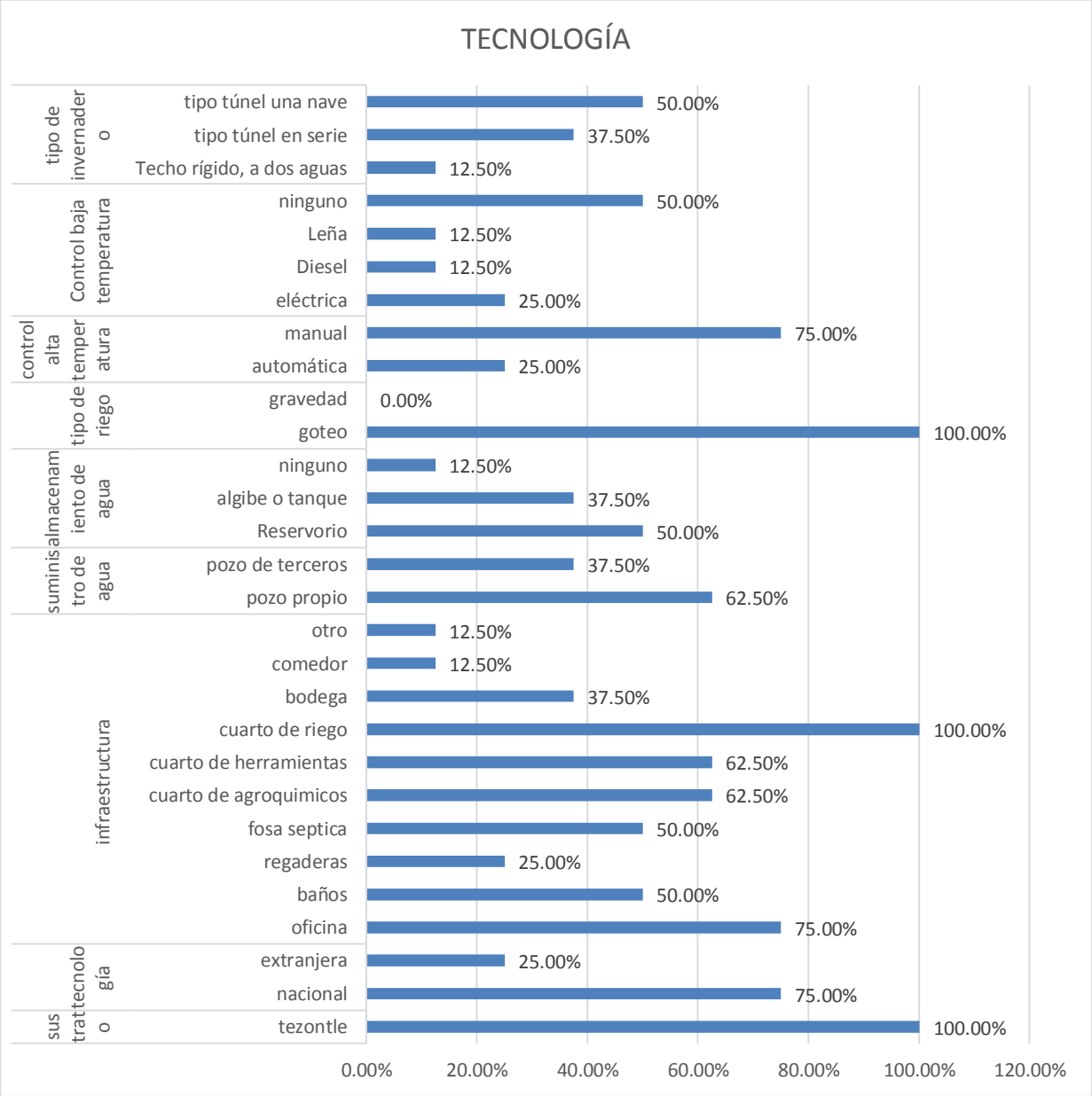


Figura 2. Aspectos de manejo tecnológico en los Invernaderos situados en el Municipio de Salvatierra Gto.

Las ocho unidades de producción dan empleo fijo a 44 personas y eventual a otras 64 más, por lo que en promedio, se emplean a 13 personas. La mayoría de éstos trabajadores (50%), se emplean en la producción y el resto en áreas administrativas de las mismas unidades, y que deben preparar o contratar personal que los apoye en éste, ya que consideran que el 88% de sus trabajadores no cumplen las expectativas para sus tareas. Llama la atención que se tienen tres áreas sin atención alguna (Tabla. 1).

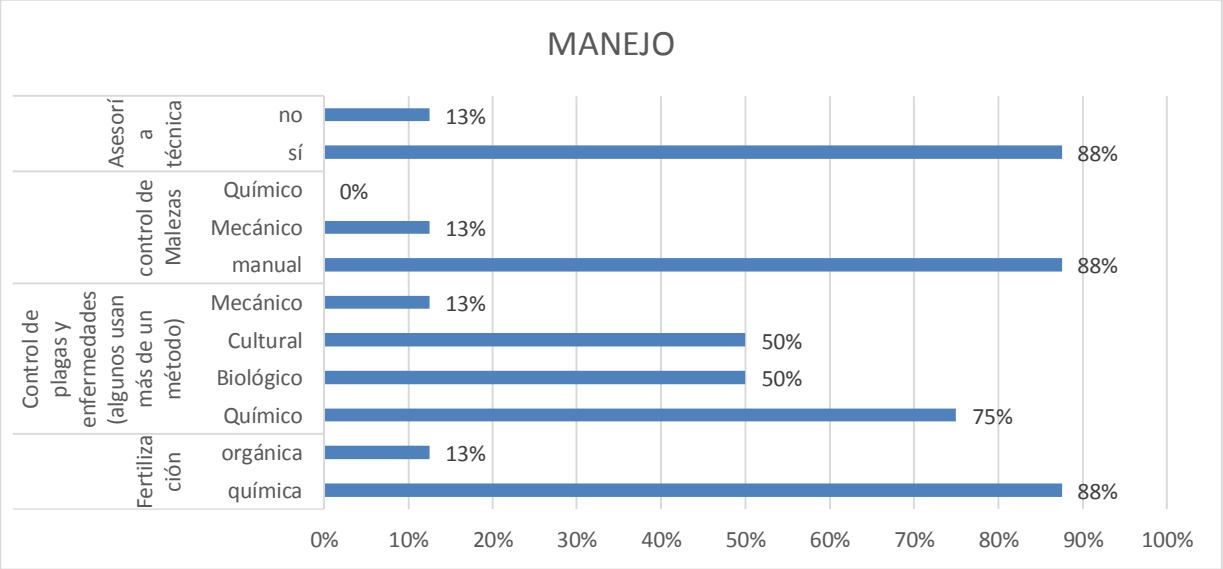


Figura 3. Aspectos de manejo empleados en los Invernaderos situados en el Municipio de Salvatierra Gto

Tabla 1. Estado de la empleabilidad en los Invernaderos situados en el Municipio de Salvatierra Gto.

EMPLEABILIDAD	VARIABLE	NÚMERO	PORCENTAJE
Empleabilidad, número de trabajadores por régimen	eventual	64	59%
	fijo	44	41%
Competencia laboral del área de producción	óptimo	5	63%
	debajo de lo deseado	3	38%
Administración	Área administrativa	1	13%
	Área contable	2	25%
	Departamento de RRHH	1	13%
	Área de comercialización	0	0%
	Área de compras	0	0%
	Área de mercadotecnia	0	0%
	Área de producción	4	50%
Competencia laboral del área administrativa	sí	1	13%
	no	7	88%

En el campo administrativo, el 75% no tiene una planeación estratégica así como un endeudamiento (63%) para soportar los costos de producción. En lo general, reconocen que deben superarse, ya que el 50% tiene expectativas de crecimiento, lo cual contrasta con el 50% de los productores que considera que se encuentran bien “con lo que tienen”. (Tabla 2)

Tabla 2. Estado de las estrategias administrativas en los Invernaderos situados en el Municipio de Salvatierra Gto

PLANEACION	VARIABLE	NÚMERO	PORCENTAJE
Plan estratégico	Misión, Visión, Valores, Objetivos, Estrategias	2	25%
	No tiene	6	75%
Desempeño de acuerdo a sus planes en 2012	sí	6	75%
	no	2	25%
Tiene expectativas de crecimiento	sí	4	50%
	no	4	50%
Áreas de oportunidad	Incrementar superficie	1	13%
	Mejorar tecnología	1	13%
	Eficiencia en el empacado	2	25%
	ninguno	4	50%

DISCUSIÓN.

En función de las unidades productivas que funcionan, en lo general la mayoría cubren sus necesidades básicas tal como lo describe Nelson (2011) [6], en donde que sugiere para el acondicionamiento del invernadero, las unidades de producción cuenten con: a) áreas de servicio, lo cual se cumple en la mayoría de los sitos encuestados, b) vías de acceso, tal variable no se muestra en la encuesta, sin embargo, los productores no tienen problema, ya que cuentan con vías de comunicación accesibles. C) Adecuado abastecimiento y almacenamiento de agua, lo cual se observa en todas las unidades

En cuanto al uso de técnicas de análisis para su agua de riego, sustrato, y la formulación de fertilizantes [7], de acuerdo a nuestros resultados, esto no parece tener un significado en el manejo de los cultivos, ya que los entrevistados, no hicieron mención sobre la relevancia de estos parámetros

Es común observar que la mayoría de los productores tienen como un evento significativo, el control químico de plagas y enfermedades, lo cual, puede suportar rendimientos que promuevan la sustentabilidad de la unidad de producción y por ende, de los productores [6, 8]. Dentro del análisis económico, parámetros como análisis de costos, diagramas de flujo, comparación del costo del invernadero y su prorrateo con respecto a su operación, la valoración de los costos a tiempo presente, o con respecto a una anualidad, o relacionado con la recapitalización de la inversión, así como el análisis de costo beneficio [7] son métodos no conocidos por los entrevistados.

Asimismo, es parte de la sensibilidad de los técnicos, el poder convencer a los productores a seguir acciones concretas para el desarrollo de oportunidad de negocio, tal como lo recomienda el FIRA (2015) [9], para el desarrollo de una Red de Valor en la Agricultura protegida en Guanajuato.

Lo anterior, abre una oportunidad de trabajo para los egresados de la carrera de Ing. En Innovación Agrícola Sustentable del ITESS, ya que la mayoría de los estudiantes, provienen de comunidades, en donde las prácticas agrícolas vienen sustentadas por varias generaciones atrás, en donde, la transición de cultivares a cielo abierto a agricultura protegida, ha sido difícil, dado que en muchas ocasiones, solo reciben la asistencia técnica cuando están siendo atendidos por el técnico, y el cual, por lograr sus metas de venta, busca mayor mercado.

En relación a la empleabilidad, es claro la intervención femenina en el campo, ya estudios de (Rosas y vergas, 2012) revelan que los nuevos fenómenos sociales que no existían de forma tan aguda como hoy día, tal como la migración campesina ha mostrado una tendencia mayor hacia la feminización del campo, donde son las esposas y las hijas son las que se hacen cargo de la parcela; y en el caso de la incursión de las mujeres en la agricultura protegida, ha aumentado, aunque para lo cual, habrá que hacer más, ya que con base en los resultados del Programa de impulso a la mujer en la economía rural para el ejercicio de 2015 en el estado de Guanajuato, solamente una mujer del Municipio de Salvatierra de 80 totales, fue favorecida [10]

CONCLUSIONES

En función de los resultados, es necesario apoyar a los productores del Municipio de Salvatierra, dadas las áreas de oportunidad en asistencia técnica y planeación estratégica. Aquí es donde el ITESS tiene un área de oportunidad.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Dirección de Desarrollo Rural del Municipio de Salvatierra, por las facilidades otorgadas.

REFERENCIAS

[1] Rosas Vargas, Rocío, Zapata Martelo, Emma. Mujeres Y Tenencia De La Tierra En Salvatierra, Guanajuato. Ra Ximhai [en linea] 2012, 8 (Mayo-Agosto) : [Fecha de consulta: 11 de septiembre de 2015] Disponible en:<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=46123333020> ISSN 1665-0441

[2] Censo Agrícola, Ganadero y Forestal (2007). VIII Censo Agrícola, Ganadero y Forestal : síntesis metodológica / Instituto Nacional de Estadística y Geografía.-- México : INEGI, c2013

[3] Steta, M. 1999. Status of the greenhouse industry in México. Acta Hort. 481: 735-738

[4] Serrano Cermeño, Zoilo. 2005. Construcción de invernaderos. Ed. Mundiprensa. 3ª ed. Madrid. España. 603 pp.

[5] Hernández Sampieri, R., C. Fernández Collado, y P. Baptista Lucio. Metodología de la investigación. 3a. Mexico: McGraw-Hill, 2003

[6]. Nelson, Paul V. 2011. Greenhouse operatio and management. 7th Ed. Prenctice Hall. USA. 595pp.

[7) Tiwari, G. N. 2003. Greenhouse technology for controlled environment. Alpha Sciencie International Ltd. Pangabourne England. 539pp.

[8] Meneses, M. H, R. 2001. Contaminación de Suelos por el uso de plaguicidas. Tesis de Licenciatura. FES Cuautitlán, UNAM. México

[9] http://fira.gob.mx/OportunidadNeg/DetalleOportunida.jsp?Detalle=9

[10]http://sdayr.guanajuato.gob.mx/publicaciones/2015/lista_resultados_positivos_PIMUR_RefrendosActa01.pdf

ISOLATION OF PLANT GROWTH PROMOTING BACTERIA IMPORTANT IN FORESTRY

(Aislamiento de bacterias promotoras del crecimiento vegetal de importancia en el área forestal)

Nicasio D. Sánchez-Cruz[a*], Juan Carlos Meza Contreras[b], Eduardo Salcedo Pérez[b], Yolanda González García[b+]

[a] Universidad de Guadalajara, Departamento de Ingeniería Química (CUCEI)
[b] Universidad de Guadalajara, Departamento de Madera, Celulosa y Papel (CUCEI)

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: yolacea@yahoo.com

Área del Conocimiento: Agrobiotecnología.

ABSTRACT
Forests influence environmental processes and have an important role in biodiversity conservation, being of special interest for Mexico the genus *Pinus* since it counts with 50% of the existing *Pinus* species in the world. Regrettably this ecosystem is not properly protected and is threatened by fires and deforestation, and although plants production has increased to overcome these problems, a high percentage of plant mortality exists in field. One of the main limiting factors is the nutrients availability in the soil, mainly of phosphorus which is present in its insoluble form. To overcome this problem there has been proposed the use of biofertilizers which stimulate the resistance and development of seedlings, by solubilizing nutrients and producing phytohormones such as auxins. Therefore, the objective of this work was to isolate phosphate solubilizing bacteria (PSB) and indole acetic acid (IAA) producing bacteria from forest soil and pines roots obtained from the Primavera Forest; later a biofertilizer based in those strains will be formulated and evaluated in *Pinus sp*. 35 bacterial strains where isolated, and its phosphate solubilization (PS) and IAA production capacity was evaluated. For PS test NBRIP medium was used (insoluble tricalcium phosphate), first of all the PS strains were identified by the formation of solubilization halos, and then were selected by its phosphate solubilization index (PSI). For screening the IAA producer strains, nutrient broth with tryptophan was used, and the amount of IAA produced was quantified spectrophotometrically (Salkowski reagent). 16 % of the isolated strains were positive for PS; 41% produced IAA; and 14 % presented both activities, while the remaining 29% were negative to both tests. Regarding the PSI, the strains with higher activity were: C2 (2.86 $\pm$ 0.078), C28 (2.84 $\pm$0.096) and C29 (2.79 $\pm$0.030); while for the production of IAA the strains C2 (47.09 $\pm$ 1.14 ppm) and C11 (53.93 $\pm$ 2.73 ppm) presented higher values.

Keywords: Biofertilizer, Phosphorous solubilization, Indole acetic acid, *Pinus sp*

RESUMEN
Los bosques influyen en procesos ambientales y en la conservación de la biodiversidad, destacándose la especie *Pinus* sobre todo en México, que cuenta con el 50% de las especies existentes en el mundo. Lamentablemente es un ecosistema poco protegido, amenazado por incendios y deforestación, y aunque se ha incrementado la producción de plantas para superar esta problemática, existe un alto porcentaje de mortandad en campo. Una de las principales limitantes es la disponibilidad de nutrientes en el suelo, principalmente de fósforo que se encuentra en forma insoluble. Para resolver este

problema se ha propuesto el uso de biofertilizantes que además estimulen la resistencia y desarrollo de plántulas, por la generación además de fitohormonas, como las auxinas. Con este enfoque, el objetivo de este trabajo fue aislar bacterias solubilizadoras de fósforo (SF) y productoras de ácido indolacético (AIA) a partir de suelo forestal y raíces de pinos obtenidos del Bosque de la Primavera; para posteriormente formular y evaluar un biofertilizante en *Pinus sp.* Se aislaron 35 cepas bacterianas, a las cuales se les evaluó su capacidad de SF y de producir AIA. Para el primer caso se utilizó medio NBRIP (fosfato tricálcico insoluble), las SF fueron identificadas por la formación de halos de solubilización y seleccionadas por su índice de solubilización de fósforo (ISF). Para el cribado de productoras de AIA se utilizó caldo nutritivo con triptófano, y la cantidad de AIA producido fue cuantificada espectrofotométricamente (reactivo de Salkowski). El 16% de las cepas aisladas fueron positivas para SF; 41% produjeron AIA; y 14% presentaron ambas actividades, mientras que el 29% restante fueron negativas a ambas pruebas. En cuanto al ISF las cepas con mejor actividad fueron la C2 (2.86$\pm$ 0.078), C28 (2.84$\pm$0.096) y C29 (2.79+0.030), mientras que para la producción de AIA la C2 (47. 09 $\pm$ 1 ppm) y la C11 (53.93 $\pm$ 2.73 ppm) presentaron valores más altos.

Palabras clave: biofertilizante, solubilización de P, ácido indolacético, *Pinus sp*

INTRODUCCIÓN

Los bosques influyen en procesos ambientales de gran importancia en los sistemas naturales del planeta tales como ciclos hidrológicos, reducción de la erosión del suelo, y en la conservación de una enorme biodiversidad vegetal, animal y microbiana [1].

De manera particular, el bosque de pino es uno de los ecosistemas que presenta mayor diversidad de especies. Por su parte México posee una enorme biodiversidad vegetal en sus bosques ya que el 50% de las 110 especies de *Pinus* que se encuentra en todo el mundo habitan en la República Mexicana, lamentablemente es uno de los ecosistemas menos protegido y se encuentra amenazado por incendios forestales naturales y accidentales, así como la deforestación para aprovechamiento de madera comercial o de subsistencia [2].

En los últimos años se ha incrementado considerablemente la producción de planta forestal para diversos programas del gobierno federal y estatal, principalmente para actividades de reforestación. Sin embargo, los resultados de estos programas no son satisfactorios debido al alto porcentaje de mortandad registrado en campo [3].

Con el fin de encontrar una solución al problema mencionado anteriormente, varios investigadores han propuesto el uso de microorganismos promotores de crecimiento vegetal (MPCV) para producir plantas forestales más vigorosas, lo cual podría mejorar la supervivencia de estas plántulas cuando se plantan en el campo con fines de reforestación [4].

Según Pera & Parlade [5] el objetivo principal de la aplicación de MPCV en viveros forestales es la mejora de la calidad de la planta destinada a la repoblación forestal.

Con respecto a su modo de acción, los MPCV pueden solubilizar nutrientes presentes en el suelo por lo que las raíces los pueden absorber, esto acelera la descomposición de residuos orgánicos, y además también protegen las raíces agentes patógenos, así mismos producen fitohormonas del tipo auxinas,

como el ácido indol-acético (AIA) que induce la deformación y el aumento de los pelos radiculares logrando una mayor eficiencia en la captación de agua y nutrientes [6].

Vessey [7] comenta también que el modo de acción de los MPCV cuando se aplica a la semilla, superficie de las plantas o al suelo, implica que los microorganismos promotores colonicen la rizosfera o el interior de la planta y promuevan el crecimiento mediante el aumento de la disponibilidad de nutrientes primarios de la planta huésped.

En cuanto a la biodisponibilidad de nutrientes en el suelo, la del fósforo es limitada debido a que este se encuentra en la forma de fosfatos insolubles, por lo que la solubilización de estos compuestos es muy importante debido a que tiene un alto grado de interacción en el sistema suelo-planta-microorganismo., Por lo tanto los microorganismos solubilizadores además constituyen una importante reserva de P en el suelo a través de su biomasa, median varios procesos claves en el ciclo biogeoquímico de este elemento. La absorción microbiana del P y su subsecuente liberación y redistribución, afectan de manera significativa la disponibilidad del P para los ecosistemas naturales y manejados, especialmente cuando los últimos reciben enmiendas orgánicas [8].

Por su parte Banerjee *et al*., [9] señalan que algunos microorganismos solubilizadores de fósforo pueden mostrar otras actividades como: producción de AIA, ácido giberélico, citoquininas, etileno, ácido cianhídrico (HCN), fijación asimbiótica de nitrógeno y biocontrol a patógenos del suelo; y que estas características son de gran importancia y necesarias para que un microorganismo sea considerado de uso potencial y como un eficiente bioinsumo.

En este sentido el objetivo del presente trabajo fue aislar bacterias solubilizadoras de fósforo (SF) y productoras de ácido indo acético (AIA) a partir de suelo forestal y raíces de pinos obtenidos del Bosque de la Primavera; para posteriormente formular y evaluar un biofertilizante en *Pinus sp.*

METODOLOGÍA

Toma de muestra de suelos.

La colecta de suelo se llevó a cabo en el Área de Protección de Flora y Fauna Bosque La Primavera (APFFLP) que se ubica en la región central del estado de Jalisco, entre las coordenadas extremas 103°28' a 103°42' de longitud oeste, y 20°32' a 20°44' de latitud norte, en sitios donde está presente el bosque de pino.

Para cada sitio de muestreo se tomó una cantidad de suelo de los primeros 30 cm de la superficie de la rizósfera. Para posteriormente hacer una mezcla de todas las muestras tomadas y un cuarteo para obtener 1000 g de suelo representativo. Las muestras fueron constituidas por raíces y suelo adheridas a ellas, finalmente se almacenaron en bolsas de polietileno y se refrigeraron (5 °C) para su conservación y uso posterior.

Aislamiento, selección y propagación de microorganismos.

Una vez colectadas las muestras de acuerdo a Fernández., *et al* [10] se pesaron 10 g de suelo a los cuales se les agregaron 90 mL de solución de NaCl al 0.85 %, se agitó vigorosamente en un vórtex durante 1 minuto y posteriormente la mezcla se dejó en agitación durante 6 horas. Después de dejar en reposo para permitir la sedimentación de las partículas, se tomaron alícuotas del sobrenadante y se procedió al aislamiento de microorganismos mediante la técnica de diluciones decimales y siembra en caja de Petri tanto por vaciado como por extensión de superficie. Se utilizó agar nutritivo, y las placas se incubaron a 30°C durante 48 horas, al término de las cuales las colonias bacterianas fueron aisladas y resembradas en caldo nutritivo.

Ensayo de solubilización de fosfatos.

En tubos falcón de 50 mL se prepararon tres pre inóculos de 10 mL con medio SRS líquido (Sundara y Sinha, 1963) para después inocular en cajas Petri con medio NBRIP se llevó a cabo la prueba de solubilización de fosfato con fosfato tricálcico como fuente de Fosforo y rojo congo como indicador. Las cajas fueron inoculadas con 0.1 mL de la suspensión microbiana a una densidad óptica (DO) de 1 y se incubaron durante 48 horas a 30º C. Posteriormente se observó la presencia de halos de solubilización alrededor de las colonias, este halo se midió en cada colonia y se calculó su índice de solubilización (IS):

$$IS = \frac{\text{Diámetro de la colonia} + \text{Diámetro del halo}}{\text{Diámetro de la colonia}}$$

Ensayo de producción de ácido indol acético (IAA).

Las colonias bacterianas aisladas en caja Petri fueron inoculadas en tubos de vidrio con caldo nutritivo suplementado con triptófano (precursor de la formación de ácido indol-acético) e incubados a 30°C por 48 horas. Posteriormente se tomó 1 mL y se centrifugo a 10,000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante se traspasó a tubos de vidrio y se les añadió 2 gotas de ácido orto fosfórico concentrado y 2 ml de reactivo de Salkowski (50 ml, ácido sulfúrico al 35% y 1 ml de 0.5 M $FeCl_3$). Después, la mezcla se dejó reposar en oscuridad durante 30 minutos. El desarrollo de una coloración rosada indicó la producción de ácido indol-acético.

Para la determinación cuantitativa de IAA se tomaron lecturas de absorbancia a 535 nm usando un espectrofotómetro y esta fue relacionada con una curva de calibración con diferentes concentraciones de IAA estándar.

RESULTADOS

Aislamiento y selección de microorganismos con actividad promotora de crecimiento vegetal.

Se aislaron 35 cepas del suelo del bosque de la Primavera de las cuales el 16% presentaron actividad de solubilización de fósforo, el 41% solamente productoras de AIA, el 29% presentaron una doble actividad de solubilización y P y producción de AIA, mientras que el 29% restante de las cepas no presentaron ninguna de las dos actividades.

Solubilización de fosfatos.

Los resultados de la prueba de solubilización en medio sólido se presenta en la Tabla 1, donde se indican las 8 cepas que resultaron positivas, su correspondiente diámetro de la colonia, así como el correspondiente del halo de solubilización de fosfatos. En la Figura 1 se presenta el índice de solubilización para cada cepa, observando que todas presentaron un valor mayor a 2 mm, siendo 3 cepas con las que estadísticamente se obtuvo mayor actividad (IS, mm): cepas 2 (2.86 ±0.078), 28(2.84±0.096) y 29 (2.79±0.030).

Tabla 1. Cepas aisladas e identificadas con actividad solubilizadora de fósforo.

Cepa	Diámetro de la colonia (mm)	Diámetro del halo de solubilización (mm)
1	6.3	8.5
2	6.6	12.3
7	6.0	9.0
8	7.4	11.9
9	6.3	9.1
10	7.6	11.0
28	6.6	12.1
29	6.3	11.2

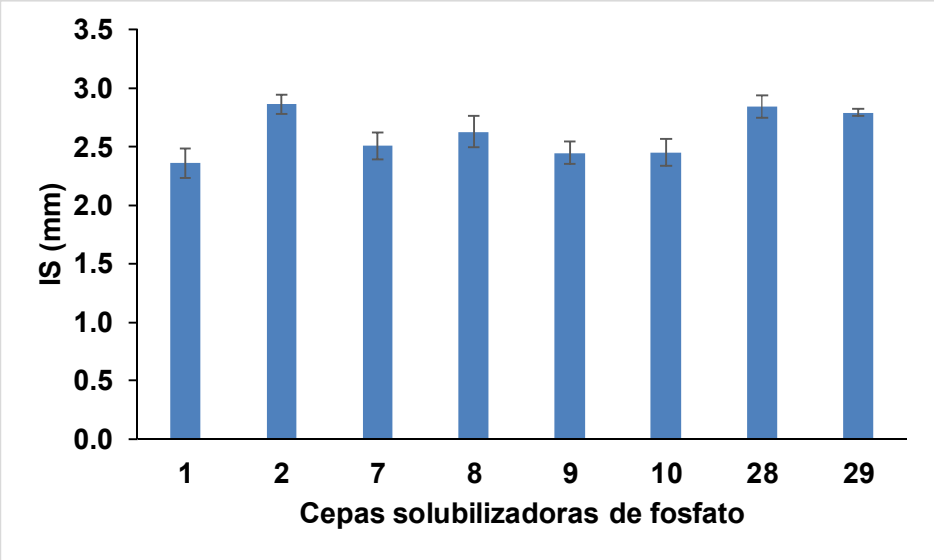


Figura 1. Índice de solubilización de fosfatos (IS) de las cepas aisladas.

Producción de ácido indol-acético (IAA).

Se encontraron 20 cepas positivas para la producción de AIA las cuales se presentan en la Figura 2 así como la cantidad de auxina producida en medio líquido. Este valor se comparó con el obtenido bajo las mismas condiciones con dos cepas utilizadas como testigo que previamente han sido reportadas como productoras de AIA: *Bacillus subtillis* (BS) que produjo 23.93 ppm y *Pseudomonas fluorensces* (PF) con 8.45 ppm de AIA. Se encontró que las tres mejores cepas respecto a la producción de AIA fueron: cepas 1 (45.22 ± 4.21 ppm), 2 (47.09 ± 1.14 ppm) y la 11 (53.93 ± 2.73 ppm) e incluso presentaron mayor producción que los controles.

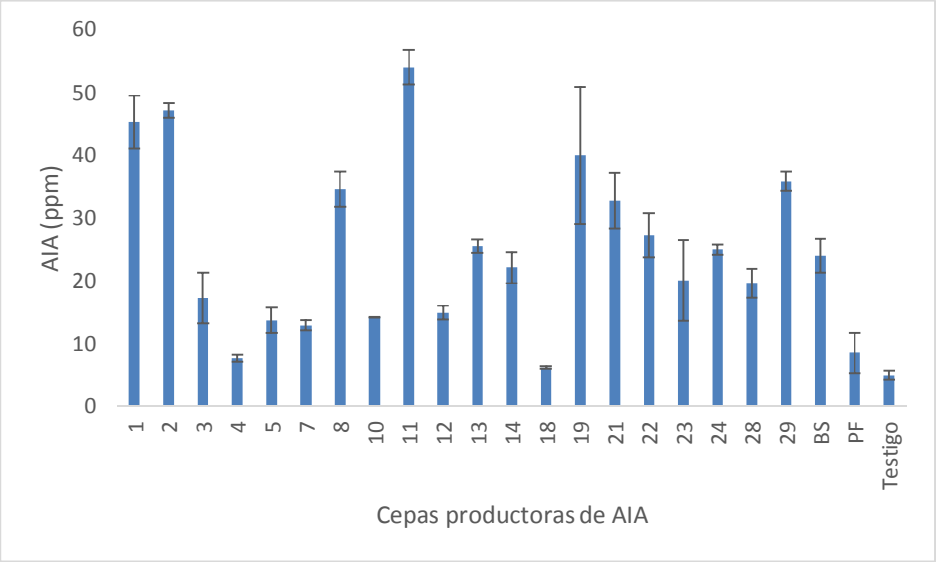


Figura 2. Producción de ácido indol-acético por las cepas aisladas.

DISCUSIONES

Solubilización de fosfatos.

La determinación de la capacidad de solubilización P y la selección de los microorganismos con esta actividad, se observó por la presencia de halos de solubilización, que se utilizaron para calcular el IS. En este sentido, de acuerdo a lo reportado por Nautiyal [11] la eficiencia solubilizadora de P de la bacterias se debe a la producción de ácidos orgánicos y su difusión alrededor de la colonia, y que la fuente de carbono juega un papel importante en este proceso. En el caso del medio utilizado NBRIP, se utiliza glucosa como fuente de carbono cuyo metabolismo es conocido que puede dar lugar a la producción de ácidos orgánicos. Respecto a los IS más altos, encontrados en las cepas 2, 28 y 29, estuvieron por arriba de 2 mm (tabla 3) lo cual está en un rango aceptable según lo reportado por Otalora *et al.*, en Becerra *et al.*, [12].

Así mismo Gupta *et al*., [13] encontraron valores de IS de 1.3 mm en cepas de *Bacillus*, mientras que Becerra et al., [12] reportaron cepas del género *Candida, Aeromonas y Rahnella* valores de IS de entre 1.6 a 3 mm. Por otro lado Alam *et al*., [14] reportan cepas aisladas de la rizosfera de maíz con un IS de 2.9 a 7 cm.

Producción de ácido indol-acético.

La producción de AIA por las cepas aisladas se presentó en valores que van desde 10 ppm hasta las 53 ppm. Estos valores se encuentran dentro del rango de los reportados en otras investigaciones, como la realizada por Tarun & Nishant [15] quienes alcanzan producciones de 15.25 a 50.25 ppm, mientras que Lara *et al*., [16] indican que cepas de *Azotobacter sp* generan 44.26 ppm y *Azospirillum sp* de 3.65 a 27.12 ppm. Por otro lado Dastager *et al*., [17] aislaron cepas provenientes del Bosque Ghat en India y encontraron producciones altas de AIA de hasta 109 ppm en contraste a lo reportado por Velusamy *et al.,* [18] donde las cepas que aislaron solo lograron 5.83 ppm. La producción de esta hormona entonces, depende de la cepa en cuestión así como de las condiciones de cultivo.

La importancia del AIA para las plantas es alta ya que genera muchos beneficios al crecimiento celular y esto se ve reflejado en una mayor desarrollo, generación de biomasa y una disminución de tiempo para la formación de flor y fruto; Mantilla en Escobar *et al.,* [19] señalan que los efectos de las auxinas (AIA) son dependientes de su concentración y que esta debe ser mínima para estimular el crecimiento y que altas concentraciones los efectos pueden ser inhibitorios.

Por otro lado Sharma [20] menciona que algunas cepas que secretan metabolitos como auxinas, gibelinas, y citoquininas además de estimular la toma de nutrientes a la planta también pueden funcionar como antibióticos, para el bio control de patógenos en plantas.

Además, Shankar [21] señala que el uso de MPCV tiene una gran importancia en la agricultura y en producción en viveros debido a que el uso de reguladores de crecimiento vegetal sintéticos como el ácido indol-3-butírico es prohibido para su uso en la producción orgánica en el mundo.

CONCLUSIONES

En el suelo del Bosque La Primera, se encuentran bacterias solubilizadoras de fósforo y productoras de AIA cuyas actividades son comparables con las reportadas para otras cepas de diferente origen utilizadas como biofertilizantes agrícolas. Las encontradas en este trabajo tienen potencial para dicho propósito pero en el área forestal. Aún es necesario seguir estudiando estas cepas respecto su capacidad de solubilización de fosfato no solo de calcio sino de hierro y aluminio, tanto en medio sólido como líquido para tener información más precisa respecto a su eficiencia. Así mismo será importante establecer estrategias de cultivo para obtener biomasa viable de estos organismos utilizando medios de cultivo económicos. De las cepas reportadas en este trabajo la cepa 2 es atractiva ya que presenta ambas actividades promotoras del crecimiento vegetal.

AGRADECIMIENTO

Extiendo mi agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca que se está recibiendo para continuar con esta investigación.

Bibliografía.

[1] C. Arteaga Leon. (2014) "Ectomicorrizacion con hongos de la sierra nevada en el crecimiento y movilizacion nutrimental de pinus ayacahuite," (Tesis Doctoral, Colegio de Postgraduados)

[2] CONABIO. (1998) *La diversidad biológica de México : Estudio de País*.

[3] CONAFOR. (2012) "Evaluación Complementaria del PROCOREF, ejercicio fiscal 2011.," p. 325.

[4] A. Probanza, J. A. Lucas García, M. Ruiz Palomino, B. Ramos, and F. J. Gutiérrez Mañero. (2002) "Pinus pinea L. seedling growth and bacterial rhizosphere structure after inoculation with PGPR Bacillus (B. licheniformis CECT 5106 and B. pumilus CECT 5105)," *Appl. Soil Ecol.*, vol. 20, pp. 75–84.

[5] J. Pera and J. Parladé. (2005) "Inoculación controlada con hongos ectomicorrícicos en la producción de planta destinada a repoblaciones forestales : estado actual en España aplicación a la repoblación forestal," *Sist. y Recur. For.*, vol. 14, pp. 419–433.

[6] R. Prasad, M. Kumar, and A. Varma. (2015) "Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Medicinal Plants," vol. 42, pp. 247–260.

[7] J. Vessey. (2003) "Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers," *Plant Soil*, pp. 571–586.

[8] C. O. Patiño-Torres. (2010) "Solubilización de fosfatos por poblaciones bacterianas aisladas de un suelo del Valle del Cauca. Estudio de Biodiversidad y eficiencia.

[9] S. Banerjee, R. Palit, C. Sengupta, and D. Standing. (2010) "Stress induced phosphate solubilization by arthrobacter sp. and bacillus sp. isolated from tomato rhizosphere," *Aust. J. Crop Sci.*, vol. 4, no. 6, pp. 378–383.

[10] L. Fernández, M. Sagardoy, and M. Gómez. (2008) "Estudio de la fosfatasa ácida y alcalina en suelos de la Región Pampeana norte del área sojera argentina," *Ci. Suelo*, vol. 26, no. 1, pp. 35–40.

[11] C. S. Nautiyal. (1999) "An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 170, no. 1, pp. 265–270.

[12] J. M. Becerra, D. Quintero, M. Martinez, and A. Matiz. (2011) "Caracterización de microorganismos solubilizadores de fosfato aislados de suelos destinados al cultivo de uchuva (Physalis peruviana L .)," *Rev. Colomb. Ciencias Hortícolas*, vol. 5, no. 2, pp. 195–208.

[13] R. Gupta, R. Singal, A. Shankar, R. Chander, and R. Kumar Saxena. (1994) "A modified plate assay for screening Phosphate solubilizing microorganisms," *J.Gen.Appl.Microbiol.*, vol. 40, pp. 255–260.

[14] S. Alam, S. Khalil, N. Ayub, and M. Rashid. (2002) "In vitro Solubilization of Inorganic Phosphate by Phosphate Solubilizing Microorganisms (PSM) from Maize Rhizosphere," *Int. J. Agric. Biol.*, vol. 4, pp. 2–6.

[15] S. Tarun and R. Nishant. (2014) "Isolation of plant hormone (Indole-3-Acetic Acid - IAA) producing rhizobacteria and study on their effects on maize seedling," *Int. J. Pharm Tech Res.*, vol. 7, no. 1, pp. 99–107.

[16] C. Lara, L. M. Esquivel Avila, and J. . Negrete Peñata. (2011) "Bacterias nativas solubilizadores de fosfatos para incrementar los cultivos en el Departamento de Córdoba-Colobia," *Biotecnol. en el Sect. Agropecu. y Agroindustrial*, vol. 9, pp. 114–120.

[17] S. G. Dastager, C. K. Deepa, and A. Pandey. (2010) "Isolation and characterization of novel plant growth promoting Micrococcus sp NII-0909 and its interaction with cowpea.," *Plant Physiol. Biochem.*, vol. 48, no. 12, pp. 987–92.

[18] P. Velusamy, J. E. Immanuel, and S. S. Gnanamanickam. (2013) "Rhizosphere Bacteria for Biocontrol of Bacterial Blight and Growth Promotion of Rice," *Rice Sci.*, vol. 20, no. 5, pp. 356–362.

[19] C. Escobar, Y. Horna, C. Carreño, and G. Mendoza. (2011) "Caracterización de cepas nativas de Azotobacter spp . y su efecto en el desarrollo de Lycopersicon esculentum Mill . ' tomate ' en Lambayeque," *Sci. Agropecu.*, vol. 2, pp. 39–49.

[20] A. Sharma. (2014) "Application of Chemical and Biofertilizers on Growth and Biomass Production of Madhuca latifolia (Mahua) Seedlings.," *Int. J. Bio-Science Bio-Technology*, vol. 6, no. 4, pp. 25–32.

[21] J. Shankar Singh. (2013) "Plant growth promoting rhizobacteria: potential microbes for sustainable agriculture," *RESONANCE*, pp. 275–281.

DIAZOTROPHS APPLIED TO WHEAT CROPS AS AN ALTERNATIVE OF NITROGEN FERTILIZERS TO AVOID DEGRADATION SOIL

Norma Danitzia Hernández Cervantes[a]*, Miguel Juan Beltrán García[a+].

[a] Universidad Autónoma de Guadalajara (Departamento de Química ICET), Patria 1201, Lomas del Valle, Zapopan Jalisco, México.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: mbeltran71@hotmail.com

Área del Conocimiento: Agrobiotecnología.

ABSTRACT
In Mexico, the wheat represents 21% of consumption of basic grains, located on the second place after corn, in addition, it is the leading exporters of this grain. Unfortunately, the world is fighting with the problem of wheat production with responsibility and sustainability. The nitrogen fertilization is very expensive in crops production, besides it affects underground water enormously, because, the nitrate arrives to rivers and lakes, eventually, causing eutrophication and death of living organisms that depend of these sources of water. Evaluation of the N-organic acquisition , the plant growth stimulation through bacterial symbiosis are our majors objectives in this research.
We obtained endophytic bacteria through washing of wheat seeds, leafs and roots with a hypochlorite solution and macerated with saline solution. We using trypticase soy agar (TSA) as culture medium. Isolation of bacteria and agronomic tests were made for identification and know of benefits that can give to the plant. The bacteria identified were Enterobacter cloacae, *Alcaligenes faecalis, Bacillus pumilus, Serratia marcescens, Micrococus luteus, Stenotrophomonas maltofila, Brevibacterium linens, Corynebacterium stationis, B. flexus, B. safensis, Hydrogenophaba pseudoflava, Ochrobactrum grignonense*. The *Enterobacter cloacae* was the most frequent bacterium recovered from all sources; these members conferred positive benefits for plant growth, but some pathogens-related genus also were obtained.

PHYTOSYNTHESIS OF SILVER NANOPARTICLES USING *Pluchea sericea* LEAF EXTRACTS AND THEIR ANTIMICROBIAL PROPERTIES

(Fotosíntesis de nanopartículas de plata usando extractos de *Pluchea sericea* y sus propiedades antimicrobianas)

Ali Abdelmoteleb[a] , Benjamin Valdez-Salas[b], Daniel González-Mendoza[a*+]

[a] Instituto de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma de Baja California, Carretera a Delta s/n Ejido Nuevo León, 21705, Baja California, México
[b] Instituto de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Baja California, Calle de la Normal s/n y Boulevard Benito Juárez, 21100, Mexicali, Baja California, México

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: daniasaf@gmail.com

Área del Conocimiento: AGROBIOTECNOLOGIA

ABSTRACT.
Biological methods of nanoparticle synthesis are cost effective, easily scaled up and environmental friendly. In the present study a green synthesis of silver nanoparticles using leaf extract from Pluchea sericea has been demonstrated. The characterization and properties of Ag-NPs were investigated using UV-visible spectroscopic techniques, scan electron microscopy (SEM), energy dispersive X-ray spectrometers (EDS), zeta potential and Dynamic Light Scattering (DLS). It was observed that Pluchea sericea leaf extract can reduce silver ions into silver nanoparticles. The surface plasmon resonance peak, centered near 487 nm, affirmed the reduction of Ag+ to Ag0 . The average particle diameter as determined by SEM was found to be 43-50 nm, EDS analysis also exhibits presentation of silver element. The zeta potential analysis indicated that Ag-NPs have good stability (- 70.9 mV). The synthesized AgNPs were found to be spherical in shape with average diameter of 59.20 nm. Antibacterial activity of silver nanoparticles with different concentrations and leaf extract were evaluated against Bacillus subtilis and Acinetobacter calcoaceticus, and observed that all concentrations of silver nanoparticles showed antibacterial activity against the tested bacteria. Finally, the nanoparticles obtain from *P. sericea* which were synthesized using green synthesis may be used for antimicrobial activity against pathogens.

Keywords: valley Mexicali; native plants; nanoparticles; microorganins.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

DEVELOPMENT OF A BIO MICROBIAL FORMULATION FOR AGRICULTURAL APPLICATION IN CORN AND WHEAT, WITH AN IMPACT ON OVEREXPLOITED SOILS

(Desarrollo de una bioformulación microbiana para aplicación agrícola en maíz y trigo, con impacto en suelos sobre explotados)

Erick García Uribe[a]*, Julieta S. Veloz Rendon[a], Gloria M. Macedo Raygoza[c], Miguel Juan Beltrán García[b+]

[a] Centro de Investigación en Biotecnología aplicada, CIBA Tlaxcala-IPN, Ex-Hacienda San Juan Molino Carretera Estatal Tecuexcomac-Tepetitla Km 1.5, Tlaxcala C.P. 90700, México.
[b] Departamento de Química, Instituto de Ciencias Exactas y Terrestres (ICET), Universidad Autónoma de Guadalajara (UAG). Av. Patria 1201, Col. Lomas del Valle, CP 45129, Zapopan, Jalisco, México.
[c] Universidad Autónoma de Baja California, Instituto de Ingeniería, Mexicali, Baja California, CP 21280.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: mbeltran71@hotmail.com

Área del Conocimiento: Agrobiotecnologia

ABSTRACT
The two most important crops in the world are corn and wheat, with 39% and 30% of world produccion. Mexico has not self-sufficient production of these grains importing 60% and 45% for the consumption of the population in 2014. One reason of the deficiency of the grains is due to overexploitation of soils, as a result of agricultural activities (plowing, agrochemicals, fertilizers, burning, etc.). An alternative is the use of bio-fertilizers, which provide and enhance the availability of crop nutrients and plant growth stimulation through the incorporation of plant growth promoting microorganisms (PGP). The objective of this work is the development of a biofertilizer with isolated microorganisms from Jocotepec, Jalisco, México, as a PGP of corn and wheat plants, with effect in soil composition and evaluate the effect of the consortium in greenhouse tests. We are expecting obtain an increase in plant growth biomass and an improvement in the composition of soils. Soil samples were obtained from soils with conventional and organic management. Serial dilutions were made and plated in Norris a nitrogen-free medium. Initially 177 strains were isolated and tested for synthesis of siderophores, cellulases, phosphate solubilization, auxin production. That isolates were reduced to 40 strains based on the compatibility tests. This bacteria were identificated by 16S RNA sequencing. According to the results, 16 strains were selected under following groups: from organic management *Brevibacterium sp* (NT1-4.2), *Serratia marcescens* (BT-4.2), *Leucobacter sp* (BT5X1.3a), *Serratia sp*. (BT5X1.3b), *Bacillus sp*. (NT8-11B), *Stenotrophomonas sp*. (T4A), *S. maltophilia* (T5F3-2a), *Alcaligenes faecalis* (T5-1Ad) *Lysinibacillus fusiformis* (OGH4-1.3B1), *Tsukamurella sp* (OGH4-1.3B2), *Bacillus megaterium* (OGH4-1.3A), *Alcaligenes faecalis* (OGH3-2.1), *Bacillus subtilis* (OGH4-1.4B), *Paenibacillus sp*. (OCA4-3.5), *Bacillus megaterium* (OCA4-16), *Bacillus sp.* (OCA4-31). These bacteria groups will be tested in a bio-formulations, corn and wheat plants will be inoculated and soils parameters especially the organic matter content .

Keywords: Bio-fertilizer; soil composition; PGP.

MALDI-TOF MASS SPECTROMETRY VERSUS TRADITIONAL ITS SEQUENCING FOR IDENTIFICATION OF ENDOPHYTIC FUNGY FROM *Agave tequilana* WEBER WITH CAPACITY TO TRANSFER ORGANIC NITROGEN

(Identificación por espectrometría de masas MALDI-TOF contra secuencias ITS de hongos endófitos de *Agave tequilana* Weber con potencial para transferir N.)

Ileana Guadalupe Reyes Sepúlveda[a]*, Aurora Huerta[b], Gloria Margarita Macedo Raygoza[b], Claudia Ivette Cisneros Reyes[c], Miguel J. Beltrán García[a+].

[a,] Departamento de Química, Universidad Autónoma de Guadalajara
[b,]Universidad Autónoma de Baja California
[c] Centro de Investigación en Biotecnología aplicada, CIBA Tlaxcala-IPN

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: mbeltran71@hotmail.com

Área del Conocimiento: Agrobiotecnología.

ABSTRACT
Agave tequilana Weber is the main source for the manufacture of tequila, however the excessive use of nitrogen fertilizers has been negative for the soil fertility, decreasing the microbiota and organic matter. We are focusing on endophytic microorganisms as an adequate and viable alternative to solve this problem, here addressed the endophytic fungi from agave seeds. Thereby their accurate identification is a key factor for its application, unfortunately the traditional method used is the 5.8S rRNA gene sequence analysis (ITS sequences), but in some cases the data obtained is ambiguous, for that reason, it's necessary to employ another more accurate method for their identification, therefore an analysis by MALDI-TOF mass spectrometry would be a viable tool. The aim of this work was the proteins analysis by MALDI-TOF mass spectrometry and the 5.8S gene sequences analysis to detect the most accurate method for the identification of endophytic fungy isolated from *Agave tequilana* weber and get reliable data about their identity. MALDI-TOF ID was performed through intact cell proteins analysis. To accomplish these objectives, the fungal strains were cultivated seven days in potato dextrose broth; for molecular ID the DNA was extracted with the ZR Fungal/Bacterial miniprep kit (Zymo Research), afterwards the ITS-5.8S rDNA was amplified using the primer pair ITS1/ITS4 for their sequencing and further analysis in the GenBank data base; for the MALDI-TOF mass spectrometry analysis the mycelium was collected and mixed with HCCA matrix. By the 5.8S gene sequences analysis it was found that the fungi are *Alternaria sp, Alternaria alternata, Phomopsis sp, Curvularia sp., Diaporthe sp., Curvularia aeria, Sordariomycetes sp, Phomopsis cuppatea, Fusarium equiseti* and *Alternaria tenuissima* with percentages of 90 to 100% in all the cases and by the intact cell proteins analysis by MALDI-TOF mass spectrometry, all fungal strains were identified as *Alternaria alternata* with scores from 1,3 to 1,7.

Keywords: Agave tequilana Weber; endophytic fungy; MALDI-TOF; ITS sequences.

ENDOPHYTES DIVERSITY OF GROWTH PROMOTING BACTERIA ASSOCIATED WITH ROOTS OF CORN (*Zea mays*) AND GROWTH TRAITS FOR THE DEVELOPMENT OF THE PLANT

(Diversidad de bacterias endófitas promotoras de crecimiento asociadas a raíces de *Zea mays* y factores de crecimiento para el desarrollo de la planta)

Mariana Checa Pastrana[a]*, Layna Gabriela Osuna Camacho[a], Miguel Juan Beltrán García[a+]

[a] Departamento de Química, Instituto de Ciencias Exactas y Terrestres (ICET), Universidad Autónoma de Guadalajara (UAG). Av. Patria 1201, Col. Lomas del Valle, CP 45129, Zapopan, Jalisco, México.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: mbeltran71@hotmail.com

Área del Conocimiento: Agrobiotecnología.

ABSTRACT
In Mexico corn is the leading first major crop in terms of production and consumption, with an annual average of 90 kg per capita, it is also widely cultivated throughout the world and each year it is produced in a greater weight than any other grain. Now at days the problematic of corn yield potential has increased because of the use of pesticides and fertilizers that overexploit the soils, leading us to search for a suitable, green and potential solution using bio-fertilizers. Plant growth promoting microorganisms are the new "Green Fertilizers" that would ease the availability of crop nutrients. The aim of this work was to identify the characteristics of the endophyte population that promotes the growth of the plant as well as other species and their behavior. We expect to obtain knowledge about interaction of the endophytic microorganisms as a cosortium that would modify the use of chemical fertilizers. The identification of the microbe species with traits needed for stimulating the plant's growth and then the capability of interaction between them. To cultivate endophytic bacteria, tissues from the roots and leaves of corn plants grown in Acatic, Jalisco were obtained. Root was divided into aerial and ground contact, to which were chopped, washed with ethanol, hypochlorite and water, macerated, then made dilutions and cultivated directly into Norris medium with the intention of isolating nitrogen-fixing bacteria. The bacteria that grew were re-cultivated into CASOY medium. Different biochemical tests where made to 45 of 90 bacteria isolated to identify the microorganisms ability to solubilize phosphates, siderophores secretion and biosynthesis of auxins (IAA), also we made an analysis of mass spectrometry MALDI-TOF to identify the strains. According to the results we found 4 strains resulting as positive to all tests: *Enterobacter kobei, Bacillus pumillus, Paenibacillus xylanilyticus and Pectobacterium carotovorum* a well-known pathogen.

Keywords: Endophytes; bio-fertilizers; consortium.

WHEAT ENDOPHYTES ISOLATION AND IDENTIFICATION BY MALDI-TOF OF SEED BACTERIA

(Aislamiento de endófitos de trigo e identificación de bacterias por MALDI-TOF)

Angeles Itchel Vázquez Fernández[a*], Norma Hernández[a], Gloria Macedo Raygoza[a], Claudia Cisneros-Reyes[a], Miguel J. Beltrán-García[a+].

[a]Departamento de Química, Universidad Autónoma de Guadalajara

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: mbeltran71@hotmail.com

Área del Conocimiento: Agrobiotecnología.

ABSTRACT
Wheat is one of the four most important crops in whole world. In Mexico wheat farming is part of the economic activities, thousands of acres are grown annually, but the number of cultivated area in the last decade has been decreased. The main problem related to wheat, are related to soil conditions where it is grown and the wheatear. There are also biological factors which involve plant diseases caused by fungi, viruses and bacteria, which affect plant development. One of the current objectives in our laboratory is to know the behaviour of endophytic bacteria isolated from seeds to provide benefits and diminish N-fertilization. For this project bacteria from wheat seeds were extracted, purified and identificated by MALDI-TOF mass spectrometry. Our analysis showed *Enterobacter cloacae, Alcaligenes faecalis, Staphylococcus cohnii, Rizobium radiobacter, Stenotrophomas, Enterococcus casseliflavus, Solibacillus silvestris, Microbacterium testaceum, Straphylococcus xylosus and Micrococcus ieteus* as the bacteria predominantly in wheat seeds. Now we are analysing the agronomic properties.

Keywords: Agronomics; Wheat; Endophytic; MALDI-TOF.

THE POTENTIAL OF SIMBIOTIC BACTERIA FROM CORN SEEDS AS BIOFERTILIZERS AGENTS

(El potencial de bacterias endófitas extraidas de semillas del maíz como agentes biofertilizantes)

Óscar De Jesús Flores Delgadillo[a*], Gloria Margarita Macedo Raygoza[a], Aurora Xihutil Huerta Roblesa[a], Rafael Villa angulo[a], Layna Gabriela Ozuna Camacho[a], Miguel J. Beltrán García[a+].

[a]Departamento de Química, Universidad Autónoma de Guadalajara

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: mbeltran71@hotmail.com

Área del Conocimiento: Agrobiotecnología.

ABSTRACT
Plants and animals live continously in symbiosis with microorganisms. For example microorganisms fixing nitrogen in plants or degradating cellulose on ruminants species. Now the scientific community is interested on both plant and human microbiomes, trying to find the prefect simbiosis to archive a healtier life for both, human and plants; over all, is well known that México is one of the greatest consumers of corn, and on the contrary of what every one could believe, we had becomed the second greatest importer worldwide, according to SIAP data (SAGARPA) on the last five years México has showed negative numbers related to tonnes per hectare on this culture caused by multiple factors, most of them diseases provoked by becteria or fungus, and some of them caused by enviromental problems like drought; currently we have a 30% of deficit production. In our concern about this problems we have decided to study this microobiome, trying to find the most benefical microbiota for the corn plants; in some cases this micro organisms are essential for the organism to survive. We have isolated endophytes from corn seed, aplying agronomic test concluded its eficience on fixing nitrogen, solubilizing phosphates, and auxins production, in this work ill present the identification of this endophys by two paths, the biomolecular path; and ussing the MALDI TOF technology, finding *Enterobacter asbouriae, Klebsiella oxytoka* and *Bacillus pulilus* to mention a few of them. In the end this bacteria will be put on a bioformulation as a friendly environmental biofertilizer alternative in order to reduce the cuantity of inorganic fertilizers applied.

Keywords: corn, endophytes, biomoleular, MALDI-TOF, biofertilizer.

ORGANIC NITROGEN TRANSFER TROUGH A DESIGNED BACTERIAL SYMBIOSIS AS A STRATEGY TO AVOID SOIL DEGRADATION CAUSED BY NITROGEN FERTILIZERS

(Transferencia de nitrógeno orgánico a través de una simbiosis bacteriana diseñada para evitar la degradación de suelos causada por fertilizantes nitrogenados)

Layna Gabriela Osuna Camacho[a]*, Mariana Checa Pastrana[a], Miguel Beltrán García[a+], Gloria Macedo[a], Claudia Cisneros[a].

[a] Universidad Autónoma de Guadalajara, Departamento de química.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: mbeltran71@hotmail.com

Área del Conocimiento: Agrobiotecnología.

ABSTRACT
We try to engage the use of nitrogen fertilizers and its pollution potential. Due to the national demand for efficient food production, the excessive use of these N-fertilizers diminished soil organic matter, and fertility. Corn is ranked as the first major crops in Mexico in terms of production and consumption, with an annual average of 90 kg per capita. The interest of this study is to determine the microbial communities that colonize the internal tissues (endophytes), based on their agronomic properties and its ability to colonize the internal tissues of plants for developing a bio-inoculants to optimize the growth of cultivated varieties of corn in Mexico. We are thinking that not only one microorganism can acting as plant growth promoter. We isolated directly from Norris medium 98 bacteria from plant roots took in Acatic, Jalisco. We analyzing agronomic traits like phosphate solubilization, siderophores secretion and biosynthesis of auxins (IAA). We found 100% positive to nitrogen fixation, 40.81% to biosynthesis of auxins (IAA), 41.84% to phosphate solubilization and 18.37% positive to siderophores secretion. We also identified the microbial diversity by MALDI TOF mass spectrometry and gene sequencing 16s ADNr with 100% coincidence between both results, being the most predominant genre *Enterobacter asburiae (15%), Bacillus pumilus (13%)* and *Enterobacter kobei(7%).* Based on the agronomic potential results of bacteria we selected *Enterobacter kobei, Bacillus pumillus, Paenibacillus xylanilyticus,* y *Enterobacter asburiae,* for the next step in the project. Currently, we are evaluating the effect of PGP in 10 different maize varieties; also we will determine the process of colonization with transformed bacteria with GFP and the addition of ^{15}N gas (fixation) and ^{15}N organic (transfer).

Keywords: *Zea mays,* bacterial symbiosis, bio-fertilizers.

CORN ENDOPHITIC BACTERIA SELECTION FOR ORGANIC NITROGEN TRANSFER

(Selección de endófitos de maíz para transferencia de nitrógeno orgánico)

Jesús Francisco Echaide-Aquino[a]*, Gloria Margarita Macedo-Raygoza[a], Claudia Ivette Cisneros Reyes[a], Miguel Juan Beltran-Garcia[a+].

[a]Laboratorio 309, Departamento de química ICET, Universidad Autónoma de Guadalajara, patria 1201, Lomas del valle, Zapopan, alisco. C.P. 45129, Departamento de Química.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: mbeltran71@hotmail.com

Área del Conocimiento: Agrobiotecnología.

ABSTRACT
The consequence of the application of inorganic fertilizers or with high levels of nitrogen have been noted in the last years. That's why in this laboratory we focus our investigation in understanding the bacterial symbiosis. To restore the macro and micronutrients, the original biota and to stop the erosion process the implementation of nitrogen fixing symbiotic bacterium is a new alternative that provided us a strategy to lessen the negative impact of the inorganic fertilizers and subsequently recover the soil.
The isolation of at least 5 bacterias with specific characteristics in order to increase the soil productivity by the production of biomolecules like auxins and siderophores that promote the plant growth.
The extraction of the endophytic bacteria was made by macerating the root and taking rhizosphere soil. The product obtained was diluted 6 times and then was growth soy thrypticasein. The bacterias were isolated and subject to gram and agronomic test. The bacterial identification was made by sequencing the 16s ribosomal subunit and corroborated by MALDI-TOF. Knowing the properties of each bacteria we selected 30 from 54 bacterias isolated. After the identification we can agroup this bacterias in 14 different species, mostly bacillus genre.
Most of the isolated microorganisms are gram positive bacilos bacterias, we think that this is due to the place where we isolate. The strains of bacillus behave as facultative endophytes and in our agronomics tests demonstrate to be more efficient in the sisntesis of phytohormones.
The subsequent experiment will help us to understand how the bacteria interacts with the plant and how the colonization process works, also we are going to measure the nitrogen fixing capability by molecular identification of the Nif gene.
We are trying to understand how the bacteria interacts with the root and how the colonization process is made by the bacteria.

Keywords: Endophytes, MALDI-TOFF, Nitrogen.

EVALUATION OF YIELD AND QUALITY OF FORAGE MAIZE HYBRIDS IN HIGH NORTHERN OF JALISCO FOR MILK PRODUCTION

(Evaluación de rendimiento y calidad de híbridos de maíz para forraje en Altos Norte de Jalisco para la producción láctea)

Elizabeth Zendejas Aguilar [a]*, Ofelia Iñiguez Gómez [b], Laura Gómez de la Torre [b], José Manuel Palma García [c], Carlos Urban Häubi Segura [d], José de Jesús Olmos Colmenero [b+].

[a] Posgrado Interinstitucional en Producción Pecuaria, Universidad de Guadalajara
[b] Departamento de ciencias biológicas, Universidad de Guadalajara
[c] Centro de Investigación y Desarrollo Agropecuario, Universidad de Colima
[d] Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma de Aguascalientes

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: jolmos@cualtos.udg.mx

Área del Conocimiento: Agropecuaria

ABSTRACT
In the production units, food represents 60 to 70% of inputs to produce a liter of milk monthly, for this reason; food is one of the biggest challenges to reduce production costs. As alternatives to achieve it, they are the forages that are the basis of livestock feed, as they are the cheapest source of nutrients and provide the fiber needed to maintain the health of ruminants. At present, within the schemes considered to increase production and quality of milk it is to have the corn hybrids that meet a balance between the production of dry matter, fiber, protein and high energy levels. The object of this study was to evaluate the yield and nutritional quality of 45 corn hybrids for forage in the high northern of Jalisco for milk production. As hypothesis proposes that there is an impact of maize hybrid selection for forage and its growth cycle performance and on the nutritional quality of corn silage for milk production. The material was evaluated in two municipalities, San Juan de los Lagos and Encarnación Diaz; both plots were established with a design of a randomized complete block. The statistical model for this study was multiple analysis of variance and comparison of means by Tukey. Hybrids obtained outstanding results for yield and nutritional quality in both locations were DK 2042, BOA, DK 2069, SULTÁN, CIMARRON y P 30 A 60.

Keywords: Forage maize; yield; forage quality; dairy production potential.

RESUMEN
En las unidades de producción, la alimentación representa del 60 al 70 % de los insumos para producir un litro de leche mensual, por esta razón, la alimentación representa uno de los mayores retos para reducir los de costos de producción. Como alternativas para lograrlo, se encuentran los forrajes que son la base de la alimentación del ganado, ya que son la fuente más barata de nutrimentos y proporcionan la fibra requerida para mantener la salud de los rumiantes. En la actualidad, dentro de los esquemas considerados para incrementar la producción y calidad en la leche está la de contar con híbridos de maíz que reúnan un balance entre la producción de materia seca, contenido de fibra, proteína y altos niveles

de energía. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el rendimiento y calidad nutricional de 45 híbridos de maíz para forraje en la región Altos Norte de Jalisco para la producción láctea. Como hipótesis se plantea que existe un impacto de selección del híbrido de maíz para forraje y su ciclo vegetativo sobre el rendimiento y calidad nutricional del ensilaje de maíz para la producción de leche. El material se evaluó en dos municipios, San Juan de los Lagos y Encarnación de Díaz; ambas parcelas se establecieron con un diseño de bloques completos al azar. El modelo estadístico para este estudio fue análisis de varianza y comparación múltiple de medias por Tukey. Los híbridos que obtuvieron resultados sobresalientes para rendimiento y calidad nutricional en ambas localidades fueron DK 2042, BOA, DK 2969, SULTÁN, CIMARRÓN y P 30 A 60

Palabras Clave: Forraje de maíz; rendimiento; calidad de forraje; potencial lechero.

INTRODUCCIÓN

La importancia del maíz (*Zea mays*) como forraje radica en su valor energético; alta producción de materia seca por hectárea, elevada digestibilidad, así como por su menor requerimiento de agua que otros cultivos forrajeros como la alfalfa, sorgo, etc., además de su facilidad de cosecha. En la actualidad, dentro de los esquemas considerados para incrementar la producción y calidad de la leche está el contar con híbridos de maíz de alto valor que cuenten con características adecuadas de producción de biomasa y adecuado contenido de fibra, almidón, proteína y altos niveles de energía [1]. Lo que se traducirá en una mayor producción de leche por hectárea [2]. La producción de forraje de maíz en muchas regiones lecheras de México y en particular en Jalisco, es estacional, por ello, es necesario entregarle al productor el material genético idóneo para su región, quien se enfrenta a una amplia disponibilidad de materiales comerciales, sin que exista información de las características productivas de los híbridos disponibles para que optimice su utilización. Por lo tanto se planteó como hipótesis que existe un impacto de selección del híbrido de maíz para forraje, su ciclo vegetativo sobre el rendimiento y calidad nutricional del ensilaje de maíz para la producción de leche. Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue evaluar el rendimiento y calidad nutricional de 45 híbridos de maíz para forraje bajo las condiciones de riego en la región de Altos Norte de Jalisco, México durante el ciclo primavera-verano del 2014. Con base en lo anterior se pretende mejorar el rendimiento y calidad de forrajes, especialmente el ensilaje de maíz e incrementar la producción de leche vaca por día, con el cual se reduce considerablemente los costos fijos y el proceso de producción, obteniendo mayor rentabilidad en los establos lecheros en base en la alimentación.

METODOLOGÍA

Los tratamientos consistieron en 45 híbridos de maíz para forraje para el ganado lechero con diferente ciclo vegetativo y casas comerciales; los híbridos fueron DK 2042, 253 W, XR 20 A, ASH 1124, 9105 W, EXA 008, EXA 105, EXA 101, NA 35, 9009, EXA 009, GSG 004, GSG 104, ABT 1226, BOA, DK 2069, Sultán, P 3015 W, P 30 A 60, Cimarrón, XR 21, P 3368 W, DK 2061, DK 2038, San Andrés, P 3055 W, DAS 3359, TG 833, AS 1503, DAS 2362, XR 47, ASH 1045, Antílope, Arrayán, MAR 011, TG 955 W, Titán, SB 308, Forza 100, DAS 2358, San Máximo, ASH 1141, Pegaso, KUARI y Amarillo CCC. Se utilizó un ANDEVA para un diseño de bloques completos al azar, el bloque fue la localidad en donde se sembraron dos surcos de cada tratamiento de 150 m de largo y 75 cm, se utilizó prueba de Tukey ($P<0.05$) para diferencia múltiple de medias con apoyo del paquete estadístico SAS (versión 8.0). Una parcela se ubicó en Corralillos Km. 122 en San Juan de Los Lagos, Jalisco; las temperaturas registradas en el municipio de San Juan de los Lagos durante los meses de siembra y crecimiento de la planta fueron como máxima 31 °C,

media 24 °C y mínima 15 °C, con respecto al promedio de la precipitación pluvial fue 180 mm. La otra en Santo Domingo en Encarnación de Díaz, Jalisco; las temperaturas registradas fueron máxima 30 °C, media 23 °C y mínima 14 °C, con una precipitación pluvial promedio de 140 mm. El experimento se estableció en la parcela de Santo Domingo el día 16 de mayo del 2014 y en Corralillos el 06 de junio del 2014. Las plagas que se presentaron fueron gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*), gusano de alambre (*Agrotes lineatus*). Se realizó el análisis de calidad de suelo para ambas localidades post-cosecha, el día 02 de enero del 2015 por la empresa Fertilidad de Suelos S. de R.L. (Fertilab), que reporto los siguientes resultados para la parcela Corralillos; la interpretación de los resultados es que el suelo cuenta con alto nivel de salinidad, materia orgánica del 6.04%, alto en fósforo, potasio y magnesio. En la parcela Santo Domingo; cuenta con; materia orgánica del 3.67%, alto en fósforo, en potasio y mediano en magnesio. Se determinó que el momento más adecuado de realizar la cosecha de los híbridos era cuando el grano contará con 3/4 línea de leche de avance. La fecha de cosecha para los híbridos precoces en Santo Domingo fue el 19 de septiembre del 2014 y para los híbridos intermedios en la misma localidad fue el 30 de septiembre del 2014. En la localidad de Corralillos la fecha de cosecha para híbridos precoces fue 17 de Octubre del 2014 y para los híbridos intermedios fue el día 22 de octubre del 2014. Las variables evaluadas fueron: altura de la base a la espiga (m), altura de la base a la mazorca (m), se cosecharon 10 metros lineales de cada surco evitando el "efecto orilla", número de plantas cosechadas por surco y su peso (kg); se seleccionaron tres plantas completas (con mazorca) del surco uno y del surco dos de cada tratamiento y su peso (kg), se les retiraron las mazorcas, se le quitaron las hojas y se registró el peso (gr). El análisis de los parámetros materia seca a 55 °C, materia seca a 105 °C, cenizas, FDA, FDN, PC, lignina (%) se realizaron en el Laboratorio de Nutrición Animal y Forrajes del Centro Universitario de los Altos de la Universidad De Guadalajara atendiendo a las técnicas establecidas y estandarizadas para el análisis de forraje AOAC, 2000. La estimación del potencial productivo lechero (kg/ton ms) de cada híbrido forraje y energía neta de lactancia (ENL) (Mcal/kg), se utilizó el programa MILK 2006.

RESULTADOS

En la tabla 1 se presentan los resultados de potencial productivo lechero, energía neta de lactancia y rendimiento de materia seca de los híbridos evaluados en Corralillos, San Juan de los Lagos. La producción promedio del potencial lechero oscilo entre 17.5 a los 36.9 ton/ha. El grupo sobresaliente para producción de leche estuvo formado por los híbridos DK 2042, BOA, P 30 A 60, DK 2069, SULTÁN y DK 2061 que obtuvieron resultados superiores a los 29.9 ton/ha. Para energía neta de lactancia la media general fue de 1.37 Mcal/kg, donde hubo dos híbridos que obtuvieron resultados superiores a la media, fueron GSG 004 y DK 2061 con 1.48 y 1.45 Mcal/kg respectivamente. Con respecto a rendimiento de materia seca por hectárea, los rangos oscilaron entre 16,002.6 a 27,651.1 kg/ha. El grupo sobresaliente estuvo formado por los materiales DK 2042, BOA, DK 2069 y SULTÁN que obtuvieron un rendimiento por encima de los 24,092.4 kg/ha. En todas las variables se detectaron diferencias estadísticas ($P<0.05$).

Tabla 1. Potencial productivo lechero (ton/ha), Energía neta de lactancia (Mcal/kg MS) y Rendimiento de materia seca (kg/ha) de híbridos de maíz para forraje evaluados en Corralillos, San Juan de los Lagos, Jalisco, México. Primavera-verano 2014.

Hibrido	Potencial productivo lechero ton/ha	ENL 3x Mcal/kg MS	Rendimiento de materia seca Kg/ha	Hibrido	Potencial productivo lechero ton/ha	ENL 3x Mcal/kg MS	Rendimiento de materia seca Kg/ha
DK 2042	**36.9 e**	1.44 bcd	**27651.1 f**	TG 955 W	25.6 abcd	1.42 bcd	19517.2 abcde
BOA	**31.6 de**	1.40 bcd	**24618.7 ef**	DAS 3359	25.6 abcd	1.35 abcd	21247.3 abcdef
P 30 A 60	**31.1 cde**	1.44 bcd	23250.5 bcdef	Antílope	25.5 abcd	1.41 bcd	19914.3 abcde
DK 2069	**31.1 cde**	1.40 bcd	**24467.3 def**	AS 1503	25.5 abcd	1.35 abcd	21119.1 abcdef
Sultán	**31.0 cde**	1.41 bcd	**24092.4 def**	NA 35	25.4 abcd	1.39 abcd	20239.1 abcde
DK 2061	**29.9 cde**	**1.45 cd**	22089.9 abcdef	San Andrés	25.0 abcd	1.30 abc	21894.6 abcdef
Cimarrón	29.5 bcde	1.43 bcd	22750.5 bcdef	EXA 009	24.8 abcd	1.38 abcd	19770.7 abcde
DK 2038	28.5 bcde	1.42 bcd	22051.6 abcdef	GSG 104	24.5 abcd	1.42 bcd	18619.5 abcde
XR 20 A	28.3 abcde	1.37 abcd	22859.1 bcdef	Forza 100	24.2 abcd	1.39 abcd	19022.1 abcde
P 3368 W	27.9 abcde	1.37 abcd	22623.7 abcdef	Titán	24.1 abcd	1.37 abcd	19435.9 abcde
P 3015 W	27.8 abcde	1.31 abc	23991.3 bcdef	EXA 105	24.0 abcd	1.31 abc	20666.0 abcde
P 3055 W	27.7 abcde	1.40 abcd	21543.7 abcdef	ASH 1045	23.8 abcd	1.34 abcd	20192.7 abcde
ASH 1124	27.6 abcde	1.40 bcd	21555.4 abcdef	MAR 011	23.8 abcd	1.35 abcd	19654.0 abcde
253 W	27.3 abcde	1.31 abc	24026.0 bcdef	SB 308	23.5 abcd	1.38 abcd	19081.4 abcde
GSG 004	27.0 abcde	**1.48 d**	19304.4 abcde	Arrayán	23.1 abcd	1.32 abcd	19728.0 abcde
XR 47	26.8 abcde	1.42 bcd	20381.0 abcde	San Máximo	22.5 abcd	1.35 abcd	18694.0 abcde
9105 W	26.5 abcde	1.37 abcd	21240.8 abcdef	DAS 2358	22.0 abcd	1.32 abc	18749.9 abcde
EXA 008	26.3 abcde	1.37 abcd	21191.4 abcdef	ASH 1141	21.8 abcd	1.36 abcd	18100.5 abcde
DAS 2362	25.9 abcd	1.37 abcd	20822.9 abcde	Pegaso	20.8 abc	1.32 abcd	17844.9 abcd
9009	25.9 abcd	1.41 bcd	19892.1 abcde	ABT 1226	19.0 ab	1.34 abcd	16002.6 a
XR 21	25.8 abcd	1.30 abc	22652.3 abcdef	KUARI	18.8 ab	1.29 ab	16854.7 ab
TG 833	25.7 abcd	1.35 abcd	21223.5 abcdef	Amarillo CCC	17.5 a	1.24 a	16667 ab
EXA 101	25.7 abcd	1.39 abcd	20341.2 abcde				
μ	**25.7**	**1.37**	**20761.1**				
EEM	**0.38**	**0.0074**	**346.4**				
Máxima	**36.9**	**1.48**	**27651.1**				
Mínima	**17.5**	**1.23**	**16002.6**				
Rango	**19.4**	**0.24**	**11648.5**				
P	**0.01**	**0.01**	**0.01**				

Medias en la misma columna con diferente superíndice son diferentes significativamente (P < 0.05)
Los valores resaltados en negritas representan los mejores parámetros para la variable.

En la tabla 2 se presentan los resultados de potencial productivo lechero, energía neta de lactancia y rendimiento de materia seca de los híbridos evaluados en Santo Domingo, Encarnación de Díaz. La producción promedio del potencial lechero oscilo entre 10.1 a los 28.2 ton/ha. El grupo sobresaliente para producción de leche estuvo formado por los híbridos DK 2042, BOA y 9105 W que obtuvieron resultados superiores a los 26.8 ton/ha. Para energía neta de lactancia la media general fue de 1.25 Mcal/kg, donde hubo dos híbridos que obtuvieron resultados superiores, fueron DK 2042 y 9105 W con 1.36 Mcal/kg. Con respecto a rendimiento de materia seca por hectárea, los rangos oscilaron entre 10,296.1 y 25,780.2 kg/ha. El grupo sobresaliente estuvo conformado por los híbridos BOA, DK 2042, P

30 A 60, XR 47, DK 2061, DK 2069, SB 308, P 3015 W, AS 1503 y XR 21 que obtuvieron un rendimiento por encima de los 23,200.4 kg/ha. En las tres variables se detectaron diferencias estadísticas (P<0.05).

Tabla 2. Potencial productivo lechero (ton/ha), Energía neta de lactancia (Mcal/kg MS) y Rendimiento de materia seca (kg/ha) de híbridos de maíz para forraje evaluados en Santo Domingo, Encarnación de Díaz, Jalisco, México. Primavera-verano 2014.

Hibrido	Potencial productivo lechero ton/ha	ENL 3x Mcal/kg MS	Rendimiento de materia seca Kg/ha	Hibrido	Potencial productivo lechero ton/ha	ENL 3x Mcal/kg MS	Rendimiento de materia seca Kg/ha
DK 2042	**28.2 c**	**1.36 b**	**23222.6 efg**	Cimarrón	22.4 abc	1.20 ab	22629.5 defg
BOA	**27.7 c**	1.26 ab	**25780.2 g**	EXA 008	22.3 abc	1.24 ab	21520.2 cdefg
9105 W	**26.8 bc**	**1.36 b**	22019.3 cdefg	ASH 1124	22.2 abc	1.34 ab	18636.1 abcdefg
P 30 A 60	26.3 abc	1.28 ab	**24071.2 fg**	DAS 2362	22.2 abc	1.19 ab	22687.3 defg
XR 47	25.9 abc	1.27 ab	**23266.8 efg**	DAS 3359	21.8 abc	1.18 ab	22299.6 cdefg
Sultán	25.4 abc	1.27 ab	23022.1 defg	GSG 104	21.2 abc	1.30 ab	18644.8 abcdefg
DK 2061	25.0 abc	1.23 ab	**23998.0 fg**	Titán	21.0 abc	1.28 ab	18635.6 abcdefg
DK 2069	24.9 abc	1.25 ab	**23697.3 efg**	San Andrés	20.8 abc	1.15 a	22567.8 defg
9009	24.4 abc	1.34 ab	20419.8 abcdefg	EXA 105	20.7 abc	1.25 ab	19281.1 abcdefg
GSG 004	24.0 abc	1.29 ab	21282.1 cdefg	KUARI	20.0 abc	1.21 ab	19982.1 abcdefg
SB 308	23.7 abc	1.18 ab	**24633.7 fg**	P 3055 W	20.0 abc	1.22 ab	19547.6 abcdefg
EXA 009	23.5 abc	1.28 ab	21419.4 cdefg	DAS 2358	19.6 abc	1.15 a	21153.5 bcdefg
P 3015 W	23.4 abc	1.21 ab	**23200.4 efg**	NA 35	18.8 abc	1.25 ab	17667.4 abcdefg
AS 1503	23.3 abc	1.20 ab	**23444.2 efg**	Arrayán	18.6 abc	1.21 ab	18536.9 abcdefg
XR 21	23.3 abc	1.22 ab	**23474.2 efg**	ABT 1226	17.5 abc	1.32 ab	15054.4 abcdef
P 3368 W	23.1 abc	1.26 ab	21441.6 cdefg	Antílope	17.4 abc	1.26 ab	16224.1 abcdefg
XR 20 A	22.9 abc	1.30 ab	19971.0 abcdefg	Forza 100	17.1 abc	1.31 ab	14774.4 abcdef
253 W	22.8 abc	1.29 ab	20397.6 abcdefg	Pegaso	13.8 abc	1.16 ab	14495.5 abcdef
ASH 1141	22.8 abc	1.26 ab	21172.0 bcdefg	TG 955 W	13.2 abc	1.27 ab	12030.3 abc
San Máximo	22.7 abc	1.26 ab	20886.4 bcdefg	MAR 011	11.3 ab	1.23 ab	10863.6 ab
ASH 1045	22.7 abc	1.28 ab	20495.8 abcdefg	TG 833	11.3 ab	1.13 a	12712.1 abcd
DK 2038	22.6 abc	1.23 ab	21960.1 cdefg	Amarillo CCC	10.1 a	1.20 ab	10296.1 a
EXA 101	22.5 abc	1.26 ab	20794.0 bcdefg				
μ	**21.3**	**1.25**	**19965.3**				
EEM	**0.46**	**0.008**	**511.7**				
Máxima	**28.2**	**1.37**	**25780.2**				
Mínima	**10.1**	**1.12**	**10296.1**				
Rango	**18.0**	**0.24**	**15484.1**				
P	**0.01**	**0.01**	**0.01**				

Medias en la misma columna con diferente superíndice son diferentes significativamente (P < 0.05)
Los valores resaltados en negritas representan los mejores parámetros para la variable.

DISCUSIÓN

En relación a los resultados obtenidos en el presente estudió se observó que el potencial productivo lechero está íntimamente relacionada al rendimiento de materia seca y calidad nutricional, tal como lo informa Núñez [3]. Los resultados obtenidos para esta misma variable son inferiores a los encontrados

por González [4] donde se encontraron producciones estimadas hasta 40.10 ton/ha, en contraste con el presente estudio donde la máxima en las localidades fue 36.9 ton/ha, esto puede ser explicado a los diferentes rangos de cosecha y calidad nutricional de los híbridos evaluados. Cabe mencionar, que el resultado superior para esta variable dentro del presente estudio la obtuvo el híbrido DK 2042 en ambas localidades. Con respecto a energía neta de lactancia el promedio general en la parcela Corralillos fue de 1.3 Mcal/kg MS que es igual a la reportada por Peña [5] en su evaluación de 72 híbridos de maíz para forraje en Pabellón, Aguascalientes, esta similitud puede ser explicada a los porcentajes de calidad nutricional en ambos estudios. Se pudo cotejar en ambas unidades experimentales que el rendimiento de materia seca está relacionada con la producción de leche, la calidad nutricional de los híbridos y porcentaje de materia seca durante la cosecha como encontró Darby [6], dada la variabilidad de porcentajes de materia seca en el momento de la cosecha tomando en cuenta el avance de línea de leche del grano (3/4) para este estudio y en el presentado por Núñez [7] se pude concluir que si se considera el llenado del grano como un indicador de la madurez, se tendrá un amplio margen de variación en materia seca. Con dicha información se confirma lo estipulado en la hipótesis del presente estudio donde se afirma que existe un impacto de selección del híbridos de maíz para forraje, su ciclo vegetativo sobre el rendimiento y calidad nutricional sobre la producción de leche, es decir, que la simple decisión de selección de un híbrido a otro puede representar merma en producción láctea hasta del 20.0 ton/ha.

CONCLUSIONES

Los híbridos para forraje recomendados para el municipio de San Juan de los Lagos por rendimientos de materia seca, calidad nutricional y potencial productivo lechero son DK 2042, BOA, P 30 A 60, DK 2069, SULTÁN, DK 2061 y GSG 004. Los híbridos para forraje recomendados para el municipio Encarnación de Díaz por rendimientos de materia seca, calidad nutricional y potencial productivo lechero son DK 2042, BOA, 9105 W y P 30 A 60. Se puede inferir que hay cinco híbridos que se comportan de manera similar en ambos municipios y se pueden recomendar para ambas localidades sobre su rendimiento de materia seca, calidad nutricional y potencial productivo lechero, los híbridos son DK 2042, BOA, DK 2069, SULTÁN, CIMARRON y P 30 A 60.

REFERENCIAS

[1] Núñez, H.G. y Cantú, B.J.E. (2001). “Producción, composición química y digestibilidad del forraje de sorgo x Sudán de nervadura café en la región norte de México”, Téc Pecu Méx, 38 (3):177-187.

[2] Crasta, J.S., Cox, W.J. & Cherney, D.J.H. (1997). “Factors affecting maize forage quality development in the northeastern USA”. Agron. J. 89:251

[3] Núñez, H.G., Contreras, E.F. y Faz, R. (2003). “Características agronómicas y químicas importantes en híbridos de maíz para forraje con alto valor energético”, Téc Pecu Méx, 41:37.

[4] González, C.F.; Robles, E.F.J.; Peña, R.A. y Santana, O. (2013). Evaluación de híbridos de maíz para forraje en Aguascalientes. Centro de Investigación Regional Norte- Centro. Aguascalientes. Informe 2013. pp. 1-15.

[5] Peña, R.A., Santana, O.I. y Ruiz, A.O. (2014). Evaluación de híbridos de maíz para forraje en Aguascalientes. Centro de Investigación Regional Norte- Centro. Aguascalientes. Informe 2014. pp. 1-17.

[6] Darby, H.M. y Lauer, J.G. (2002). “Harvest date and hybrid influence on corn forage yield, quality, and preservation”. Agron. J. 94:559.

[7] Núñez, H.G., Faz, C.R., González, C.F. y Peña, R.A. (2005). “Madurez de híbridos de maíz a la cosecha para mejorar la producción y calidad del forraje”, Téc Pecu Méx, 43 (1): 69-78.

EVALUATION OF KABULI CHICKPEA CULTIVARS ON THREE PLANTING DATES IN SINALOA, MEXICO

(Evaluación de variedades de garbanzo tipo kabuli en tres fechas de siembra en Sinaloa, México)

Milagros Ramírez-Soto*[a+], Víctor Valenzuela-Herrera[a]

[a] INIFAP-CIRNO, Campo Experimental Valle de Culiacán/km 17.5 Carretera Culiacán-ElDorado, Culiacán, Sinaloa. Tel. (0155) 38718700 Ext. 81408.

*Autor que presentó el trabajo.
+ Autor para correspondencia: ramirez.milagros@inifap.gob.mx

Área del Conocimiento: Agropecuaria

ABSTRACT
Planting date and cultivars are two important factors obtain optimum yield pest and disease scape and for good grain quality of chickpea. With the purpose of estimate the effects of three planting dates in yield, size and percent of exportation grain, three cultivars of chickpea were established in a field trial that was carried out in the central and northern Sinaloa region during the 2013-2014 season. The experiment design consisted design based on a split plot with randomized complete block with three replications on three planting dates (october 15, november 15 and december 15) and three cultivars of chickpea (Blanco Sinaloa 92, Blanoro and Jumbo2010). The results showed significant effects between cultivars and planting dates for all variables measured. The highest grain yield was obtained planting on october compared with december which was strongly affected by environmental conditions and the presence of disease. The maximum grain yield (2,373 kg/ha $^{-1}$) was registered with Blanco Sinaloa-92 sowed in october 15.

Keywords: Chickpea, sowing time, growth, yield.

RESUMEN
La selección de una variedad y la fecha de siembra son dos factores importantes para la obtención de óptimos rendimientos, el escape a enfermedades y plagas, así como para lograr una buena calidad de grano. Con el fin de estimar los efectos de las tres fechas de siembra en rendimiento, calibre y porciento de exportación, tres variedades de garbanzo blanco se establecieron en un experimento de campo que llevó a cabo en la región centro y norte de Sinaloa durante el ciclo 2013-2014. El experimento fue diseñado en parcelas divididas con arreglo de bloques completos al azar con tres repeticiones, tres fechas de siembra (15 de octubre, 15 de noviembre y 15 de diciembre) y tres variedades de garbanzo (Blanco Sinaloa 92, Jumbo 2010 y Blanoro) como tratamientos. Los resultados mostraron diferencias significativas entre las variedades y fechas de siembra en todas las variables ($P<0.05$). El mayor rendimiento de grano se obtuvo en la siembra de octubre, en comparación con la de diciembre que se vio fuertemente afectada por las condiciones ambientales y la tolerancia de las variedades a la presencia de enfermedades. El rendimiento de grano máximo (2,373 kg/ha $^{-1}$) se registró con BS-92 sembrado en 15 de octubre.

Palabras Clave*:* Garbanzo, época de siembra, crecimiento, rendimiento.

INTRODUCCIÓN

El garbanzo (*Cicer arietinum* L.) es uno de los cultivos más importantes en el noroeste de México, su grano constituye un producto de lata importancia económica por ser un generador de divisas, ya que por su calidad tiene una alta demanda y precio internacional. Además de su alto aporte nutritivo, esta leguminosa requiere cantidades mínimas de fertilizante nitrogenado y bajos niveles de agua. La superficie de siembra de este cultivo se incrementa año con año, pero aunado a estos incrementos también se incrementan los problemas que afectan los niveles de productividad, calidad y consecuentemente la competitividad del cultivo [1]. En el ciclo de cultivo otoño-invierno 2013-2014, de acuerdo al Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), se sembraron en Sinaloa 50,466 ha con un rendimiento promedio de 1.8 ton/ha [2].

El rendimiento de grano de garbanzo ha sido variable, debido a factores bióticos y las restricciones abióticas [3]. Los factores abióticos incluyen la precipitación, la temperatura el pH y el tipo de suelo [4]. Las enfermedades fúngicas causadas por hongos, han llevado a una reducción de la superficie sembrada. Recientes. En el noroeste de México, existen dos programas de mejoramiento genético de garbanzo del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Uno para Sinaloa y otro para Sonora con las sedes en Culiacán y Hermosillo, respectivamente. La existencia de estos dos programas diferentes se justifica debido a que los ambientes de producción son distintos. Estos programas han liberado distintas variedades de garbanzo con variadas características fenológicas y agronómicas que las destacan [5,6,7]. Los factores ambientales que determinan la fecha óptima de siembra son el patrón de la disponibilidad de humedad durante el crecimiento de las plantas, la temperatura y el fotoperiodo [8]. Sobre la base de la investigación llevada a cabo en la región del noroeste de México, la fecha de siembra se ha identificado como un factor importante la cual afecta el rendimiento de grano [9] así como también la incidencia de enfermedades [10].

La fecha de siembra y la variedad son dos factores importantes que afectan el rendimiento de los cultivos tales como el garbanzo. El paso más importante para maximizar el rendimiento de garbanzo es asegurar que la fenología del cultivo esté bien adaptada a los recursos y las limitaciones del entorno de producción. Tradicionalmente, el garbanzo se siembra en otoño para evitar enfermedades de raíz y daño por heladas [11]. Un método para aumentar el rendimiento en garbanzo sería optimizar el periodo de siembra mediante el uso de materiales de reproducción disponibles resistentes a los factores bióticos y abióticos anteriormente mencionados [12]. El objetivo del presente estudio fue conocer el efecto de tres fechas de siembra sobre el desarrollo de tres genotipos de garbanzo en Culiacán y Angostura, Sinaloa para seleccionar la o las fechas en la que se obtengan mejores rendimientos.

METODOLOGÍA

El estudio se estableció en el ciclo otoño-invierno de 2013/2014 en el Campo Experimental del Valle de Culiacán (CEVACU) del INIFAP y en el Campo Experimental del Centro de Bachillerato Tecnológico Agropecuario (CBTA) N.° 116 ubicado en el Ejido Palmitas, municipio de Angostura, Sinaloa. Las variedades evaluadas (12 plantas por metro lineal): fueron Jumbo 2010, Blanoro y como testigo Blanco Sinaloa-92 estas fueron sembradas los días 15 de octubre, 15 de noviembre y 15 de diciembre. El diseño estadístico utilizado fue en parcelas divididas, en un arreglo de bloques completos al azar, considerando las fechas de siembra como factor A y variedades como factor B. La parcela experimental estuvo compuesta de 4 surcos de 6 m de longitud y 0.8 m de ancho, siendo la parcela útil los 2 surcos centrales de 4 m de longitud. Se realizó la aplicación de herbicida Treflan EC a dosis de 2.4 L/ha $^{-1}$ para el control

de maleza de hoja ancha y angosta y se efectuó una fertilización en dosis de 100-50 (de nitrógeno y fosforo en kg/ha $^{-1}$).

Se estimó por triplicado el peso, en muestras de 100 granos tomadas a partir de 1000 granos seleccionadas al azar y a juzgados a (kg/ha^{-1}), el calibre se determinó en muestras de 30 g de grano y el porcentaje de exportación se calculó a partir de 1 kg de granos pasados por cribas con orificios de 9 mm. Los datos fueron sometidos mediante análisis de varianza de una vía y comparación de medias por la Diferencia Mínima Significativa (DMS) para establecer las diferencias entre tratamientos. Se empleó el paquete computacional Statgraphics Plus Versión 5.1 de acuerdo a métodos señalados por Montgomery 2005 [13].

RESULTADOS

El efecto de la fecha de siembra sobre el rendimiento del grano fue significativo, el máximo rendimiento se registró en la fecha del 15 de octubre con 2,373 kg/ha $^{-1}$ contrario a la siembra del 15 de diciembre en la cual se observó un rendimiento de 624 kg/ha $^{-1}$. (Tabla 1). En estudios de rendimiento y calidad de grano de variedades de garbanzo en cuatro fechas de siembra establecidas en Hermosillo, Sonora se encontró que las fechas que mostraron mejor rendimiento fueron el 30 de noviembre [12].

Otros estudios de evaluación de rendimiento, características agronómicas y calidad de grano de líneas élite de garbanzo del programa de mejoramiento genético del INIFAP en las localidades de Culiacán y Angostura mostraron que la variedad Blanco Sinaloa 92 obtuvo un rendimiento de 1,930 kg/ha $^{-1}$, Jumbo 2010 1,689 kg/ha $^{-1}$ y Blanoro 1,874 kg/ha $^{-1}$, en la localidad de Culiacán, Blanco Sinaloa 92 de 1,556 kg/ha $^{-1}$, Jumbo 2010 1,648 kg/ha $^{-1}$ y Blanoro 1,529 kg/ha $^{-1}$, en la localidad de Angostura, sembradas en 20 de noviembre [15]. La variedad Blanco Sinaloa 92 alcanzo el mayor promedio con un rendimiento de (1,627 kg/ha $^{-1}$) en las dos localidades evaluadas mientras que la variedad Jumbo 2010 el menor promedio de (1,358 kg/ha $^{-1}$), rendimientos mayores comparados con este estudio.

Tabla 1. Medias de rendimiento de grano de variedades de garbanzo según fecha de siembra en dos localidades de Sinaloa

Localidades	Rendimiento de grano (kg / ha $^{-1}$)								
	15 de octubre			15 de noviembre			15 de diciembre		
	BS-92	Jumbo 2010	Blanoro	BS-92	Jumbo 2010	Blanoro	BS-92	Jumbo 2010	Blanoro
Culiacán	1544 b	1351 b	1499 a	1886 a	1676 a	1661 a	1697 a	1515 a	1512 a
Angostura	2373 a	1645 a	1835 a	1617 a	1337 b	1329 b	644 b	624 b	713 b

Las medias se separaron por columnas aplicando la prueba de Diferencia Mínima Significativa (DMS). Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

El calibre de grano de las tres variedades de garbanzo, sembradas en dos localidades, varió de 36 a 47 (Tabla 2). Los granos sembrados en las localidades de Culiacán presentaron el menor ($p \leq 0.5$) y Angostura el mayor ($p \leq 0.5$) para calibre, respectivamente. Esto significa que los granos cultivados en la segunda localidad fueron los de menor tamaño ya que necesitaron alrededor de 47 granos para alcanzar

30 gramos de peso. Los resultados obtenidos para esta variable concuerdan con los obtenidos en otros estudios [15] que reporta un calibre promedio de 43 para Culiacán y 58 para Angostura en genotipos evaluados en tres localidades de Sinaloa, siendo Jumbo 2010 con un calibre de 37 para Culiacán y 40 para Angostura. La variedad con mejor calibre lo obtuvo Jumbo 2010 con 36 en ambas localidades en la fecha del 15 de noviembre.

Se observaron diferencias significativas ($p \leq 0.5$) en cuanto al calibre de grano de garbanzo en fechas establecidas en Hermosillo, el mejor calibre se obtuvo en la fechas del 10 de noviembre con 40 granos/30 g en promedio para las variedades evaluadas [14]. La variación en tamaño de la semilla se ha asociado con un patrón geográfico [14] y a los diferentes componentes de la aptitud de las plántulas y las plantas adultas en el crecimiento y desarrollo del área foliar [17].

Tabla 2. Promedios de calibre de grano de variedades de garbanzo por fecha de siembra en dos localidades de Sinaloa

Localidades	Calibre de grano (número de semillas / 30g)								
	15 de octubre			15 de noviembre			15 de diciembre		
	BS-92	Jumbo 2010	Blanoro	BS-92	Jumbo 2010	Blanoro	BS-92	Jumbo 2010	Blanoro
Culiacán	40 a	37 a	38 a	44 a	36 a	40 a	46 a	39 a	43 a
Angostura	43 b	42 a	41 b	45 a	36 a	41 a	47 a	43 b	46 b

Las medias se separaron por columnas aplicando la prueba de Diferencia Mínima Significativa (DMS). Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

El porciento de exportación de los genotipos evaluados varió de 71 % a 97 %, lo cual concuerda con Manjarrez [13], quien reporta en promedio un 93 % para granos tipo kabuli sembrados en Culiacán. El menor y mayor porciento de exportación correspondió a Blanco Sinaloa 92 y Jumbo 2010 respectivamente (Tabla 3).

Tabla 3. Promedios de por ciento exportable de variedades de garbanzo por fecha de siembra en dos localidades de Sinaloa

Localidades	% de exportación (g / 100g)								
	15 de octubre			15 de noviembre			15 de diciembre		
	BS-92	Jumbo 2010	Blanoro	BS-92	Jumbo 2010	Blanoro	BS-92	Jumbo 2010	Blanoro
Culiacán	93 a	94 a	94 a	93 a	97 a	97 a	82 a	95 a	93 a
Angostura	93 a	95 a	88 a	90 b	96 a	94 b	71 b	88 b	82 b

Las medias se separaron por columnas aplicando la prueba de Diferencia Mínima Significativa (DMS). Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes ($p< 0.05$).

CONCLUSIONES

El presente estudio confirma resultados anteriores donde se hace mención que para una mejoraba en la productividad del garbanzo se recomienda establecer el cultivo el 15 de noviembre, con lo cual concordamos, esto para la localidad de Culiacán; así como también se muestran diferencias para este mismo parámetro ya que los datos arrojados por la presente investigación indican como fecha óptima el 15 de octubre tanto en comparación con las fechas como para variedades.

Las siembras de octubre y noviembre son las que muestran mayor rendimiento de grano debido a que las siembras establecidas más tarde (finales de diciembre) presentan un decremento en rendimiento, ya que la incidencia de plagas y enfermedades aumenta, esto en respuesta a que las fechas establecidas en este periodo están expuestas a las condiciones invernales extremas en cuanto a alta humedad relativa que se presenta durante enero y febrero(periodo de floración y formación de cápsulas), factores que propician el desarrollo de mildiu (*Peronospora ciceris*) y reduce potencialmente el rendimiento y calidad del producto.

Lo anterior es lo que explica el grado de superioridad de rendimiento de semilla en la siembra de octubre sobre la de diciembre para la localidad de Angostura esto para todas las variedades, debido a que fue fuertemente influenciado por las condiciones climáticas y la incidencia de mildiu para esta zona. Lo cual hace evidente que existen diferencias significativas en la fecha de la siembra óptima entre el centro y norte.

REFERENCIAS

[1] Martínez-Díaz, G. (2014). "*Presentación*", en Memoria del II simposio nacional de garbanzo. INIFAP-CIRNO, Campo Experimental Costa de Hermosillo. Memoria técnica No. 35.

[2] SIAP. 2014. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Secretaria de Agricultura y Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación. SAGARPA. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. http//www.siap.gob.mx. Consultado junio del 2014.

[3] Knights, E.J., Siddique, K.H.M. (2002a) "Chickpea status and production constraints in Australia", in Integrated management of botrytis grey mould of chickpea in Bangladesh and Australia. Summary Proceedings of a Project Inception Workshop, Bangladesh Agricultural Research Institute, Joydebpur, Gazipur, Bangladesh. (Bakr, M.A., Siddique, K.H.M. Johansen, C. Eds). 33–41.

[4] Croser, J.S., Clarke, H.J., Siddique, K.H.M., Khan, T.N. (2003) Lowtemperature stress: Implications for chickpea (Cicer arietinum L.) improvement. Critical Reviews in Plant Sciences (22): 185–219.

[5] Ortega-Murrieta, P.F., Manjarrez-Sandoval, P., Fierros-Leyva, G.A., Salinas-Pérez, R.A., Padilla-Valenzuela, I., Gutiérres-Pérez, E., Castillo-Torres, N. (2013). Blanoro: Nueva variedad de garbanzo blanco para exportación. INIFAP-CIRNO, Campo Experimental Costa de Hermosillo. Folleto técnica No. 45.

[6] Valenzuela-Herrera, V., Fierros-Leyva, G.A., Ortega-Murrieta, P.F., Padilla-Valenzuela, I., Ramírez-Soto, M., Acosta-Gallegos, J.A., Gutiérres-Pérez, E., Velarde-Felix, S. (2014). Jumbo 2010 Nueva variedad de garbanzo blanco de exportación para el estado de Sinaloa. INIFAP-CIRNO, Campo Experimental Valle de Culiacán. Folleto técnico No. 60.

[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". (2006), in Primer Encuentro Regional de Integrantes del Sistema Producto Garbanzo en Sinaloa. (Pérez, V.J.J. y Avilés, G.M.C, Eds). INIFAP-CIRNO, Campo Experimental Valle de Culiacán, Memoria Num. 1, Primera Edición, Culiacán Sinaloa, 4-14.

[8] Saxena, M.C. (1987). "Agronomy of chickpea", in The Chickpea. (Saxena M.C., Singh K.B. Eds.). Wallingford: CAB International, 207-232.

[9] Saxena, M.C. (1990) "Problems and potential of chickpea production in the nineties", Iin Chickpeas in the Nineties: Proceedings of the Second International Workshop on Chickpea Improvement. (Van Rheenan, H.A., Saxena, M.C. Eds.). 13–25.

[10] Karki, P.B., Tiwari, K.R., Singh, O., Bharati, M.P. (1989) Effect of sowing date on the incidence of botrytis gray mold in chickpea. International Chickpea Newsletter (21): 21–23.

[11] Ozdemir, S., Karadavut, U. (2003). Comparison of the performance of autumn and spring sowing of chickpeas in a temperate region. Turkish Journal of Agriculture and Forestry (27): 345-352.

[12] Hawtin, G.G., Singh, K.B. (1984). "Prospect and potential of winter sowing of chickpea in Mediterranean region", in: Ascochyta blight and winter sowing of chickpea (Saxena, M.C., Singh K.B. Eds.). The Netherlands, 7-16.

[13] Montgomery, D. (2005). Diseño y análisis de experimentos. 2 da ed., Limusa Willey, 100-102.

[14] Fierros-Leyva, G.A., Ortega-Murrieta, P.F., Acosta-Gallegos, J.A., Padilla-Valenzuela, I., Valenzuela-Herrera, V., Gutiérres-Pérez, E., Rodríguez-Cota, F.G. (2014). "Efecto de la fecha de siembra en rendimiento y calidad de grano de garbanzo (Cicer arietinum L.) tipo kabuli", en memoria del XVII Congreso internacional de ciencias agrícolas. Universidad Autónoma de Baja California, México, 484-489.

[15] Manjarrez-Sandoval, P., Salinas-Pérez, R.A., Ramírez-Soto, M., Gómez-Gómez, L. (2011). Avances de investigación 2010 del CEVACU. INIFAP-CIRNO, Campo Experimental Valle de Culiacán. Publicación especial No. 13.

[16] Upadhyaya, H.D. (2003). Geographical patterns of variation for morphological and agronomic characteristics in the chickpea germplasm collection. Euphytica (132): 343–352.

[17] Narayanan, A., Saxena, N.P., Sheldrake, A.R. (1981). Varietal differences in seed size and seedling growth of pigeonpea and chickpea. Indian J Agric Sci (51): 389–393

EVALUATION OF EXPERIMENTAL CROSSES DOUBLE HAPLOID LINES CORN HIGH OIL IN NORTHERN SINALOA

(Evaluación de cruzas experimentales de líneas doble haploides de maíz con alto contenido de aceite en el norte de Sinaloa)

Luis Peinado Fuentes *[a], Genny Llaven Valencia [a], Ricardo Preciado Ortiz [b], Alberto Borbón Gracia [a]

[a] INIFAP – Campo Experimental Valle del Fuerte, Guasave, Sinaloa, México.
[b] INIFAP – Campo Experimental del Bajío, Celaya, Guanajuato, México.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: peinado.luis@inifap.gob.mx

Área del Conocimiento: Agropecuaria

ABSTRACT
The maize breeding is based on the exploitation of heterosis or hybrid vigor, a phenomenon that occurs primarily when two fully homozygous lines intersect and the resulting hybrid has a greater agronomic value than expected. The double haploid (DH) technology in maize breeding is based on in vivo induction of haploid; it is recognized worldwide as an important means to increase the efficiency improvement. Therefore, the DH lines have high oil content possible the production of hybrid high in oil. Corn grain is a vital reservoir of renewable energy, which every day will increase the extraordinary diversity of uses in human and animal food products and numerous industries and tortilla dough, masa flour, pharmaceutical, cosmetics, biodegradable plastics and among many oil and its derivatives remain a viable producer of corn market. In this paper the evaluations of experimental crosses of maize lines obtained by the technology of "haploid duplicates" high oil white and yellow corn in “Campo Experimental Valle del Fuerte” of INIFAP during the agronomical cycle autumn – winter 2014 – 2015, where experimental crosses were handled the technical guide agronomical based. It was observed by statistical analysis with software InfoStat v3.0 the most outstanding experimental crosses were those that had a per-se performance at certain intervals ranging from 13,090.48 tons ha^{-1} to 15,470.57 tons ha^{-1} for white maize and 11,083.14 tons ha^{-1} to 17,411.79 tons ha^{-1} for yellow corn, performed well in the northern region of Sinaloa, with a subtropical climate.

Keywords: Improvement, hybridization, double haploid and performance.

RESUMEN
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. 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. Por lo tanto, al tener líneas DH con alto contenido de aceite es posible la producción de híbridos con alto contenido de aceite. 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 de maíz. En el presente trabajo se muestran las evaluaciones de cruzas experimentales de líneas de maíz obtenidas mediante la tecnología de "haploide duplicados" con alto contenido de aceite de maíz blanco y amarillo en Campo Experimental Valle del Fuerte durante el ciclo otoño – invierno 2014 – 2015, las cruzas experimentales se manejaron mediante la guía técnica de maíz del INIFAP. El análisis estadístico se realizó con el software InfoStat V3.0. Las cruzas experimentales más destacadas fueron los que tuvieron un rendimiento per-se desde 13,090.48 ton ha^{-1} a 15,470.57 ton ha^{-1} de maíz blanco y 11,083.14 ton ha^{-1} a 17,411.79 ton ha^{-1} de maíz amarillo, finalmente ambos maíces mostraron un buen desempeño en la región del norte de Sinaloa, con un clima subtropical.

Palabras Clave: mejoramiento, hibridación, doble haploide, rendimiento

INTRODUCCION

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 homocigóticas mediante la tecnología "doble haploides" (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]. 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% [4, 5].

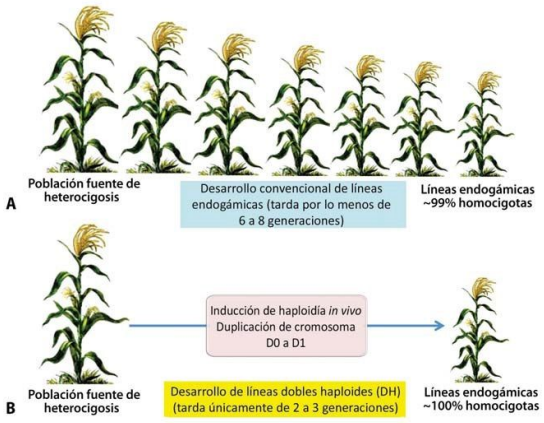


Figura 1.- Número de generaciones requeridas para obtener pureza genética (homocigosis) por medio de (A) endogamia convencional; (B) tecnología doble haploides.

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 [6]. 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 [6, 7]. 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 [8, 9]. 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 [7, 8, 9]. Por todo lo anterior En el presente trabajo se muestran las evaluaciones de cruzas experimentales de líneas de maíz obtenidas mediante la tecnología de "haploide duplicados" con alto contenido de aceite de maíz blanco y amarillo en Campo Experimental Valle del Fuerte durante el ciclo otoño – invierno 2014 – 2015.

MÉTODOS

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. **Validación de cruzas experimentales:** Las cruzas experimentales formadas durante el ciclo OI 2013 – 2014 en el CEBAJ se evaluaron en el Campo Experimental Valle del Fuerte (CEVAF), 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. **Diseño experimental y análisis**

estadístico: Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con dos 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

El análisis de varianza de las cruzas experimentales de líneas doble haploide de maíz blanco y amarillo, se presenta en la Tabla 1 con diferencias altamente significativas para la fuente de variación (CRUZAS). Las diferencias se atribuyen en el rendimiento de las cruzas experimentales de maíz blanco (REND-W) y amarillo (REND-Y) evaluadas.

Tabla 1. Significancia de cuadrado medio para rendimiento de grano de cruzas experimentales de líneas doble haploide de maíz amarillo

FV	GL	REND-W (Ton/Ha)	REND-Y (Ton/Ha)
REP	2	10103.7	9496.3
CRUZAS	99	14878999.05 **	11217875.80**
EE	100	1919890.12	1512693.68
CV		13.71	12.95

*Significativo al 0.05

Se observaron las cruzas experimentales más sobresalientes fueron las que presentaron un rendimiento per-se con una frecuencia relativa que osciló de los 13, 090.48 tn ha^{-1} a 15, 470.57 tn ha^{-1} (Figura 2) para maíz blanco; mientras que para maíz amarillo las cruzas experimentales más sobresalientes se encuentran en las frecuencias relativas de 11, 083.14 tn ha^{-1} a 17, 411.79 tn ha^{-1}. Estos rendimientos son superiores considerando que son cruzas experimentales, pero con un rango de adaptación amplio para el norte de Sinaloa.

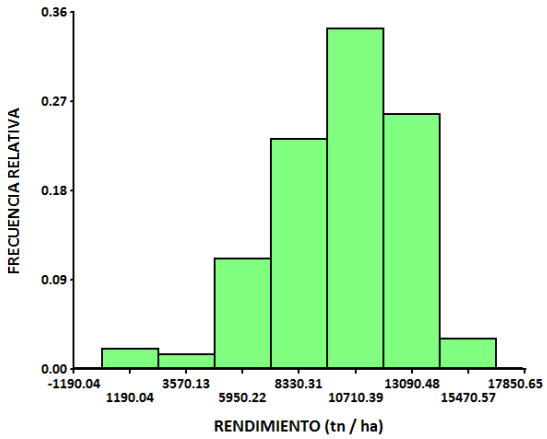


Figura 2. Frecuencia relativa del rendimiento de grano de cruzas experimentales de líneas doble haploide de maíz blanco

Las cruzas experimentales doble haploides de maíz blanco con mayor rendimiento respecto a los mejores testigos comerciales para el norte de Sinaloa se presentan en la Tabla 2 junto con su genealogía. En relación a las cruzas experimentales de maíz amarillo se presentan en la Tabla 3 junto con su genealogía, sin embargo, los testigos comerciales utilizados fueron de maíz blanco.

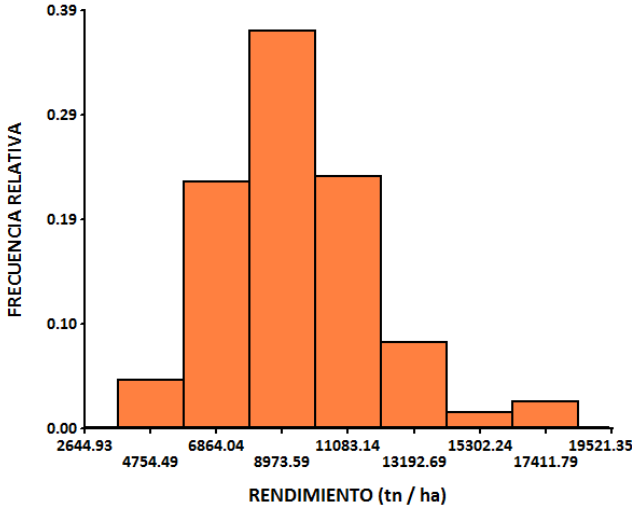


Figura 3. Frecuencia relativa del rendimiento de grano de cruzas experimentales de líneas doble haploide de maíz amarillo

Tabla 2. Cruzas experimentales de líneas doble haploide de maíz blanco más sobresalientes respecto a los testigos comerciales en el norte de Sinaloa

CRUZAS DH	GENEALOGIA	REND-Y (Ton/ha)
92	testigo local 4	17,965.96
38	testigo local 3	17,431.29
7	testigo local 2	16,089.30
69	testigo local 1	15,881.29
94	227x223	13,516.21
54	228x217	13,414.22
64	227x226	13,068.69
35	2x7	12,886.40
98	4x7	12,281.51
73	2x4	12,110.01
96	2x6	11,992.73
70	3x6	11,705.31
18	3x4	11,556.06
PROMEDIO		13,838.38
DMS 0.05		308.73
CV		2,227.57

Tabla 3. Cruzas experimentales de líneas doble haploide de maíz amarillo más sobresalientes respecto a los testigos comerciales en el norte de Sinaloa

CRUZAS DH	GENEALOGIA	REND-W (Ton/ha)
38	testigo local 3	15,202.89
26	1767x1758	14,571.19
70	1758x1761	14,218.98
7	testigo local 2	14,143.69
40	1757x1764	13,893.60
90	1757x1767	13,745.41
93	1767x1760	13,487.08
77	1761x1767	13,319.93
79	1762x1761	13,309.62
59	1761x1757	13,255.17
51	1767x1761	13,138.34
53	1762x1759	13,097.38
56	1758x1767	13,035.61
PROMEDIO		13,724.53
DMS 0.05		91.02
CV		656.74

DISCUSIÓN

La respuesta de una combinación híbrida (cruzamiento) es consecuencia de la heterosis y 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 (Falconer, 1986). Para explicar los resultados obtenidos, se debe tener en cuenta la constitución genética de cada uno de las cruzas experimentales que se evaluaron en este estudio. Según el análisis estadístico las cruzas experimentales 1767x1758 y 1758x1761 de maíz blanco, mostraron el mayor rendimiento con respecto al testigo local 3, con rendimiento de 14,571.19 tn ha^{-1} y 12,218.98 tn ha^{-1}, respectivamente. Sin embargo todas las demás cruzas experimentales de maíz blanco por debajo del testigo local 2, con rendimientos de 13,035.61 tn ha^{-1} a 13,893.60 tn ha^{-1}, no hubo diferencia significativa entre ellas.

En relación a las cruzas experimentales de maíz amarillo considerando cuatro testigos locales de maíz blanco, por ser los más demandados y competitivos en la zona del norte de Sinaloa, en base al análisis estadístico los rendimientos de las cruzas 94, 54, 64, 35, y 98 mostraron el mayor rendimiento respecto a los testigos locales con un 84.0%, 83.4%, 81.2%, 80.1% y 76.3%, respectivamente.

CONCLUSIONES

- En el norte de Sinaloa las cruzas que mostraron un rendimiento sobresaliente según el análisis estadístico fueron 13 cruzas de maíz blanco con un rendimiento promedio de 13,724.53 tn ha^{-1} y 9 cruzas de maíz amarillo con un rendimiento promedio de 13,838.38 tn ha^{-1}.

- Los materiales evaluados de maíz blanco como de maíz amarillo mostraron un buen comportamiento en la región del norte de Sinaloa, siendo un clima subtropical, de acuerdo al rendimiento de grano y otras características agronómicas, lo que indica que el potencial de rendimiento de las cruzas son altamente competitivos con los testigos comerciales de mayor demanda.
- 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] Gao, S., Martinez, C., Skinner, D. J., Krivanek, A. F., Crouch, J. H., Xu, Y. (2008). "Development of a seed DNA-based genotyping system for marker-assisted selection in maize", Molecular Breeding, 22(3): 477-494.
[2] Falconer, D. S. (1986). Introducción a la genética cuantitativa (8 ed). México, D.F.: Ed. CECSA, 430.
[3] Bordes J., Charmet, R., Dumas de Vaulx, M., Pollacsek, M., Beckert, A., Gallais A. (2007). "Doubled haploid versus single-seed descent and S1-family variation for testcross performance in a maize population", Euphytica, 154: 41-51.
[4] Prasanna, B. M., Chaikam, V., & Mahuku, G. (2013). Tecnologia de dobles haploides en el mejoramiento de maiz: teoria y práctica. CIMMYT.
[5] Guillen, P., De la Cruz, E., Castañón, G., Osorio, R., Brito, P., Lozano, A., López, U. (2009). "Aptitud combinatoria general y específica de germoplasma tropical de maíz", Tropical and Subtropical Agroecosystems, 10(1): 101-107.
[6] Poneleit, G., Bauman, L. (1970). "Diallel analysis of fatty acids in corn oil", Crop Sci., 10: 338-341.
[7] AACC. (1987). Corn Chemistry and Technology. (1 ed). St. Paul, Minn., USA.: American Association of Cereal Chemists, 315.
[8] De la Rosa, A., De León, H., Rincón F., Martínez, G. (2006). "Efectos genéticos, heterósis y diversidad genética entre híbridos comerciales de maíz adaptados al bajío mexicano", Rev. Fitot. Mex., 29(3): 247-254.
[9] Andrae, G., Hunt, W., Duckett, K., Kennington, R., Feng, P., Owens, N., Soderlund, S. (2000). "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.
[10] Balzarini M. G., González L., Tablada M., Casanoves F., Di Rienzo J.A., Robledo C.W. (2008). Infostat. Manual del Usuario (1 ed.). Córdoba, Argentina.: Editorial Brujas, 350.

MYCORRHIZAL AND ORGANIC MATTER IN PROMOTING PLANT GROWTH AXIHUITL UNDER GREENHOUSE

(Micorrización y materia orgánica en la promoción del crecimiento vegetal del axihuitl bajo condiciones de invernadero)

Susana García-Téllez[a,b], Gabriel Rincón-Enríquez[a], LuísLópez-Pérez[b], Evangelina Esmeralda Quiñones-Aguilar[a]*+

[a] Biotecnología Vegetal del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A. C.
[b] Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: equinones@ciatej.mx.

Área del Conocimiento: Agropecuaria.

ABSTRACT
Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) are obligate symbiotic microorganisms associated with the roots of plants, they provide certain benefits such as better uptake of water and nutrients, tolerance to drought, salt, heavy metals stress etc. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of different commercial AMF inoculum and organic matter on plant growth axihuitl (*Eupatorium aschembornianum* Sch.) plants. Under greenhouse conditions, one experiment was established: a commercial inoculum (*Rhizophagus intraradices* = Ri) and vermicompost two levels (0 and 5%, v / v). In axihuitl plants treated and not treated with AMF, growth variables were measured: plant height, stem diameter, number of leaves, leaf area, root length and volume, total fresh and dry weights. The roots for observation and counting stained fungal structures of AMF. The results of experiment showed that treatment without AMF inoculum but with 5% of vermicompost (organic matter) showed the greatest plant growth; so that growth axihuitl treatment with organic matter and HMA was significantly lower (P≤0.05). This suggests a possible negative interaction between organic matter and the AMF.
Keywords: Arbuculares mycorrhizal fungi, plant growth promoters, *Eupatorium aschembornianum* Sch, medicinal plant.

RESUMEN
Los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) son microorganismos simbióticos obligados asociados a las raíces de las plantas, estos hongos ofrecen ciertos beneficios tales como una mejor absorción de agua y nutrientes, la tolerancia a la sequía, a la sal, al estrés por metales pesados, etc. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de un inóculo comercial de HMA y de materia orgánica en el crecimiento de plantas de axihuitl (*Eupatorium aschembornianum* Sch.). En condiciones de invernadero, se estableció un experimento: un inóculo comercial de HMA (*Rhizophagus intraradices* = Ri) y dos niveles de vermicompost (0 y 5%, v/v). En las plantas de axihuitl tratadas y no tratadas con HMA se midieron variables de crecimiento: altura de planta, diámetro de tallo, número de hojas, área foliar, longitud y volumen radical, así como peso fresco y seco total. Las raíces se observaron y cuantificó estructuras fúngicas de HMA. Los resultados del experimento mostraron que el tratamiento sin inóculo

de HMA pero con 5% de vermicomposta (materia orgánica) mostro el mayor crecimiento vegetal, por lo que, el crecimiento del axihuitl en el tratamiento con materia orgánica y HMA fue significativamente ($P \leq 0.05$) menor. Esto sugiere una posible interacción negativa entre la materia orgánica y el HMA.
Palabras Clave: Hongos micorrizicos arbuculares, promotores de crecimiento vegetal, *Eupatorium aschembornianum* Sch, planta medicinal.

INTRODUCCIÓN

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) son organismos del suelo que se asocian mutualistamente a las raíces de la gran mayoría de las plantas terrestres y les proporcionan ciertos beneficios como: tolerancia a estrés hídrico, salino, mejor captación de nutrimentos, tolerancia a metales pesados, protección contra patógenos, entre otras [1]. Particularmente la promoción del crecimiento vegetal se ha estudiado en distintas especies vegetales de importancia agrícola, sin embargo en especies toleradas como lo es el axihuitl (*Eupatorium aschembornianum* Sch), la cual pertenece a la familia *Asteraceae* (*Compositae*), es una planta silvestre, también conocida como hierba de agua. Morfológicamente, tiene abundantes hojas con forma de corazón, la planta tiene tallos gruesos y áspero al tocarlo, con manchas pequeñas en todo su alrededor. Se le puede encontrar fácilmente en la época de lluvias y su periodo de floración ocurre entre los meses de noviembre a febrero en Tepoztlán Morelos México [2], en este lugar el axihuitl es utilizado en forma de extractos como planta medicinal para la cicatrización de heridas, problemas gastrointestinales como úlceras y para aliviar problemas musculares. Sin embargo en la búsqueda para mejorar el rendimiento y la calidad de material vegetal se debe hacer énfasis en el desarrollo de nuevas técnicas, que no sean un obstáculo en la explotación de los extractos vegetales [1]. Tales técnicas, pueden incluir el uso de microorganismos benéficos para el suelo y que además estimulen el crecimiento de las plantas e influyan [3]. Por este motivo y considerando que los HMA pueden estimular el crecimiento vegetal, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de un inóculo comercial de hongos micorrízicos arbusculares (a base de *Rhizophagus intraradices*) y diferentes niveles de materia orgánica sobre el crecimiento de las plantas de axihuitl.

METODOLOGÍA

Se estableció un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial. El factor materia orgánica (MO): con y sin vermicomposta comercial (Vermizula). HMA: con y sin inóculo comercial monoespecífico (Inifap®), compuesto de hongos micorrízicos arbusculares de la especie *Rhizophagus intraradices* (Ri). La combinación de los niveles de los factores de estudio conformo 4 tratamientos: 1. Sin Ri+0% MO. 2. Sin Ri+5% MO. 3. Con Ri+0% MO. 4. Con Ri+5%MO. Cada tratamiento tuvo 5 repeticiones y la unidad experimental estuvo conformada por una maceta de 500 g de arena esterilizada (120°C durante tres horas tres días consecutivos). Se inocularon 80 esporas de HMA en los tratamientos donde se inocularon a la plantas. Las plantas de axihuitl empleadas se obtuvieron a partir de semillas germinadas en el laboratorio y se inocularon con los HMA cuando tenían las primeras dos hojas verdaderas y una altura aproximada de 2 cm. El experimento se mantuvo en condiciones de invernadero bajo una malla sombra con apertura 80-20 ubicado en la UMSNH. El experimento fue evaluado por un periodo de 180 días. Las variables evaluadas periódicamente fueron altura de planta, diámetro de tallo y numero de hojas. Al final del experimento se registraron datos de longitud de raíz, volumen radical, área foliar, pesos fresco y seco y porcentaje de colonización micorrizica [4, 5]. Los datos experimentales fueron analizados estadísticamente mediante análisis de varianza y prueba múltiple de comparación de media Tukey a un nivel de significancia del 5% ($P \leq 0.05$) empleando el programa Statgraphics Centurión XV.

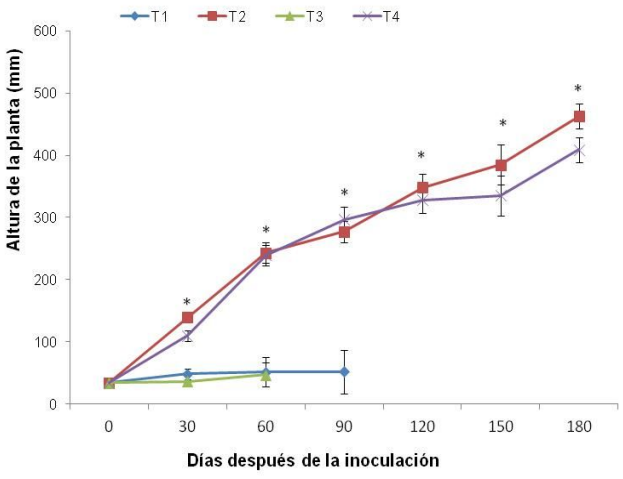
RESULTADOS

Durante los 180 días que permanecieron las plantas de axihuitl en condiciones de invernadero, los tratamientos a los que no se adicionó vermicomposta las plantas (T1 y T3) solo sobrevivieron entre 60 y 90 días (Figura 1), por lo cual al final del experimento no fue posible evaluar su crecimiento, independientemente que estuvieran inoculados o no con HMA. Esto sugiere que la MO tiene un papel preponderante en el crecimiento de esta especie vegetal silvestre.



Figura 1.- Efecto de la materia orgánica sobre el crecimiento de axihuitl a los 80 días después de establecido el experimento bajo condiciones de invernadero.

Los tratamientos a los que se adicionó vermicomposta (T2 y T4) sobrevivieron hasta el final del experimento (180 días después de establecido). Los dos tratamientos con vermicomposta, uno con y otro sin *R. intraradices*, no presentaron diferencias estadísticamente significativas, tanto en la variable de crecimiento de altura de la planta, como en el diámetro del tallo (Figura 2). La similitud estadística en cuanto a estas variables de crecimiento pudo deberse a que el tiempo de permanencia de los tratamientos que estuvieron inoculados con el HMA no fue suficiente para que se observará el efecto de los HMA, puesto que en otros estudios, este efecto se ha observado después de los seis meses de inoculación, donde se ha presentado hasta un 85% de colonización de HMA [3]. Además, el nivel de materia orgánica (5%, v/v), para esta especie, pudo ser suficiente para su sobrevivencia, manifestándose en la disminución simbiótica del HMA en la planta, lo cual se ha observado cuando se aumenta la fertilidad en el sustrato [6]. Resultados similares fueron reportados por [7], donde la colonización de *Glomus manihotis* en la planta *Oyedeae verbesinoides* disminuyó por efecto de la fertilización con la aplicación de superfosfato triple, el cual contuvo 46% de P (375 mg kg^{-1}).



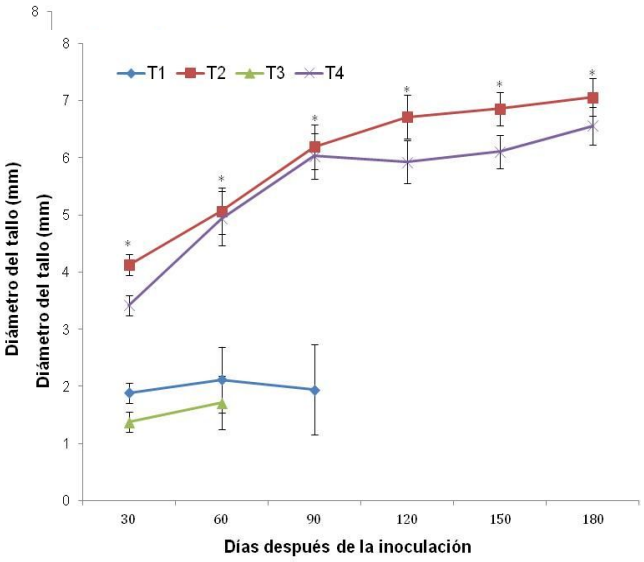


Figura 2.- Efecto de HMA y materia orgánica (vermicomposta) sobre la altura de planta y diámetro de tallo de axihuitl bajo condiciones de invernadero. T1: sin Ri+ 0% MO; T2: sin Ri+ 5% MO; T3: con Ri+0% MO; T4: con Ri+5% MO. Las barras en cada punto representan ± desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias estadísticas entre tratamientos de acuerdo un análisis de varianza a nivel de significancia (*P≤0.05*).

Por otra parte, el motivo por el cual los tratamientos a los que no se les adicionó vermicomposta y se secaron entre los 60 y 80 días pudo deberse a que la arena utilizada contenía pocos nutrimentos y puesto que el axihuitl requiere de mayor nutrición, ya que en su medio natural, estas plantas crecen en zonas que presentan suelos ricos en materia orgánica y nutrientes [8], otra posible explicación es que el sustrato pudo contener algún elemento tóxico, ya que las plantas al final del experimento presentaban necrosis en las orillas de las hojas. Síntomas similares se observaron en plantas de haba (*Vicia faba*), debido a la prolongada aplicación de cloruro de sodio (NaCl), sulfato de sodio (Na_2SO_4) y cloruro de potasio (KCl), las cuales desarrollaron síntomas de toxicidad, como manchas no cloróticas de marchitamiento local, que más tarde se volvieron puntos necróticos [9]. Respecto al número de hojas de las plantas de axihuitl a los 180 días hubo un incremento, tanto en T2 y T4, con respecto al conteo de hojas presentado a los 30, 60, 90, 120 y 150 días. T1 (sin RI ver 0%) y T3 (con RI ver 0%) durante el primero y segundo mes, presentaron diferencias estadísticamente significativas con los tratamientos T2 (sin RI ver 5%) y T4 (con RI ver 5%) (Tabla 1). Transcurrido el segundo mes, los tratamientos que sobrevivieron durante los 180 días (T2 y T4), mostraron diferencias estadísticas (Figura 3), siendo T2 el tratamiento con mayor número de hojas.

Tabla 1. Efecto de HMA y vermicomposta en el número de hojas de la planta de axihuitl bajo condiciones de invernadero.

Tratamiento	Días después de establecido el experimento					
	30	60	90	120	150	180
Sin Ri + 0% MO (T1)	0.7 b	5 b	-	-	-	-
Sin Ri + 5% MO (T2)	1.4 a	31.7 a	34.7 a	25.7 a	37.5 a	60.5 a
Con Ri + 0% MO (T3)	0.69 b	4.6 b	-	-	-	-
Con Ri + 5% MO (T4)	1.2 a	26.7 a	22.2 b	14.2 b	35.7 a	44.7 b

Ri = *R. intraradices*; MO = Materia orgánica, vermicomposta. Letras diferentes en cada columna indican diferencias estadísticas de acuerdo a Tukey (*P≤0.05*). Tratamientos sin valores no sobrevivieron las plantas de axihuitl a estas fechas.



Figura 3.- Comparación de plantas de axihuitl a los 180 días de establecido el experimento. Plantas con vermicomposta al 5%: (A) sin y (B) con HMA.

En las variables de crecimiento de longitud y volumen de raíz y biomasa fresca total, no se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos T2 (sin Ri +5% MO) y T4 (con Ri+ 5% MO), sin embargo para área foliar y peso seco total se presentaron diferencias estadísticas entre estos tratamientos (Tabla 2), siendo T2 que alcanzó el mayor peso seco. Estos resultados pueden ser un indicativo de que el factor materia orgánica pudo tener un efecto inhibitorio de los HMA y que por ello, no se presentaron diferencias estadísticas entre estos dos tratamientos. Resultados similares en cuanto al encubrimiento probable sobre el efecto de los HMA en el crecimiento de las plantas, debido al alto contenido de materia orgánica, se apreciaron en un trabajo con diferentes dosis de vermicomposta, donde la aplicación del 6% de MO en plantas de chile serrano, inoculadas con *Glomus* sp., no se encontraron diferencias significativas en el crecimiento de los chiles [10].

Tabla 2. Efecto de la materia orgánica y micorrizas en el crecimiento de las plantas de axihuitl bajo condiciones de invernadero a los 180 días después de establecido el experimento.

Tratamiento	Volumen raíz (mL)	Longitud raíz (cm)	Área foliar (cm^2)	Peso total (g)		Colonización HMA (%)
				Fresco	Seco	
T1: Sin Ri + 0% MO	-	-	-	-	-	-
T2: Sin Ri + 5% MO	19.7 a	31.1 a	141.5 a	40.0 a	8.9 b	-
T3: Con Ri+ 0% MO	-	-	-	-	-	-
T4: Con Ri +5% MO	17 a	28.1 a	114.0 b	36.9 a	7.1 a	26

HMA= Hongo micorrizico arbuscular. Ri = *R. intraradices*; MO = Materia organica, vermicomposta. Letras diferentes en cada columna indican diferencias estadísticas de acuerdo a Tukey (*P≤0.05*). Tratamientos sin valores no sobrevivieron las plantas de axihuitl a estas fechas.

El porcentaje de colonización del tratamiento con *R. intraradices* fue del 26%, porcentaje considerado relativamente bajo respecto a lo reportado en otros trabajos, donde esta especie de HMA ha presentado hasta un 90% de colonización en especies vegetales como *Catharanthus roseus* y *Echinacea purpurea* [11, 12]. Este porcentaje de colonización se presentó en un periodo menor, donde el experimento solo permaneció tres meses [11], con respecto al que se llevó a cabo en este experimento que constó de seis meses en condiciones de invernadero. Sin embargo, este porcentaje pudiera indicar

una preferencia menor de *E. aschembornianum* con esta especie de HMA [13]. Además, se conoce que la materia orgánica del suelo influye en las micorrizas arbusculares (Gryndler *et al*., 2009), como se pudo observar en la aplicación de vermicomposta e inóculos de *G. albida* en plantas de *Passiflora alata*, donde estos dos factores presentaron una interacción negativa en el crecimiento de la planta, observándose que si se aumentaban las dosis de la vermicomposta, había una disminución de los HMA, lo que probablemente se tradujo en una competencia del hongo micorrízico con la alta concentración de fosforo contenido en la vermicomposta [14].

CONCLUSIONES

La materia orgánica (vermicomposta) es el factor determinante en la promoción del crecimiento vegetal del axihuitl (*E. aschembornianum*) independientemente de si la planta está o no colonizada con micorrizas.

AGRADECIMIENTOS

Al Fondo Mixto de Fomento Científico y Tecnológico CONACYT-Gobierno del Estado de Morelos por el financiamiento del proyecto " Uso del axihuitl o hierba de agua (*Eupatorium* sp.) para control de enfermedades del nardo *Polianthes tuberosa* y cultivos ornamentales en agricultura protegida" con el número de proyecto MOR-2009-C02-120296. Susana García-Téllez, agradece a CONACYT por la beca para estudios de maestría.

REFERENCIAS

[1] Smith, S.E., D.J., Read. (2008). Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press. San Diego, U.S.A. 787 pp.

[2] Godínez, V.A.M. (2012). Efecto antimicrobiano *in vitro* de extractos de *Eupatorium aschembornianum* sobre *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. (Tesis de Licenciatura, Universidad de Guadalajara. Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías. Guadalajara, Jalisco). p. 98.

[3] Zubek, S., Stojakowska, A., Anielska, T., Turnau, K. (2010). "Arbuscular mycorrhizal fungi alter thymol derivative contents of *Inula ensifolia* L.", Mycorrhiza 20: 497-504.

[4] Phillips, J.M., Hayman, D.S. (1970). "Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection", Trans. Br. Mycol. Soc. 55: 158-160.

[5] McGonigle, T., Miller, M., Evans, D., Fairchild, G., Swan, J. (1990). "A new method wich gives and objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi", *New Phytologist* 115: 495-501.

[6] Herrera, P.R.A., Hamel, C., Fernández, F., Ferrer, R.L., Furrazola, E. (2011). "Soil-strain compatibility: the key to effective use of arbuscular mycorrhizal inoculants?", Mycorrhiza 21: 183-193.

[7] Flores, C., Cuenca, G. (2004). "Crecimiento y dependencia micorrízica de la especie pionera y polenectarífera *Oyedaea verbesinoides* (tara amarilla) *Asteraceae*", Interciencia 29(11): 632-636.

[8] Contreras, M.B.T., Boyás, J.C., Jaramillo, F. (2006). La diversidad biológica en Morelos: estudio del

Estado. Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad (CONABIO) y Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM) México. 156 pp.

[9] Slabu, C., Zörb C., Steffens, D., Schubert, S. (2009). "Is salt stress of faba bean (*Vicia faba*) caused by Na^+ or Cl^- toxicity?", J. Plant Nutr. Soil Sci.172: 644-650.

[10] Manjarrez, M.M.J., Ferrera, C.R., González, C.M.C. (1999). "Efecto de la vermicomposta y la micorriza arbuscular en el desarrollo y tasa fotosintética de chile serrano", Terra 17: 1.

[11] Araim, G., Saleem, A., Arnason, J.T., Charest, C. (2009). "Root colonization by an arbuscular mycorrizal (AM) fungus increases growth and secondary metabolism of purple coneflores *Echinacea purpurea* (L.) Moench", J. Agric. Food Chem. 57: 2255-2258.

[12] Andrade, S.A.L., Malik, S., Sawaya, A.C.H.F., Bottcher, A., Mazzafera, P. (2013). "Association with arbuscular mycorrhizal fungi influences alkaloid synthesis and accumulation in *Catharanthus roseus* and Nicotiana tabacum plants", Acta Physiology Plant 35: 867-880.

[13] Lata, H., Andrade, D.Z., Schanebery, B., Bedir, E., Khan, I., Moraes, R. (2003). "Arbuscular mycorrhizal inoculation enchances survival rates and groth of micro propagated pantlets of *Echinacea pallid",* Planta Med. 69: 679-682.

[14] Oliveira, M.S., Campos, M.A.S., Silva, F.S.B. (2014). "Arbuscular mycorrhizal fungi and vermicompost to maximize the production of foliar biomolecules in *Passiflora alata* Curtis seedlings", J Sci Food Agric. 95: 522–528.

EVALUATION OF THE REACTION OF DURUM WHEAT CULTIVARS AND LINES TO BLACK POINT, *Alternaria* sp., DURING THE CROP SEASON 2012-2013

(Evaluación de la reacción a la punta negra, *Alternaria* sp., en variedades y líneas de trigo cristalino en el ciclo 2012-13).

Guillermo Fuentes-Dávila[a+], Pedro Figueroa-López[a], Miguel Alfonso Camacho-Casas[a], Pedro Félix-Valencia[a], José Luis Félix-Fuentes[a], Gabriela Chávez-Villalba[a], Javier Ireta-Moreno[b]*

[a]INIFAP, Campo Experimental Norman E. Borlaug.
[b]INIFAP, Campo Experimental Centro-Altos de Jalisco.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: fuentes.guillermo@inifap.gob.mx

Área del Conocimiento: Agropecuaria.

ABSTRACT
Black point caused by various fungal species (*Alternaria* sp., *Fusarium* sp., and *Helminthosporium* sp. among others) is an endemic wheat disease in southern Sonora, which affects seed and flour quality. Therefore, wheat cultivars CIRNO C2008, Huatabampo Oro C2009, and twenty three advanced durum wheat lines were evaluated for resistance to black point under natural conditions at the Norman E. Borlaug Experimental Station, during the crop season fall-winter 2012-2013. The sowing dates were November 15, 22, and 29, 2012, using 8 g of seed for a 0.7 row in beds with two rows. Threshing was done by hand and the evaluation by visual inspection, counting the number of infected and healthy seed in order to determine the percentage o infection. The range of infection for the first date was 0 to 26.22%, with an average of 1.83, for the second one it was 0 to 9.22%, with an average of 1.59, and for the third 0 to 5.02% with an average of 0.66%. Lines HUBEI//3*SOOTY_9/RASCON_37/3/SOOTY_9/RASCON_37/8/ GREEN_2/HIMAN_12//SHIP_1/7/ECO/CMH76A.722//BIT/3/ALTAR84/4/AJAIA_2/5/ KJOVE_1/6/MALMUK_1/ SERRATOR_1 and CBC 509 CHILE/SOMAT_3.1//BOOMER_18/ LOTUS_4/4/SOOTY_9/RASCON_37//WODUCK/CHAM_3/3/SOMAT_3/PHAX_1//TILO_1/ LOTUS_4 did not have any infected seed in any of the three dates. Huatabampo Oro C2009 showed an average of 0.55% infection, while CIRNO C2008 2.17%.

Keywords: Black point, *Alternaria* sp., *Triticum turgidum,* Durum wheat

RESUMEN
La punta negra causada por varias especies de hongos (*Alternaria* sp., *Fusarium* sp. y *Helminthosporium* sp., entre otros), es una enfermedad endémica en el sur de Sonora, la cual afecta la calidad de la semilla y la harina; por lo que las variedades CIRNO C2008, Huatabampo Oro C2009, y 23 líneas avanzadas de trigo cristalino se evaluaron para resistencia a punta negra bajo condiciones naturales de infección durante el ciclo agrícola Otoño-Invierno 2012-2013, en el Campo Experimental Norman E. Borlaug. Las fechas de siembra fueron noviembre 15, 22 y 29, 2012, usando 8 g de semilla para un surco de 0.7 m de largo en cama de dos hileras. La infección se dio en forma natural, ya que la enfermedad es endémica en

el Valle del Yaqui. La cosecha se hizo a mano y la evaluación mediante inspección visual contando el número de granos sanos e infectados en cada espiga, sin tomar en consideración el tamaño de las lesiones. De esta forma se calculó el porcentaje de infección. El rango de infección para la primera fecha de siembra fue de 0 a 26.22%, con un promedio de 1.83, para la segunda fue de 0 a 9.22%, con un promedio de 1.59, y para la tercera fue de 0 a 5.02% con promedio de 0.66%. Las líneas HUBEI//3* SOOTY_9/RASCON_37/3/SOOTY_9/RASCON_37/8/GREEN_2/HIMAN_12//SHIP_1/7/ ECO/CMH76A.722//BIT/3/ALTAR84/4/AJAIA_2/5/KJOVE_1/6/MALMUK_1/ SERRATOR_1 y CBC 509 CHILE/SOMAT_3.1//BOOMER_18/LOTUS_4/4/SOOTY_9/RASCON_37// WODUCK/CHAM_3/3/SOMAT_3/PHAX_1//TILO_1/LOTUS_4 no presentaron semilla infectada en ninguna de las tres fechas. Huatabampo Oro C2009 presento un promedio de 0.55% mientras que CIRNO C2008 2.17%.

Palabras Clave: Punta negra, *Alternaria sp., Triticum turgidum*, Trigo cristalino

INTRODUCCIÓN

De la semilla de trigo recién cosechada se pueden aislar más de 100 especies de hongos, incluyendo especies de los géneros *Alternaria*, *Fusarium* y *Helminthosporium*. Estos hongos son importantes en áreas con alta humedad relativa pudiendo causar infección en la semilla cuando la humedad relativa del medio ambiente es superior al 90% y el de la semilla al 20%. La presencia de lluvia durante la maduración de la semilla favorece el desarrollo de la enfermedad conocida como punta negra, así como la alta humedad que puede prevalecer durante los días previos a las cosecha [4]. La semilla en desarrollo expandiéndose es la más susceptible. La semilla que presenta senescencia prematura también es más propensa a desarrollar punta negra ya que muchos de los agentes causales son saprófitos [5]. Generalmente *Alternaria alternata* y *Bipolaris sorokiniana* son considerados como agentes primarios causantes de esta enfermedad [3]. Aunque las espigas infectadas pueden tener una apariencia normal, en el interior de las glumas se pueden presentar lesiones elípticas de color café a negras. La enfermedad es más pronunciada en áreas con un color café oscuro a negro, usualmente alrededor del embrión de la semilla (Fig. 1) [3]. Infecciones severas causan decoloración y chupado de la semilla [3].



Fig. 1. Síntomas característicos de punta negra en semilla de trigo

En el sur de Sonora, México, la punta negra es una enfermedad endémica de trigo cristalino o duro y de trigo harinero, aunque su incidencia varía de un año a otro. En los programas de mejoramiento de trigo se selecciona para resistencia a enfermedades durante la evaluación de la semilla después de la cosecha, sin embargo, no existe un programa formal sobre punta negra en Sonora. El objetivo de este trabajo fue evaluar la reacción de variedades y líneas avanzadas de trigo cristalino a la punta negra durante el ciclo agrícola otoño-invierno 2012-13.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las variedades CIRNO C2008, Huatabampo Oro C2009, y 23 líneas avanzadas de trigo cristalino (Cuadro 1) producidas en el programa colaborativo CIMMYT-INIFAP, se evaluaron para resistencia a punta negra bajo condiciones naturales de infección durante el ciclo agrícola Otoño-Invierno 2012-2013, en el Campo Experimental Norman E. Borlaug perteneciente al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, ubicado en el Block 910 del Valle del Yaqui, Sonora a 27º22´3.01" N y 109º55´40.22" W en un suelo de textura arcillosa y pH de 7.8. Las fechas de siembra fueron noviembre 15, 22 y 29, 2012, usando 8 g de semilla para un surco de 0.7 m de largo en cama de dos hileras. La infección se dio en forma natural, ya que la enfermedad es endémica en el Valle del Yaqui. La cosecha se hizo a mano y la evaluación mediante inspección visual contando el número de granos sanos e infectados en cada espiga, sin tomar en consideración el tamaño de las lesiones. De esta forma se calculó el porcentaje de infección. Las líneas avanzadas y variedades que se probaron se originaron del programa colaborativo CIMMYT-INIFAP, las cuales tienen gran importancia para los productores de trigo del sur de Sonora y del noroeste de México, ya que algunas de ellas son variedades de reciente liberación y líneas candidatas a liberarse.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El rango de infección para la primera fecha de siembra fue de 0 a 26.22%, con un promedio de 1.83, para la segunda fue de 0 a 9.22%, con un promedio de 1.59, y para la tercera fue de 0 a 5.02% con promedio de 0.66% (Fig. 2). Las líneas HUBEI//3*SOOTY_9/RASCON_37/3/ SOOTY_9/RASCON_37/8/GREEN_2/HIMAN_12//SHIP_1/7/ECO/CMH76A.722//BIT/3/ ALTAR84/4/AJAIA_2/5/KJOVE_1/6/MALMUK_1/ SERRATOR_1 y CBC 509 CHILE/ SOMAT_3.1//BOOMER_18/LOTUS_4/4/SOOTY_9/RASCON_37//WODUCK/CHAM_3/3/ SOMAT_3/PHAX_1//TILO_1/LOTUS_4 no presentaron semilla infectada en ninguna de las tres fechas. Dieciocho líneas y las variedades CIRNO C2008 y Huatabampo Oro C2009 presentaron un promedio de infección entre 0.1 y 2.5% (Fig. 3). Los cinco promedios más bajos de infección los presentaron las líneas MOHAWK/4/DUKEM_1//PATKA_7/YAZI_1/3/PATKA_7/YAZI_1 /5/SILK_3/DIPPER_6/3/ACO89/DUKEM_4//5*ACO89/4/PLATA_7/ILBOR_1//SOMAT_3 con 0.09%, GUANAY/LOTAIL_6//ATIL/4/ARMENT//SRN_3/NIGRIS_4/3/CANELO_9.1/5/ SOOTY_9/RASCON_37//GUAYACAN INIA con 0.10%, TARRO_1/2*YUAN_1// AJAIA_13/YAZI/3/SOMAT_3/PHAX_1//TILO_1/LOTUS_4/4/CANELO_8//SORA/2* PLATA_12/7/CMH83.2578/4/D88059//WARD/YAV79/3/ACO89/5/2*SOOTY_9/RASCON_37/6/1A.1D5+1-

06/3*MOJO/3/AJAIA_12/F3LOCAL(SEL.ETHIO.135.85)//PLATA_13 con 0.13%, SOMAT_3/GREEN_22/4/GODRIN/GUTROS//DUKEM/3/THKNEE_11/6/YAV79/4/ ARMENT//SRN_3/NIGRIS_4/3/CANELO_9.1/5/MINIMUS/COMB DUCK_2//CHAM_3/3/ GREEN_19con 0.14%, y AINZEN_1/6/2*CMH82A.1062/3/GERARDO VZ 394//SBA81/ PLC/4/AAZ_1/CREX/5/HUI//CIT71/CII/9/CBC509CHILE/6/ECO/CMH76A.722//BIT/3/ ALTAR84/4/AJAIA_2/5/KJOVE_1/7/AJAIA_12/F3LOCAL(SEL.ETHIO.135.85)//PLATA_13 /8/SOOTY_9/RASCON_37//WODUCK/CHAM_3 con 0.17%. Huatabampo Oro C2009 presentó un promedio de 0.55% mientras que CIRNO C2008 2.17%. El porcentaje más alto de infección lo presentó la línea CHEN_1/TEZ/3/GUIL//CIT71/CII/4/SORA/PLATA_12/5/STOT //ALTAR84/ALD/6/SOMAT_3/PHAX_1//TILO_1/LOTUS_4/7/AJAIA_12/F3LOCAL(SEL. ETHIO.135.85)//PLATA_13/4/CHEN_1/TEZ/3/GUIL//CIT71/CII/5/SORA/2*PLATA_12//SOMAT_3 con 26.22% en la primera fecha y CIRNO C2008 con 6.11% en la segunda fecha.

Cuadro 1. Variedades y líneas de trigo cristalino evaluadas en campo bajo condiciones naturales de infección para determinar su reacción a la punta negra en tres fechas de siembra, durante el ciclo de cultivo Otoño-Invierno 2012-13, en el Valle del Yaqui, Sonora, México.

Variedad/Línea No.	Pedigrí e historial de selección
1	CIRNO C 2008
2	Huatabampo Oro C2009
3	ARMENT//2*SOOTY_9/RASCON_37/4/CNDO/PRIMADUR//HAI-OU_17/3/SNITAN CDSS02B00643S-0Y-0M-1Y-4M-04Y-0B
4	GODRIN/GUTROS//DUKEM/3/THKNEE_11/4/DUKEM_1//PATKA_7/YAZI_1/3/PATKA_7 /YAZI_1/5/AJAIA_12/F3LOCAL(SEL.ETHIO.135.85)//PLATA_13/3/ADAMAR CDSS04B00367T-0TOPY-10Y-0M-4Y-0M-4Y-0B
5	PLATA_7/ILBOR_1//SOMAT_3/3/CABECA_2/PATKA_4//ZHONG ZUO/2*GREEN_3 CDSS04Y00053S-13Y-0M-06Y-4M-1Y-0B
6	YAZI_1/AKAKI_4//SOMAT_3/3/AUK/GUIL//GREEN/5/2*NETTA_4/DUKEM_12//RASCO N_19/3/SORA/2*PLATA_12/4/GREEN_18/FOCHA_1//AIRON_1 CDSS04B00346T-0TOPY-3Y-0M-4Y-3Y-0B
7	PRECO/10/TARRO_1/2*YUAN_1//AJAIA_13/YAZI/9/USDA595/3/D67.3/RABI//CRA/4/ ALO/5/HUI/YAV_1/6/ARDENTE/7/HUI/YAV79/8/POD_9/11/CNDO/PRIMADUR//HAI-OU_17/3/SNITAN/4/JUPARE C 2001/5/CNDO/PRIMADUR//HAI-OU_17/3/SNITAN CDSS06B00461T-099Y-099M-8Y-1M-04Y-0B
8	SILK_3/DIPPER_6/3/ACO89/DUKEM_4//5*ACO89/4/PLATA_7/ILBOR_1//SOMAT_3/5/ SOOTY_9/RASCON_37//SOMAT_3.1 CDSS07Y00043S-099Y-099M-9Y-1M-04Y-0B
9	HUBEI//3*SOOTY_9/RASCON_37/3/SOOTY_9/RASCON_37/8/GREEN_2/HIMAN_12//S HIP_1/7/ECO/CMH76A.722//BIT/3/ALTAR 84/4/AJAIA_2/5/KJOVE_1/6/MALMUK_1/SERRATOR_1 CDSS07Y00164S-099Y-099M-6Y-2M-04Y-0B
10	CNDO/PRIMADUR//HAI-OU_17/3/SNITAN/4/JUPAREC2001/5/CNDO/PRIMADUR//HAI-OU_17/3/SNITAN/6/RISSA/GAN//POHO_1/3/ PLATA_3//CREX/ALLA*2/4/ARMENT//SRN_3/NIGRIS_4/3/CANELO_9.1

	CDSS07Y00184S-099Y-099M-12Y-1M-04Y-0B
11	BELLAROI/6/RASCON_22/RASCON_21//MOJO_2/3/GUANAY/4/RCOL/5/SORA/2*PLATA_12//SOMAT_3 CDSS07B00512S-099Y-017M-26Y-4M-0Y
12	BELLAROI/4/HUBEI//3*SOOTY_9/RASCON_37/3/SOOTY_9/RASCON_37/6/RASCON_22/RASCON_21//MOJO_2/3/GUANAY/4/RCOL/5/SORA/2*PLATA_12//SOMAT_3 CDSS07B00672T-0TOPY-099Y-027M-13Y-1M-0Y
13	BELLAROI/6/SOMAT_4/INTER_8/5/AJAIA_16//HORA/JRO/3/GAN/4/ZAR/7/BCRIS/BICUM//LLARETAINIA/3/DUKEM_12/2* RASCON_21 CDSS07B00679T-0TOPY-099Y-019M-5Y-3M-0Y
14	ALTAR 84/860137//YAZI_1/4/LIS_8/FILLO_6/3/FUUT//HORA/JOR/10/LD357E/2*TC60//JO69/3/FGO/4/GTA/5/SRN_1/6/TOTUS/7/ENTE/MEXI_2//HUI/4/YAV_1/3/LD357E/2*TC60//JO69/8/SOMBRA_20/9/JUPAREC2001/11/SOMAT_4/INTER_8/6/CHEN_1/TEZ/3/GUIL//CIT71/CII/4/ SORA/PLATA_12 CDSS07B00060S-099Y-044M-26Y-3M-0Y
15	CHEN_1/TEZ/3/GUIL//CIT71/CII/4/SORA/PLATA_12/5/STOT//ALTAR84/ALD/6/SOMAT_3/PHAX_1//TILO_1/LOTUS_4/7/AJAIA_12/ F3LOCAL(SEL.ETHIO.135.85)//PLATA_13/4/CHEN_1/TEZ/3/GUIL//CIT71/CII/5/SORA/2*PLATA_12//SOMAT_3 CDSS07B00086S-099Y-030M-13Y-4M-0Y
16	GUANAY/LOTAIL_6//ATIL/4/ARMENT//SRN_3/NIGRIS_4/3/CANELO_9.1/5/SOOTY_9/RASCON_37//GUAYACAN INIA CDSS07B00192S-099Y-042M-9Y-2M-0Y
17	SOMAT_3/GREEN_22/4/GODRIN/GUTROS//DUKEM/3/THKNEE_11/6/YAV79/4/ARMENT//SRN_3/NIGRIS_4/3/CANELO_9.1/5/MINIMUS/COMB DUCK_2//CHAM_3/3/GREEN_19 CDSS08Y00395S-099Y-020M-7Y-4M-0Y
18	TARRO_1/2*YUAN_1//AJAIA_13/YAZI/3/SOMAT_3/PHAX_1//TILO_1/LOTUS_4/4/CANELO_8//SORA/2*PLATA_12/7/CMH83.2578/4/D88059//WARD/YAV79/3/ACO89/5/2*SOOTY_9/RASCON_37/6/1A.1D5+1-06/3*MOJO/3/AJAIA_12/F3LOCAL(SEL.ETHIO.135.85)// PLATA_13 CDSS08Y00441S-099Y-024M-14Y-4M-0Y
19	WDRAIL_1/TOSKA_26//PLATA_6/GREEN_17/3/SORA/2*PLATA_12//SOMAT_3/4/SORA/2*PLATA_12//RASCON_37/6/YAV79/4/ARMENT//SRN_3/NIGRIS_4/3/CANELO_9.1/5/MINIMUS/COMB DUCK_2//CHAM_3/3/GREEN_19 CDSS08Y00490S-099Y-016M-12Y-4M-0Y
20	MOHAWK/3/SOMAT_3/PHAX_1//TILO_1/LOTUS_4/11/ARTICO/AJAIA_3//HUALITA/10/PLATA_10/6/MQUE/4/USDA573//QFN/AA_7/3/ALBA-D/5/AVO/HUI/7/PLATA_13/8/THKNEE_11/9/CHEN/ALTAR
21	84/3/HUI/POC//BUB/RUFO/4/FNFOOT CDSS08Y00607S-099Y-021M-13Y-1M-0Y
22	MOHAWK/4/DUKEM_1//PATKA_7/YAZI_1/3/PATKA_7/YAZI_1/5/SILK_3/DIPPER_6/3/ACO89/DUKEM_4//5*ACO89/4/PLATA_7/ILBOR_1//SOMAT_3 CDSS08Y00626S-099Y-07M-3Y-1M-0Y

23	MOHAWK/10/PLATA_10/6/MQUE/4/USDA573//QFN/AA_7/3/ALBA-D/5/AVO/HUI/7/PLATA_13/8/THKNEE_11/9/CHEN/ALTAR 84/3/HUI/POC//BUB/RUFO/4/FNFOOT/11/YAV79/4/ARMENT//SRN_3/NIGRIS_4/3/CANELO_9.1/5/MINIMUS/COMBDUCK_2// CHAM_3/3/GREEN_19 CDSS08Y00657S-099Y-034M-12Y-1M-0Y
24	1A.1D5+1-06/3*MOJO//RCOL/4/ARMENT//SRN_3/NIGRIS_4/3/CANELO_9.1/5/CF4-JS40//SOOTY_9/RASCON_37/4/CNDO/ PRIMADUR//HAI-OU_17/3/SNITAN/9/CBC509CHILE/6/ECO/CMH76A.722//BIT/3/ALTAR84/4/AJAIA_2/5 /KJOVE_1/7/AJAIA_12/ F3LOCAL(SEL.ETHIO.135.85)//PLATA_13/8/S CDSS07B00576T-0TOPY-099Y-014M-11Y-4M-0Y
25	AINZEN_1/6/2*CMH82A.1062/3/GERARDOVZ394//SBA81/PLC/4/AAZ_1/CREX/5/HUI/ /CIT71/CII/9/CBC509CHILE/6/ECO/ CMH76A.722//BIT/3/ALTAR84/4/AJAIA_2/5/KJOVE_1/7/AJAIA_12/F3LOCAL(SEL.ETHIO.135.85)//PLATA_13/8/SOOTY_9/ RASCON_37//WODUCK/CHAM_3 CDSS07B00431S-099Y-010M-11Y-2M-0Y
	CBC 509 CHILE/SOMAT_3.1//BOOMER_18/LOTUS_4/4/SOOTY_9/RASCON_37//WODUCK/CHAM_3/3/SOMAT_3/PHAX_1//TILO_1/ LOTUS_4 CDSS08Y00230S-099Y-015M-3Y-2M-0Y

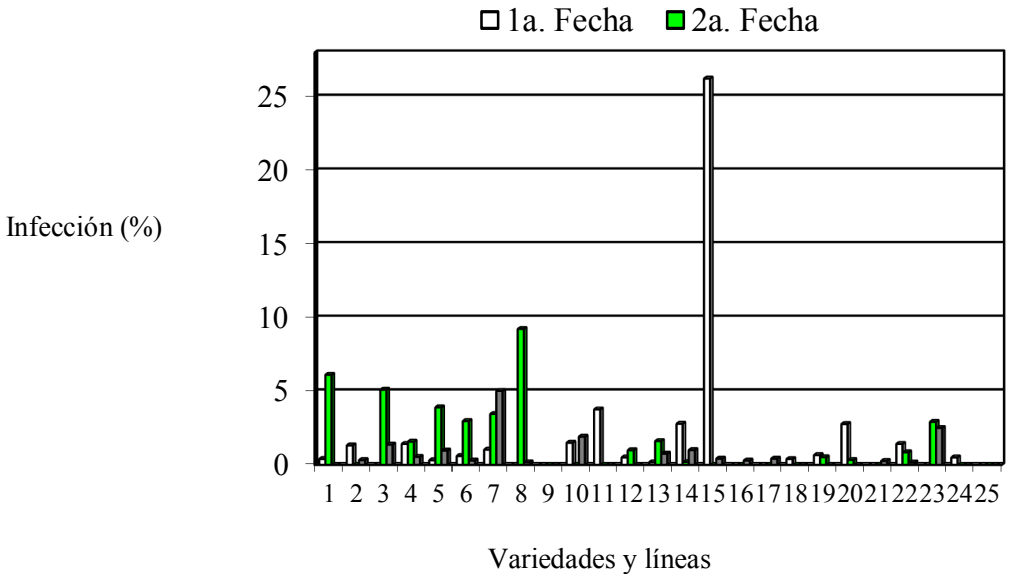


Fig. 2. Porcentaje de infección con punta negra de variedades y líneas de trigo cristalino bajo condiciones naturales, en el Valle del Yaqui, Sonora, México, durante el ciclo agrícola 2012-13.

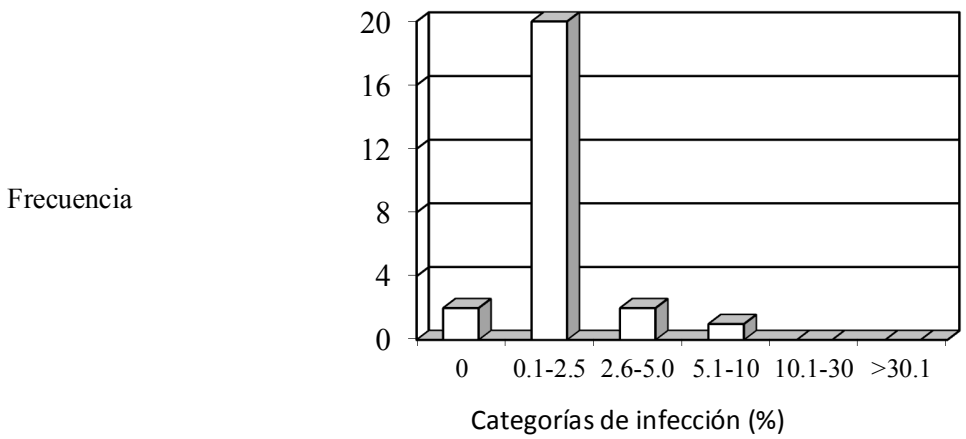


Fig. 3. Categorías de infección con punta negra de variedades y líneas de trigo cristalino bajo condiciones naturales, en el Valle del Yaqui, Sonora, México, durante el ciclo agrícola 2012-13.

En el sur de Sonora, la variedad CIRNO C2008 [1] se cultivó en 196,295 ha (79.6%) y Huatabampo Oro C2009 [2] en 5,081 (2.06%) en el ciclo agrícola 2012-2013. Ambas variedades han mostrado resistencia a las razas de roya de la hoja (*Puccinia triticina*) que se han presentado en los últimos años en la región. Huatabampo Oro C2009 ha mostrado un potencial de rendimiento máximo de de 8.8 t/ha y CIRNO C2008 de 10.5 t/ha. Sin embargo, se debe tomar en consideración el nivel de afectación por punta negra en ésta última, ya que es un factor que afecta negativamente el nivel de reditualidad económica pues el valor del grano comercial se degrada. Además, la siembra de una variedad en una superficie grande trae como consecuencia un desbalance en el mosaico genético que debe existir para que se cuente con una variabilidad en la base genética de resistencia a la roya de la hoja, así como a la roya lineal o amarilla (*Puccinia striiformis*), la cual se ha presentado en la región en los últimos años.

CONCLUSIONES

La evaluación para resistencia a punta negra llevada a cabo en el ciclo agrícola 2012-2013 en el Campo Experimental Norman E. Borlaug en el Valle del Yaqui, Sonora, bajo condiciones naturales de infección, indicó que las líneas experimentales de trigo cristalino HUBEI//3*SOOTY_9/RASCON_37/3/SOOTY_9/RASCON_37/8/GREEN_2/HIMAN_12// SHIP_1/7/ECO/CMH76A.722//BIT/3/ALTAR84/4/AJAIA_2/5/KJOVE_1/6/MALMUK_1/ SERRATOR_1 y CBC 509 CHILE/SOMAT_3.1//BOOMER_18/LOTUS_4/4/SOOTY_9/ RASCON_37//WODUCK/CHAM_3/3/SOMAT_3/PHAX_1//TILO_1/LOTUS_4 no presentaron semilla infectada en ninguna de las tres fechas de evaluación, mientras que la variedad comercial Huatabampo Oro C2009 presentó un promedio de 0.55% y CIRNO C2008 2.17%.

REFERENCIAS

[1]Figueroa-López, P., Félix-Fuentes, J.L., Fuentes-Dávila, G., Valenzuela-Herrera, V., Chávez-Villalba, G. y Mendoza-Lugo, J.A. (2010). CIRNO C2008, nueva variedad de trigo cristalino con alto rendimiento potencial para el estado de Sonora. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 1(5):745-749.

[2]Fuentes-Dávila, G., Figueroa-López, P., Valenzuela-Herrera, V., Chávez-Villalba, G., Félix-Fuentes, J.L., y Mendoza-Lugo, J.A. (2012). Huatabampo Oro C2009, nueva variedad de trigo cristalino para el noroeste de México. Revista Fitotecnia Mexicana 35(4):351-353.

[3]Mathur, S.B., and Cunfer, B.M. (1993). Seed-borne Diseases and Seed Health Testing of Wheat. Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries. Hellerup, Denmark. 168 p.

[4]Prescott, J.M., Burnett, P.A., Saari, E.E., Ramsom, J., Bowman, J., de Milliano, W., Singh, R.P., and Bekele, G. (1986). Wheat Diseases and Pests: A guide for field identification. CIMMYT. Mexico, D.F. 135 p.

[5]Wiese, M.V. (1987). Compendium of Wheat Diseases. APS Press. The American Phytopathological Society. St. Paul, MN, USA. 112 p.

REACTION OF DURUM WHEAT CULTIVARS AND LINES TO PARTIAL BUNT, *Tilletia indica*, DURING THE CROP SEASON 2012-2013

(Reacción al carbón parcial (*Tilletia indica*) de variedades y líneas de trigo cristalino en el ciclo agrícola 2012-13).

Guillermo Fuentes-Dávila[a+], Pedro Figueroa-López[a], Miguel Alfonso Camacho-Casas[a], Pedro Félix-Valencia [a], José Luis Félix-Fuentes [a], Gabriela Chávez-Villalba[a], Javier Ireta-Moreno[b]*

[a] INIFAP, Campo Experimental Norman E. Borlaug;
[b] INIFAP, Campo Experimental Centro-Altos de Jalisco.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: fuentes.guillermo@inifap.gob.mx

ABSTRACT
Partial bunt caused by *Tilletia indica* is an endemic wheat disease in southern Sonora which affects seed and flour quality, germplasm exchange and national and international export. Therefore, twenty three advanced durum wheat lines and cultivars CIRNO C2008 and Huatabampo Oro C2009, were evaluated for resistance to this disease during the crop season 2012-2013 in three sowing dates (November 15, 22, and 29, 2012), using 8 g of seed for a row 0.7 m long. Inoculations were carried out by injecting 1 mL of an allantoid sporidial suspension (10,000/mL) during the boot stage, in 10 heads per line/cultivar. Harvesting was done manually, and the counting of infected and healthy grains by visual inspection. The range of infection for the first sowing date was 0 to 20.8%, with an average of 7.6; 0 to 33% for the second date, with an average of 6.9; and 0 to 32.6% for the third date, with an average of 6.27. The mean of the three highest levels of infection for the susceptible check was 100%. Lines with the lowest average percentage of infection were GUANAY/LOTAIL_6 //ATIL/4/ARMENT//SRN_3/ NIGRIS_4/3/CANELO_9.1/5/SOOTY_9/RASCON_37//GUAYACAN INIA with 0.50%, and SILK_3/DIPPER_6/3/ACO89/DUKEM_4//5*ACO89/4/PLATA_7/ILBOR_ 1//SOMAT_3/5/SOOTY_9/RASCON_37//SOMAT_3.1 with 1.1%. Cultivars CIRNO C2008 and Huatabampo Oro C2009 showed an average infection of 2.86 and 6.9%, respectively.

Keywords: *Tilletia indica, Partial Bunt, Triticum turgidum,* Durum wheat

RESUMEN
El carbón parcial del trigo causado por *Tilletia indica*, es una enfermedad endémica en el sur de Sonora, la cual afecta la calidad de la semilla y la harina, el intercambio de germoplasma, y la exportación nacional e internacional, por lo que veintitrés líneas avanzadas de trigo cristalino y las variedades CIRNO C2008 y Huatabampo Oro C2009 se evaluaron para resistencia a esta enfermedad durante el ciclo agrícola 2012-2013 en tres fechas de siembra (noviembre 15, 22 y 29, 2012), usando 8 g de semilla para un surco de 0.7 m de largo. Las inoculaciones se hicieron inyectando 1 mL de una suspensión de esporidios alantoides (10,000/mL) durante el embuche en 10 espigas por línea/variedad. La cosecha se hizo manualmente, y el conteo de granos infectados y sanos mediante inspección visual. El rango de infección para la primera fecha de siembra fue de 0 a 20.8%, con un promedio de 7.6; el de la segunda

fue de 0 a 33%, con un promedio de 6.9, y el de la tercera fue de 0 a 32.6%, con un promedio de 6.27. La media de los tres porcentajes más altos de infección del testigo susceptible fue de 100%. Las líneas que tuvieron los porcentajes promedio más bajos de infección fueron GUANAY/LOTAIL_6//ATIL/4/ARMENT//SRN_3/NIGRIS_4/3/CANELO_ 9.1/5/SOOTY_ 9/RASCON_37//GUAYACAN INIA con 0.50% y SILK_3/DIPPER_6/3/ACO89/DUKEM_4//5* ACO89/4/PLATA_7/ILBOR_1//SOMAT_3/5/ SOOTY_9/RASCON_37//SOMAT_3.1 con 1.1%. Las variedades CIRNO C2008 y Huatabampo Oro C2009 presentaron un promedio de infección de 2.86 y 6.9%, respectivamente.

Palabras Clave: *Tilletia indica, Carbón Parcial, Triticum turgidum,* Trigo cristalino

INTRODUCCIÓN

El carbón parcial (Fig. 1) causado por el hongo *Tilletia indica* (sin. *Neovossia indica*) ocurre en forma natural en trigo harinero (*Triticum aestivum*; [8]), trigo duro (*T. turgidum*), y triticale (X *Triticosecale*; [1]). Los granos infectados generalmente se afectan parcialmente, y no es muy común encontrar granos completamente afectados [3, 4, 9]. Esta enfermedad se reportó por primera vez en la India [8]; después se reportó en Mexico [6], Pakistán [10], Nepal [13], Los Estados Unidos [2] y Africa del Sur [5]. El control de este organismo es difícil debido a que las teliosporas son resistentes a factores físicos y químicos [14]. El control químico se puede llevar a cabo mediante aplicación de fungicidas durante el período de floración [11]; sin embargo, cuando las regulaciones cuarentenarias estipulan que no hay nivel de tolerancia para la producción de semilla [12], esta medida no es económicamente redituable para aplicación comercial. El uso de variedades de trigo resistentes a la enfermedad es la medida de control más adecuada; además, el uso de tales variedades reduciría las posibilidades de introducir la enfermedad a áreas libres. Desde 1940's varias especies de *Triticum* han sido evaluadas para resistencia al carbón parcial [3]. El objetivo de este trabajo fue evaluar la reacción a *Tilletia indica* en inoculaciones artificiales en campo, de veintitrés líneas avanzadas de trigo cristalino, así como dos variedades comerciales del mismo tipo de trigo actualmente en uso en el noroeste de México.



Fig. 1. Síntomas de carbón parcial en el grano de trigo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Veintitrés líneas avanzadas de trigo cristalino y las variedades CIRNO C2008 y Huatabampo Oro C2009 (Tabla 1) se evaluaron para resistencia a carbón parcial durante el ciclo agrícola Otoño-Invierno 2012-2013 en el Campo Experimental Norman E. Borlaug perteneciente al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, ubicado en el Block 910 del Valle del Yaqui, Sonora a 27º22´3.01" N y 109º55´40.22" W en un suelo de textura arcillosa y pH de 7.8. Las fechas de siembra fueron noviembre 15, 22 y 29, 2012, usando aproximadamente 8 g de semilla para un surco de 0.7 m de largo en cama de dos hileras sin repeticiones. Se utilizó la microaspersión automatizada cinco veces por día con el fin de proveer un ambiente húmedo en el área experimental. Las inoculaciones se hicieron inyectando 1 mL de una suspensión de esporidios alantoides (10,000/mL) con una jeringa hipodérmica durante el embuche en 10 espigas por línea. Para preparar el inóculo, las teliosporas se obtuvieron de granos de trigo infectados, los cuales se agitaron en una solución de tween 20 + agua en tubos de ensaye, se cribaron en malla de 60 µm y se dejaron reposar en agua durante 24 h. Luego, las teliosporas se colocaron en hipoclorito de sodio al 0.6% durante aprox. 2 min mientras se centifrugaban a 3,000 rpm, se decantaron y se agregó agua destilada estéril para remover el exceso de cloro mientras se centrifugaba nuevamente a 3,000 rpm, repitiendo esta última operación. Las teliosporas se sembraron en agar-agua al 2% bajo condiciones asépticas, utilizando una jeringa o pipeta estéril, se incubaron a 18-22°C hasta detectar germinación. Pedazos de agar-agua donde se detectaron teliosporas germinando, se colocaron invertidos en tapas de cajas Petri con papa-dextrosa-agar con el fin de estimular la producción de esporidios secundarios. Después de 9 días de crecimiento, se agregó agua esterilizada a las cajas Petri con colonias del hongo en desarrollo, se rasparon con una espátula esterilizada a la llama y la suspensión se transfirió a otras cajas Petri con PDA para incrementar el inóculo. Una vez que las cajas Petri estuvieron cubiertas con el hongo, cuadros de agar-agua-hongo se colocaron invertidas en tapas de cajas Petri de vidrio esterilizadas, en el fondo de las cuales se colocó agua esterilizada y la colecta de esporidios secundarios se realizó diariamente con el fin de cuantificar usando un hematocímetro y ajustar la concentración a 10,000 por mL. La cosecha y trilla de las espigas inoculadas se hizo manualmente, y el conteo de granos infectados y sanos y la evaluación se realizaron mediante inspección visual. Las líneas que se evaluaron fueron originadas del programa colaborativo entre el CIMMYT y el INIFAP.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El rango de infección para la primera fecha de siembra fue de 0 a 20.8%, con un promedio de 7.6. El rango de infección para la segunda fue de 0 a 33.0%, con un promedio de 6.9, y para la tercera fue de 0 a 32.6%, con un promedio de 6.27. La media de los tres porcentajes más altos de infección del testigo susceptible fue de 100%. Las líneas que presentaron los porcentajes promedio de las tres fechas de siembra, más altos de infección fueron MOHAWK/3/SOMAT_3/PHAX_1//TILO_1/LOTUS_4/11/ARTICO/AJAIA_3//HUALITA/10/PLATA_10/6/MQUE/4/USDA573//QFN/AA_7/3/ALBA-D/5/AVO/HUI/7/PLATA_13/8/ THKNEE_11/9/CHEN/ALTAR 84/3/HUI/POC//BUB/RUFO/4/FNFOOT con 28.8%, PLATA_7 /ILBOR_1//SOMAT_3/3/CABECA_2/PATKA_4//ZHONG ZUO/2*GREEN_3 con 14.9% y CBC 509 CHILE/SOMAT_3.1//BOOMER_18/LOTUS_4/4/SOOTY_9/RASCON_37// WODUCK/CHAM_3/3/SOMAT_3/PHAX_1//TILO_1/LOTUS_4 con 13.5%. Los promedios más altos de infección por fecha los mostraron las líneas MOHAWK/3/SOMAT_3/ PHAX_1//TILO_1/LOTUS_4/11/ARTICO/AJAIA_3//HUALITA/10/PLATA_10/6/MQUE/4/USDA573//QFN/A

A_7/3/ALBA-D/5/AVO/HUI/7/PLATA_13/8/THKNEE_11/9/CHEN/ALTAR 84/3/HUI/POC//BUB/RUFO/4/FNFOOT (entrada 20) en la primera fecha con 20.9%, seguida de PLATA_7/ILBOR_1//SOMAT_3/3/CABECA_2/PATKA_4//ZHONG ZUO/2*GREEN_3 con 20.8%; en la segunda fecha la misma entrada 20 con 33%, seguida de CBC 509 CHILE /SOMAT_3.1//BOOMER_18/LOTUS_4/4/SOOTY_9/RASCON_37//WODUCK/CHAM_3/3/SOMAT_3/PHAX _1//TILO_1/LOTUS_4 con 18% (entrada 25); y en la tercera fecha la misma entrada 20 con 32.6% seguida de la entrada 25 con 16.2% (Fig. 2). Todas las líneas presentaron granos infectados en alguna de las fechas de siembra; dentro de la categoría de infección 0.1-2.5% promedio de las tres fechas hubo 6 líneas, las que tuvieron los porcentajes más bajos fueron GUANAY/LOTAIL_6//ATIL/4/ARMENT//SRN_3/NIGRIS_4/3/CANELO_9.1/5/SOOTY_9/ RASCON_37//GUAYACAN INIA con 0.50% y SILK_3/DIPPER_6/3/ACO89/DUKEM_4//5* ACO89/4/PLATA_7/ILBOR_1//SOMAT_3/5/SOOTY_9/RASCON_37//SOMAT_3.1 con 1.1% (Fig. 3); en la categoría 2.6-5.0% hubo 4 líneas; en la categoría 5.1-10% hubo 11; y en la de 10.1-30% hubo 4. Las

Tabla 1. Variedades y líneas de trigo cristalino evaluadas en campo bajo inoculación artificial para determinar su reacción al carbón parcial en tres fechas de siembra, durante el ciclo de cultivo Otoño-Invierno 2012-13, en el Valle del Yaqui, Sonora, México.

Variedad/Línea No.	Pedigrí e historial de selección
1	CIRNO C 2008
2	Huatabampo Oro C2009
3	ARMENT//2*SOOTY_9/RASCON_37/4/CNDO/PRIMADUR//HAI-OU_17/3/SNITAN CDSS02B00643S-0Y-0M-1Y-4M-04Y-0B
4	GODRIN/GUTROS//DUKEM/3/THKNEE_11/4/DUKEM_1//PATKA_7/YAZI_1/3/PATKA_7 /YAZI_1/5/AJAIA_12/F3LOCAL(SEL.ETHIO.135.85)//PLATA_13/3/ADAMAR CDSS04B00367T-0TOPY-10Y-0M-4Y-0M-4Y-0B
5	PLATA_7/ILBOR_1//SOMAT_3/3/CABECA_2/PATKA_4//ZHONG ZUO/2*GREEN_3 CDSS04Y00053S-13Y-0M-06Y-4M-1Y-0B
6	YAZI_1/AKAKI_4//SOMAT_3/3/AUK/GUIL//GREEN/5/2*NETTA_4/DUKEM_12//RASCO N_19/3/SORA/2*PLATA_12/4/GREEN_18/FOCHA_1//AIRON_1 CDSS04B00346T-0TOPY-3Y-0M-4Y-3Y-0B
7	PRECO/10/TARRO_1/2*YUAN_1//AJAIA_13/YAZI/9/USDA595/3/D67.3/RABI//CRA/4/ ALO/5/HUI/YAV_1/6/ARDENTE/7/HUI/YAV79/8/POD_9/11/CNDO/PRIMADUR//HAI-OU_17/3/SNITAN/4/JUPARE C 2001/5/CNDO/PRIMADUR//HAI-OU_17/3/SNITAN CDSS06B00461T-099Y-099M-8Y-1M-04Y-0B
8	SILK_3/DIPPER_6/3/ACO89/DUKEM_4//5*ACO89/4/PLATA_7/ILBOR_1//SOMAT_3/5/ SOOTY_9/RASCON_37//SOMAT_3.1 CDSS07Y00043S-099Y-099M-9Y-1M-04Y-0B
9	HUBEI//3*SOOTY_9/RASCON_37/3/SOOTY_9/RASCON_37/8/GREEN_2/HIMAN_12//S HIP_1/7/ECO/CMH76A.722//BIT/3/ALTAR 84/4/AJAIA_2/5/KJOVE_1/6/MALMUK_1/SERRATOR_1 CDSS07Y00164S-099Y-099M-6Y-2M-04Y-0B
10	CNDO/PRIMADUR//HAI-OU_17/3/SNITAN/4/JUPAREC2001/5/CNDO/PRIMADUR//HAI-OU_17/3/SNITAN/6/RISSA/GAN//POHO_1/3/

	PLATA_3//CREX/ALLA*2/4/ARMENT//SRN_3/NIGRIS_4/3/CANELO_9.1 CDSS07Y00184S-099Y-099M-12Y-1M-04Y-0B
11	BELLAROI/6/RASCON_22/RASCON_21//MOJO_2/3/GUANAY/4/RCOL/5/SORA/2*PLATA_12//SOMAT_3 CDSS07B00512S-099Y-017M-26Y-4M-0Y
12	BELLAROI/4/HUBEI//3*SOOTY_9/RASCON_37/3/SOOTY_9/RASCON_37/6/RASCON_22/RASCON_21//MOJO_2/3/GUANAY/4/RCOL/5/SORA/2*PLATA_12//SOMAT_3 CDSS07B00672T-0TOPY-099Y-027M-13Y-1M-0Y
13	BELLAROI/6/SOMAT_4/INTER_8/5/AJAIA_16//HORA/JRO/3/GAN/4/ZAR/7/BCRIS/BICUM//LLARETAINIA/3/DUKEM_12/2* RASCON_21 CDSS07B00679T-0TOPY-099Y-019M-5Y-3M-0Y
14	ALTAR 84/860137//YAZI_1/4/LIS_8/FILLO_6/3/FUUT//HORA/JOR/10/LD357E/2*TC60//JO69/3/FGO/4/GTA/5/SRN_1/6/TOTUS/7/ENTE/MEXI_2//HUI/4/YAV_1/3/LD357E/2*TC60//JO69/8/SOMBRA_20/9/JUPAREC2001/11/SOMAT_4/INTER_8/6/CHEN_1/TEZ/3/GUIL//CIT71/CII/4/ SORA/PLATA_12 CDSS07B00060S-099Y-044M-26Y-3M-0Y
15	CHEN_1/TEZ/3/GUIL//CIT71/CII/4/SORA/PLATA_12/5/STOT//ALTAR84/ALD/6/SOMAT_3/PHAX_1//TILO_1/LOTUS_4/7/AJAIA_12/ F3LOCAL(SEL.ETHIO.135.85)//PLATA_13/4/CHEN_1/TEZ/3/GUIL//CIT71/CII/5/SORA/2*PLATA_12//SOMAT_3 CDSS07B00086S-099Y-030M-13Y-4M-0Y
16	GUANAY/LOTAIL_6//ATIL/4/ARMENT//SRN_3/NIGRIS_4/3/CANELO_9.1/5/SOOTY_9/RASCON_37//GUAYACAN INIA CDSS07B00192S-099Y-042M-9Y-2M-0Y
17	SOMAT_3/GREEN_22/4/GODRIN/GUTROS//DUKEM/3/THKNEE_11/6/YAV79/4/ARMENT//SRN_3/NIGRIS_4/3/CANELO_9.1/5/MINIMUS/COMB DUCK_2//CHAM_3/3/GREEN_19 CDSS08Y00395S-099Y-020M-7Y-4M-0Y
18	TARRO_1/2*YUAN_1//AJAIA_13/YAZI/3/SOMAT_3/PHAX_1//TILO_1/LOTUS_4/4/CANELO_8//SORA/2*PLATA_12/7/CMH83.2578/4/D88059//WARD/YAV79/3/ACO89/5/2*SOOTY_9/RASCON_37/6/1A.1D5+1-06/3*MOJO/3/AJAIA_12/F3LOCAL(SEL.ETHIO.135.85)// PLATA_13 CDSS08Y00441S-099Y-024M-14Y-4M-0Y
19	WDRAIL_1/TOSKA_26//PLATA_6/GREEN_17/3/SORA/2*PLATA_12//SOMAT_3/4/SORA/2*PLATA_12//RASCON_37/6/YAV79/4/ARMENT//SRN_3/NIGRIS_4/3/CANELO_9.1/5/MINIMUS/COMB DUCK_2//CHAM_3/3/GREEN_19 CDSS08Y00490S-099Y-016M-12Y-4M-0Y
20	MOHAWK/3/SOMAT_3/PHAX_1//TILO_1/LOTUS_4/11/ARTICO/AJAIA_3//HUALITA/10/PLATA_10/6/MQUE/4/USDA573//QFN/AA_7/3/ALBA-D/5/AVO/HUI/7/PLATA_13/8/THKNEE_11/9/CHEN/ALTAR 84/3/HUI/POC//BUB/RUFO/4/FNFOOT CDSS08Y00607S-099Y-021M-13Y-1M-0Y
21	MOHAWK/4/DUKEM_1//PATKA_7/YAZI_1/3/PATKA_7/YAZI_1/5/SILK_3/DIPPER_6/3/ACO89/DUKEM_4//5*ACO89/4/PLATA_7/ILBOR_1//SOMAT_3

22	CDSS08Y00626S-099Y-07M-3Y-1M-0Y MOHAWK/10/PLATA_10/6/MQUE/4/USDA573//QFN/AA_7/3/ALBA-D/5/AVO/HUI/7/PLATA_13/8/THKNEE_11/9/CHEN/ALTAR 84/3/HUI/POC//BUB/RUFO/4/FNFOOT/11/YAV79/4/ARMENT//SRN_3/NIGRIS_4/3/CANELO_9.1/5/MINIMUS/COMBDUCK_2// CHAM_3/3/GREEN_19
23	CDSS08Y00657S-099Y-034M-12Y-1M-0Y 1A.1D5+1-06/3*MOJO//RCOL/4/ARMENT//SRN_3/NIGRIS_4/3/CANELO_9.1/5/CF4-JS40//SOOTY_9/RASCON_37/4/CNDO/ PRIMADUR//HAI-OU_17/3/SNITAN/9/CBC509CHILE/6/ECO/CMH76A.722//BIT/3/ALTAR84/4/AJAIA_2/5/KJOVE_1/7/AJAIA_12/ F3LOCAL(SEL.ETHIO.135.85)//PLATA_13/8/S
24	CDSS07B00576T-0TOPY-099Y-014M-11Y-4M-0Y AINZEN_1/6/2*CMH82A.1062/3/GERARDOVZ394//SBA81/PLC/4/AAZ_1/CREX/5/HUI//CIT71/CII/9/CBC509CHILE/6/ECO/ CMH76A.722//BIT/3/ALTAR84/4/AJAIA_2/5/KJOVE_1/7/AJAIA_12/F3LOCAL(SEL.ETHIO.135.85)//PLATA_13/8/SOOTY_9/ RASCON_37//WODUCK/CHAM_3
25	CDSS07B00431S-099Y-010M-11Y-2M-0Y CBC 509 CHILE/SOMAT_3.1//BOOMER_18/LOTUS_4/4/SOOTY_9/RASCON_37//WODUCK/CHAM_3/3/SOMAT_3/PHAX_1//TILO_1/ LOTUS_4 CDSS08Y00230S-099Y-015M-3Y-2M-0Y

variedades CIRNO C2008 y Huatabampo Oro C2009 presentaron un promedio de infección de 2.86 y 6.9%, respectivamente. Líneas o variedades con niveles de infección menores al 5% se consideran como resistentes [7]. Las variedades de trigo producidas en los últimos años, se han liberado considerando factores como resistencia a la roya de la hoja, roya amarilla, rendimiento, calidad y resistencia al carbón parcial. Debido a la susceptibilidad predominante al carbón parcial que se presenta en los trigo harineros y a las condiciones de este estudio en particular en donde algunas líneas de trigo cristalino mostraron susceptibilidad, es necesario que las progenies de mayor interés y líneas avanzadas se evalúen en forma continua para asegurar que los bajos niveles de infección se deban a la resistencia genética y no a escapes a la enfermedad; así mismo, es importante que los esfuerzos conjuntos entre el INIFAP y CIMMYT continúen para asegurar niveles aceptables de resistencia al carbón parcial en los nuevos materiales promisorios de trigo cristalino, para producir un cultivo comercialmente viable para los productores del estado de Sonora y que satisfaga los requerimientos de la industria.

CONCLUSIONES

Las líneas de trigo cristalino que tuvieron los porcentajes promedio más bajos de infección en inoculaciones artificiales en campo con carbón parcial durante el ciclo 2012-2013 fueron GUANAY/LOTAIL_6//ATIL/4/ARMENT//SRN_3/NIGRIS_4/3/CANELO_9.1/5/SOOTY_9/ RASCON_37//GUAYACAN INIA con 0.50% y SILK_3/DIPPER_6/3/ ACO89/DUKEM_4// 5*ACO89/4/PLATA_7/ILBOR_1//SOMAT_3/5/SOOTY_9/RASCON_37//SOMAT_3.1 con 1.1%. Las

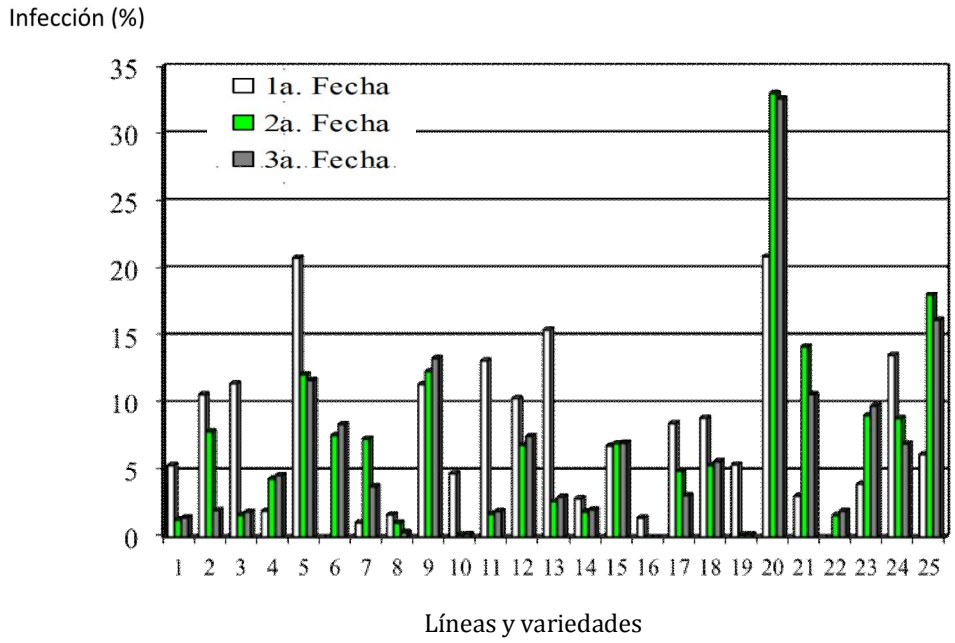


Fig. 2. Porcentaje promedio de infección por fecha con carbón parcial de líneas y variedades de trigo cristalino bajo inoculación artificial, en el Valle del Yaqui, Sonora, México, durante el ciclo agrícola 2012-2013.

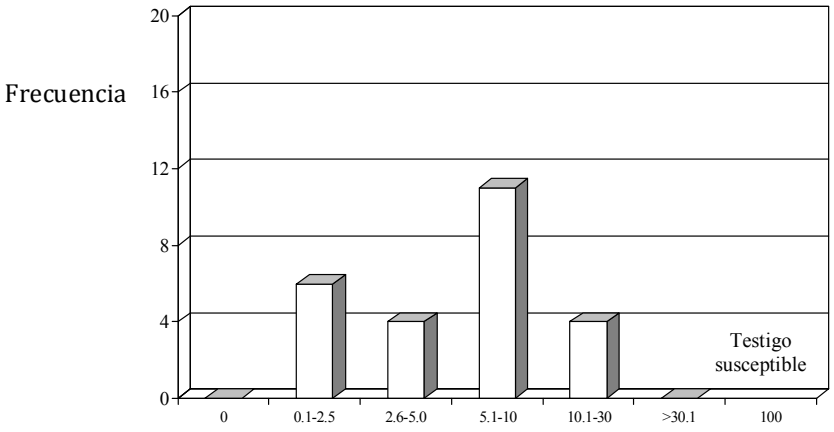


Fig. 3. Resultados de inoculaciones artificiales en campo con carbón parcial en tres fechas de siembra de 23 líneas y 2 variedades de trigo cristalino en el Valle del Yaqui, Sonora, México, durante el ciclo agrícola 2012-2013.

variedades CIRNO C2008 y Huatabampo Oro C2009 presentaron un promedio de infección de 2.86 y 6.9%, respectivamente. En general, las variedades y el resto de las líneas mostraron una reacción de susceptible (inaceptable para esta tipo de trigo) a resistente, por lo que es importante continuar las evaluaciones de campo, para evitar la liberación de variedades que por su susceptibilidad al carbón parcial, puedan impactar negativamente la producción de trigo en el noroeste de México.

REFERENCIAS

[1]Agarwal, V.K., Verma, H.S., and Khetarpal, R.K. 1977. Occurrence of partial bunt on triticale. Plant Protection Bulletin 25:210-211.

[2]APHIS. 1996. Karnal bunt: situation report update (March 29). USDA-APAHIS, Plant Protection and Quarantine (http://www.aphis.usda.gov/oa/bunt).

[3]Bedi, S.K.S., Sikka, M.R., and Mundkur, B.B. 1949. Transmission of wheat bunt due to *Neovossia indica* (Mitra) Mundkur. Indian Phytopathology 2:20-26.

[4]Chona, B.L., Munjal, R.L., and Adlakha, K.L. 1961. A method for screening wheat plants for resistance to *Neovossia indica*. Indian Phytopathol. 14:99-101.

[5]Crous, P.W., Van Jaarsveld, A.B., Castlebury, L.A., Carris, L.M., Frederick, R.D., and Pretorius, Z.A. 2001. Karnal bunt of wheat newly reported from the African continent. Plant Disease 85:561.

[6]Durán, R. 1972. Further aspects of teliospore germination in North American smut fungi. II. Can. J. Bot. 50:2569-2573.

[7]Fuentes-Davila, G., and Rajaram, S. 1994. Sources of resistance to *Tilletia indica* in wheat. Crop Protection 13:20-24.

[8]Mitra, M. 1931. A new bunt of wheat in India. Annals of Applied Biology 18:178-179.

[9]Mitra, M. 1935. Stinking smut (bunt) of wheat with a special reference to *Tilletia indica* Mitra. Indian J. Agric. Sci. 5:1-24.

[10]Munjal, R.L. 1975. Status of Karnal bunt (*Neovossia indica*) of wheat in Northern India during 1968-1969 and 1969-1970. Indian Journal of Mycology and Plant Pathology 5(2):185-187.

[11]Salazar-Huerta, F.J., Figueroa-Lopez, P., Smilanick, J.L., and Fuentes-Davila, G. 1997. Evaluation of foliar fungicides for control of Karnal bunt of wheat during 1986-1989 in northwestern Mexico. Revista Mexicana de Fitopatología 15:73-80.

[12]SARH. 1987. Cuarentena interior No. 16 contra el Carbón Parcial del trigo. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Diario Oficial, (jueves) 12 de Marzo de 1987, México.

[13]Singh, D.V., Agarwal, R., Shrestha, K.J., Thapa, R.B., and Dubin, H.J. 1989. First report of *Tilletia indica* on wheat in Nepal. Plant Disease 73:273.

[14]Smilanick, J.L., Hoffmann, J.A., Secrest, L.R., and Wiese, K. 1988. Evaluation of chemical and physical treatment to prevent germination of *Tilletia indica* teliospores. Plant Disease 72:46-51.

CHICKPEA CROP IMPROVEMENT FOR NORTHWEST OF MEXICO

(Mejoramiento Genético de Garbanzo para el Noroeste de México)

Víctor Valenzuela-Herrera[a*+], Sixto Velarde-Félix[a], Gustavo A. Fierros-Leyva[b], Pedro F. Ortega-Murrieta, Isidoro Padilla-Valenzuela[e], J. Acosta-Gallegos[c], Milagros Ramírez-Soto[a], Erasmo Gutiérres-Perez[d], Raúl H. Sauceda-Acosta[e]

[a]INIFAP-CIRNO, Campo Experimental Valle de Culiacán.
[b]INIFAP-CIRNO, Campo Experimental Costa de Hermosillo.
[c]INIFAP-CEVAMEX, Campo Experimental Bajío
[d]INIFAP-CIRNO, Campo Experimental Todos los Santos.
[e]INIFAP-CIRNO, Campo Experimental Norman E. Borlaug

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: valenzuela.victor@inifap.gob.mx

Área de conocimiento: Agropecuaria.

ABSTRACT
Chickpea is the second most important legume in the world. In Mexico, chickpea it is grown during the autumn-winter cycle and in the northwestern is one of the best options due to low water requirements and its high economic importance because it is source of foreign exchange in the European market. In the state of Sinaloa, the production goes mainly to countries like Spain, Algeria, Italy, Turkey and Portugal. The chickpea "Mexican type" bases its recognition by shape, color and especially large grain size produced by varieties developed in Mexico. The chickpea improvement program of the National Institute of Forestry, Agriculture and Livestock Research (INIFAP) has developed and registered more than 18 commercial varieties and the best example is the variety Blanco Sinaloa-92 with excellent grain quality (caliber 40-44 grains per 30 grams) creamy-white and rough appreciated features in the international market. The INIFAP improvement program has two special experimental stations based in northwestern Mexico. One is the Experimental Hermosillo Coast Station in Sonora and the Culiacan Valley Experimental Station in Sinaloa. Genetic variability and sources of resistance to diseases mainly is based on lines from banks worldwide germplasm from the International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics (ICRISAT), the International Center for Agricultural Research in Dry Areas (ICARDA), Pullman Washington University, USA, as well as material developed at INIFAP. There are more than 15 sources of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *Ciceris* and *Fusarium solani* in greenhouse and infected plots trials. In test plots have been identified candidate lines with good yield potential and grain size in producing areas of the state of Sinaloa, Sonora, Baja California and Guanajuato. HOGA-67, CUGA08-743 and HOGA-21 are experimental lines identified in regional yield trials. Currently, the chickpea improvement program in Mexico is focused on obtaining varieties of white grain and forage with features demanded by industry and consumers.

Keywords: Grain quality, *Fusarium oxysporum, Fusarium solani*

RESUMEN

El garbanzo es la segunda leguminosa más importante en el mundo. En México, el garbanzo se cultiva durante el ciclo otoño-invierno y en el noroeste es una de las mejores opciones, debido a los bajos requerimientos de agua y a su alta importancia económica, ya que es fuente de divisas en el mercado europeo. En el estado de Sinaloa, la producción se destina principalmente a países como España, Argelia, Italia, Turquía y Portugal. El garbanzo "tipo mexicano" basa su reconocimiento por la forma, color y tamaño especialmente grano grande producido por variedades desarrolladas en México. El programa de mejoramiento de garbanzo del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) ha desarrollado y registrado más de 18 variedades comerciales y el mejor ejemplo es la variedad Blanco Sinaloa-92 con la calidad del grano excelente (calibre 40-44 granos por 30 gramos) características apreciadas de color blanco cremoso y rugoso en el mercado internacional. El programa de mejoramiento del INIFAP cuenta con dos estaciones experimentales especiales localizadas en el noroeste de México. Una de ellas es la Estación Experimental Costa de Hermosillo en Sonora y la Estación Experimental Valle de Culiacán en Sinaloa. La variabilidad genética y fuentes de resistencia se basa principalmente en líneas de los bancos de germoplasma de Instituto Internacional de Investigación para las Zonas Tropicales Semiáridas (ICRISAT), del Centro Internacional para la Investigación Agrícola en Zonas Áridas (ICARDA), de la Universidad de Pullman Washington, Estados Unidos, así como el material desarrollado en el INIFAP. Hay más de 15 fuentes de resistencia a *Fusarium oxysporum f*. sp. Ciceris y *Fusarium solani* en ensayos de invernadero y parcelas infectadas. En pruebas de parcelas de validación se han identificado líneas con potencial de rendimiento y tamaño de grano en las áreas productoras de Sinaloa, Sonora, Baja California y Guanajuato. HOGA-67, CUGA08-743 y HOGA-21 son líneas experimentales identificadas en ensayos regionales de rendimiento y parcelas de validación con buenas características de calidad de grano. Actualmente, el programa de mejoramiento de garbanzo en México tiene especial interés en la obtención de variedades de grano blanco y forrajero con las características exigidas por la industria y los consumidores.

Palabras Clave: Calidad de grano, *Fusarium oxysporum, Fusarium solani*

INTRODUCCION

El garbanzo es la segunda leguminosa de grano cultivada más importante en el mundo, por su alto valor nutritivo, uso y preferencia. La producción nacional se destina mayormente al consumo humano y principalmente como grano de exportación. En menor cantidad se destina para el consumo nacional y en algunas regiones se produce para consumo fresco mientras que en otras el grano es producido para la formulación de alimentos balanceados en la industria porcicola [1]. El cultivo del garbanzo es una de las mejores opciones por sus bajos requerimientos de agua y por su alta importancia económica, es un generador de divisas por ejemplo en un periodo de cinco años, se ha logrado obtener más de cien millones de dólares en la venta de la producción en el mercado internacional [2]. En el 2015, según datos del sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera [3] se sembró en México una superficie de 81,262 hectáreas con una producción de 126,589 toneladas y un rendimiento promedio de 1.6 ton/ha. La región noroeste, es la principal área productora. Los estados de Sinaloa, Sonora y Baja California Sur ocuparon en ese año mas de 60,000 has de superficie sembrada. La producción se exporta hacia España, Argelia, Italia, Turquía y Portugal [4]. El garbanzo conocido internacionalmente como “tipo mexicano” se basa en la forma, color y sobretodo calibre de grano (30granos/30g) que producen las variedades desarrolladas en México. El programa de mejoramiento genético de garbanzo del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) ha registrado y puesto a disposición de los

agricultores más de 18 variedades de garbanzo mejoradas entre ellas la variedad Blanco Sinaloa-92 que ocupa el 90% de la superficie de siembra dedicada a este cultivo [5,2]. Sin embargo, uno de los principales problemas que enfrenta el cultivo es la alta incidencia de enfermedades sobre todo de la raíz ocasionada por *Fusarium solani y Fusarium oxysporum f sp. ciceris*. A continuación se detallan las principales acciones del programa de mejoramiento genético del INIFAP en el cultivo de garbanzo en el noroeste de México.

MATERIALES Y METODOS

Sitios de estudio

El programa de mejoramiento del INIFAP en la región noroeste se divide en dos sitios. A principios de 1960 se estableció en el Campo Experimental Valle de Culiacán (CEVACU) en Culiacán, Sinaloa y posteriormente en el Campo Experimental Costa de Hermosillo (CECH) en Hermosillo, Sonora [6,7,8]. Los dos programas de mejoramiento trabajan de manera conjunta pero generan materiales distintos adaptados para estas regiones debido a que los ambientes de producción son diferentes. Además, existen otros sitios de estudio en donde se realizan evaluaciones en ensayos regionales de rendimiento. Estos sitios son el Campo Experimental Valle del Fuerte (CEVAF) en Juan José Ríos, Sinaloa, Campo Experimental Norman E. Borlaug (CENEB) en Navojoa y Obregón, Sonora, Campo Experimental Todos los Santos (CETOD) en Cd. Constitución, Baja California Sur y el Campo Experimental del Bajío (CEBAJ) en Celaya Guanajuato.

Fuentes de resistencia a enfermedades

La evaluación de fuentes de resistencia y líneas avanzadas resistentes a enfermedades se realiza en los campos experimentales CECH, CEVACU y CEBAJ. Se utiliza material del Instituto Internacional de Investigaciones de Cultivos para las Zonas Tropicales Semi-aridas (ICRISAT) y el Centro Internacional de Investigaciones Agrícolas en las Zonas Áridas (ICARDA), material de la Universidad Estatal de Washington, E.U. y material generado por el INIFAP. Las evaluaciones van dirigidas principalmente para hongos de la raíz como *Fusarium oxysporum f. sp. Ciceris*, *Fusarium solani, Rhizoctonia solani, Macrophomina phaseolina y Sclerotium rolfsii* en condiciones de campo e invernadero. En los invernaderos y laboratorios del CEVACU y CEBAJ, se realizan inoculaciones artificiales utilizando plantas diferenciales. Se evalúan características morfológicas de los hongos en estudio así como sintomatología y reacción de las plantas inoculadas [9,10]. En cuanto a enfermedades foliares se refiere, también se evalúan algunos genotipos sobre todo contra mildiu (*Peronospora ciceris*) y roya (*Uromyces ciceris*) [11].

Cruzamientos y poblaciones segregantes

De los resultados de la evaluación de los lotes de fuentes de resistencia se seleccionan progenitores para hacer cruzamientos involucrando variedades comerciales y otros materiales avanzados en los dos centros de mejoramiento. También se seleccionan materiales para mejorar la estructura de la planta y tener variedades tipo erecto dirigido al desarrollo de variedades de trilla mecánica directa. Así también se selecciona para obtener tamaño, color y forma para un mercado de exportación. Para esto se realizan cruzas simples, retrocruzas y cruzas múltiples para incorporar las características deseadas. A partir de la segunda generación de segregación (F2), se cosecha en forma masal y se selecciona por tamaño y color de grano hasta la F4. En la F5 se selecciona planta individualmente en lotes infectados con

enfermedades radiculares y en la F6 se selecciona en forma masal considerando las características de calidad de grano.

Ensayo regional uniforme de rendimiento y parcelas de validación

Este ensayo de rendimiento incluye las líneas elite de los programas de mejoramiento de Hermosillo (líneas HOGA) y de Culiacán (líneas CUGA) evaluadas en los diferentes campos experimentales mencionados. El experimento se establece en un diseño experimental de bloques completos al azar o en un latice dependiendo del número de materiales propuestos a evaluar. La fecha de siembra varia según el sitio de estudio es decir, la fecha de siembra optima en el centro de Sinaloa es la primera semana de noviembre mientras que para el estado de Sonora el ensayo llega a establecerse hasta el 15 de diciembre. Se establecen parcelas de validación en lotes de producción de áreas garbanceras con agricultores cooperantes. En cada localidad se seleccionan las líneas HOGA y CUGA sobresalientes que provienen del ensayo regional de rendimiento comparado con un testigo regional. Por cada genotipo se siembran parcelas de 6-8 surcos de 20 a 30m de largo con dos repeticiones. A la madurez, se cosechan por cada genotipo-repetición dos muestras de dos surcos de 5m cada una.

RESULTADOS

Resistencia a enfermedades

De pruebas realizadas en invernadero, las líneas desarrolladas en Culiacán (CUGAS) muestran susceptibilidad a *F. solani* y moderada resistencia a *F. oxysporum*, mientras que por lo menos 15 líneas de Hermosillo (HOGAS) resultaron resistentes a los dos patógenos. En cuanto a enfermedades foliares se refiere, la roya de la hoja (*Peronospora ciceris)* no se han identificado líneas con marcada resistencia debido a lo errático de la enfermedad. Para este último hongo se tiene material para conformar un ensayo identificar fuentes de resistencia en la región centro de Sinaloa y sur de Sonora.

Cruzamientos y poblaciones segregantes

Se identificaron las variedades Progreso-95 y Jamu-92 con tallos erectos y resistentes a enfermedades para seleccionarse como nuevos progenitores en el programa de cruzas. Existe un avance generacional de F2-F6 de diferentes poblaciones para resistencia a enfermedades y mejorar calibre de grano y tallo erecto. Se cuenta con familias F2-F3 de las cruzas Blanco Sinaloa-92 X ILC-3800, Blanco Sinaloa-92 X ILC-3421, Blanco Sinaloa-92 X ILC-12236, Jumbo-2010 X ILC-3421 y Jumbo-2010 X ILC-3800 y Jumbo-2010 X ILC-12236.

Ensayo Regional Uniforme de Rendimiento y Parcelas de Validación

Como resultado de las evaluaciones llevadas a cabo en las diferentes regiones productoras del noroeste de Mexico en los ciclos 2011-2012 y 2012-2013, se identificaron las líneas HOGA-021, HOGA-067 y CUGA08-743 para proponerlas ante el Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS) para proponer su registro como variedades comerciales. El cuadro 1 muestra el rendimiento promedio y características de calidad de exportación de las líneas candidatas comparadas con el testigo Blanco Sinaloa-92 evaluadas en cinco localidades del noroeste de México.

Cuadro 1. Rendimiento, calibre y porcentaje de grano de exportación de tres líneas sobresalientes de garbanzo y el testigo comercial Blanco Sinaloa 92 evaluadas en ensayos regionales de rendimiento y

parcelas de validacion en cinco localidades del noroeste de México. Promedio de los ciclos O-I 2011-2012 y 2012-2013.

Línea/Variedad	Rendimiento (Kg/Ha)	Calibre grano*	Porcentaje de exportación
HOGA-67	2,396	42	94
CUGA08-743	2,331	44	95
HOGA-21	2,289	47	94
BLANCO SINALOA-92	2,161	46	94

*Número de granos/30g

DISCUSION

De acuerdo a resultados preliminares [10,12], se ha logrado avanzar en la resistencia de las líneas avanzadas generadas en el estado de Sonora para *F. solani y F. oxysporum* raza 5. En cuanto a las líneas CUGAS liberadas para el estado de Sinaloa, se tiene una reacción de moderada resistencia para *F. oxysporum* raza 5 no así para *F. solani* de moderadamente-susceptible. Lo anterior pueda atribuirse a que según lo referido por otros estudios [12], la presión o presencia de *F. solani* es predominante en las zonas productoras de Sonora, por lo que la selección de las líneas CUGAS en Sinaloa ha sido diferente por la mayor incidencia del hongo. La comparación de variedades por hábito de crecimiento, calidad de grano y resistencia a enfermedades facilita la selección de progenitores [11] y al respecto, las variedades Blanco Sinaloa-92, Jumbo-2010, Progreso-95 y Jamu-92 seguirán utilizándose en los programas de cruzamiento.

CONCLUSIONES

Los materiales desarrollados en el estado de Sonora muestran mayor reacción de resistencia a fusariosis que los materiales del programa de mejoramiento de Sinaloa bajo inoculación artificial. Las variedades Blanco Sinaloa-92, Jumbo-2010, Progreso-95 y Jamu-92 seguirán utilizándose como progenitores para mejorar el hábito de crecimiento y calidad de grano. Las líneas avanzadas HOGA-021, HOGA-067 y CUGA08-743 son líneas candidatas a variedades comerciales para el noroeste de México.

REFERENCIAS

[1] Acosta, G. J. A., Salinas P. R. A., Ortega, M. P. F., Padilla, V. I., Fierros, L. G. A. y Valenzuela, H. V. 2013. Programa de investigación de garbanzo en el INIFAP. En: pp 11-18. Maldonado, N. L. A., Ortega, M. P. F. y Grageda, G. J. (Eds.). Simposio Nacional de Garbanzo. Hermosillo, Sonora. Memoria Técnica No. 33. CIRNO-INIFAP. 141 p.

[2] 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.

[3] SIAP, 2015. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Secretaria de Agricultura Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación SAGARPA. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. http//www.siap.gob.mx Consultado agosto del 2015.

[4] Palau, B.E.E. 2014. Una reflexión sobre la exportación de garbanzo en el siglo XX1. En: pp 24-30. Maldonado, N. L. A., Ortega, M. P. F. y Grageda, G. J. (Eds.). Simposio Nacional de Garbanzo. Hermosillo, Sonora. Memoria Técnica No. 33. CIRNO-INIFAP. 141 p.

[5] Gómez, G. R. M., Gómez G. L. y Salinas P. R. A. 2003. Blanco Sinaloa-92, Variedad de garbanzo blanco para exportación. SAGARPA-INIFAP-CIRNO-C.E. Valle de Culiacán. Folleto Técnico No. 24.

[6] Gómez, G. R. M. 2014. Historia del garbanzo leguminosa importante en la alimentación. En: pp 13-23. Maldonado, N. L. A., Ortega, M. P. F. y Grageda, G. J. (Eds.). Simposio Nacional de Garbanzo. Hermosillo, Sonora. Memoria Técnica No. 33. CIRNO-INIFAP. 141 p.

[7] Manjarrez-Sandoval, P., Morales-Gómez, J.A., Garcia-Perez, 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". (2006), in Primer Encuentro Regional de Integrantes del Sistema Producto Garbanzo en Sinaloa. (Pérez, V.J.J. y Avilés, G.M.C, Eds.). INIFAP-CIRNO, Campo Experimental Valle de Culiacán, Memoria Núm. 1, Primera Edicion, Culiacan Sinaloa, 4-14.

[8] Morales, G. J. A. Durón, L. J., Martínez, D. G., Núñez, M. J. H. y FU, C. A. A. 2004. El cultivo de garbanzo blanco en Sonora. Libro Técnico No. 6. CIRNO-INIFAP. 272 p.

[9] Guerrero-Aguilar, B.Z., Acosta-Gallegos, J.A., Gonzalez-Chavira, M.M., Fierros-Leyva, G.A., Ortega-Murrieta, P.F. y Licea-Elias, R. 2014. Identificación de genotipos de garbanzo resistentes a pudriciones de raíz por *Rhizoctonia solani.* En: pp 128-134. Maldonado, N. L. A., Ortega, M. P. F. y Grageda, G. J. (Eds.). Simposio Nacional de Garbanzo. Hermosillo, Sonora. Memoria Técnica No. 33. CIRNO-INIFAP. 141 p.

[10] Velarde, F. S., Cárdenas, M.L., López, M.R., Zamora, G, F., Valdez, R.N., Fierros, L., G., A., Ortega, M., P.F., Padilla, V. I., Rodríguez, C.F.G., Gutierres, PE. Y Sauceda A. R.H. 2014. Resistencia Genética de genotipos de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) a la fusariosis bajo condiciones controladas. En: 42-47. Maldonado, N. L. A., Grageda, G. J. Ortega, M. P. F. y Fierros, L.G.A. (Eds.). II Simposio nacional de garbanzo. Hermosillo, Sonora. Memoria Técnica No. 35. CIRNO-INIFAP. 159p.

[11] Padilla, V. I., Valenzuela, V.R.I., Armenta, C.C.M., Salinas, P.R.A., y Sánchez, S. E.2008. Comportamiento agronómico de genotipos de garbanzo en siembra tardía en el Valle del Mayo, Sonora México. Revista Fitotecnia Mexicana 31 (1):43-49.

[12] Velarde, F.S., Zamora-Galván, F., Valdez-Rubio, N., Cárdenas-Molina, L., López-Molina, R., Valdés A.J.A., Fierros-Leyva, G.A., Ortega-Murrieta, P.F., Padilla-Valenzuela, I. y Gutierres-Pérez, E. 2013. Distribución y presencia de fusariosis del garbanzo (Cicer arietinum L.) en el noroeste de México y búsqueda de resistencia en condiciones controladas. En: pp 54-64. Maldonado, N. L. A., Ortega, M. P. F. y Grageda, G. J. (Eds.). Simposio Nacional de Garbanzo. Hermosillo, Sonora. Memoria Técnica No. 33. CIRNO-INIFAP. 141 p.

HOMOLOGY F420-DEPENDENT METHYLENE TETRAHIDROMETANOPTERINA DEHYDROGENASE OF *Methanopyrus kandleri* IN METHANOGENIC ARCHAEA

(Homología de la f420-dependent methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase de *Methanopyrus kandleri* en arqueas metanógenas)

José Guadalupe Estrella de los Santos [a*], Alvarado Rivera María Guadalupe [a], Alejandro Brena-Becerril [a+].

[a] Universidad Politécnica Metropolitana de la Zona Metropolitana de Guadalajara, Jalisco, Campus Cajititlan.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: abrena2012upzmg@mail.com

Área del conocimiento: Biocombustibles.

ABSTRACT
Methanopyrus Kandleri is a microorganism methanogenic *Archaea* domain and is the only genus in the *Methanopyrus* class. It comprises a single species described, *M. kandleri.* This archaea only found in hydrothermal vents 2000 m depth in the Gulf of California and volcanoes. Live in environments rich in hydrogen and carbon dioxide, which transforms them into methane through a process called methanogenesis. This is carried out by coenzyme F420, who is responsible for the reduction of CO2 to methane means of hydrogen, which acts as an electron donor to carry out the same. The goal is to generate a phylogenetic-evolutionary tree through a protean-bioinformatic analysis for find a homologous microorganism in the coenzyme F420. This to carry out the process of methanogenesis, which is defined as the final stage of anaerobic digestion from two main routes: the acetoclastic and hidrogenotrófica. Was used as the sequence as a probe F420 dependent *Methanopyrus kandleri* dehydrogenase methylenetetrahydromethanopterin. We obtained 57 possible sequences of the F420, divided into 6 groups chosing to *Methanospirillum hungatei* as the homologous sequence of interest in group 3, while the probe sequence is in group 6; this suggests that share a high homology with some variations as they would growth characteristics, habitat or a better performance in methanogenesis.

Keywords*: Methanopyrus kandleri*, Methanogenesis, Coenzyme F420, Bioinformatics.

EVALUATION OF OIL YIELD IN ECOTYPES OF *Jatropha curcas* AS AN ALTERNATIVE FOR BIOFUELS PRODUCTION IN COLIMA STATE, MÉXICO.

(Evaluación del rendimiento de aceite en ecotipos de *Jatropha curcas* como alternativa de producción de biocombustibles en el estado de Colima, México)

Nayeli Quiñones-Islas[a]*+, Karina García-Mariscal[a], Mario Orozco-Santos[a], Fabricio Lazcano-Escobar[b], Nadia Martínez-Ramírez[a]

[a] Campo Experimental Tecomán, Centro de Investigación Regional Pacífico Centro del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.
[b] Planta piloto del departamento de Bioquímica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: quinones.nayeli@inifap.gob.mx

Área del Conocimiento: Biocombustibles

ABSTRACT
Biofuel production has become a focus of global attention, in response to future problems of shortages of petroleum fuels. In the Colima state, it has taken the initiative to create alternatives for the production of renewable fuels. The present study was conducted to identify ecotypes of *Jatropha curcas*, that present the best oil yields for the production of biodiesel. Biodiesel is an organic fuel that is derived from the processing of vegetable oil, which is extracted from the seeds of oilseed crops such as *J. curcas*. A study was carried out in the Food Science Laboratory of Tecomán Experimental Field, where oil yields of seeds were evaluated in 20 ecotypes of *J. curcas*, collected in the states of Colima, Michoacán and Jalisco. The AOAC official method Am 5-04 was used to oil extraction in triplicate, reporting the average expressed in percentage. Ecotypes that showed the best results were Col-Tec-Col and Col-Gr-Col, having high oil content, which could be considered as a viable alternative for the production of biodiesel.

Keywords: Biofuels, biodiesel, oil, ecotypes, yield.

RESUMEN
La producción de biocombustibles se ha convertido en un foco de atención a nivel mundial, en respuesta a futuros problemas de desabasto de los combustibles derivados del petróleo. En el estado de Colima, se ha tomado la iniciativa de generar alternativas para la producción de combustibles renovables. El presente estudio se realizó con el objetivo de identificar los ecotipos de *Jatropha curcas*, que presenten los mejores rendimientos de aceite para la producción de biodiesel. El biodiesel es un combustible orgánico que se obtiene a partir del procesamiento de aceites vegetales, el cual es extraído de las semillas de cultivos oleaginosos como la *J. curcas*. En el laboratorio de Bromatología del Campo Experimental Tecomán, se llevó a cabo un estudio, en donde se evaluaron los rendimientos de aceite en semillas de 20 ecotipos de *J. curcas*, colectados de los estados de Colima, Michoacán y Jalisco.

Empleando el método Am 5-04 de la AOAC, se llevó a cabo la extracción de aceite por triplicado, reportando la media expresada en unidades de porcentaje. Los ecotipos que mostraron los mejores resultados fueron Col-Tec-Col y Col-Gr-Col, al tener altos contenidos de aceite, los cuales podrían considerarse como alternativa viable para la producción de biodiesel.

Palabras Clave: Biocombustibles; biodiesel; aceite; ecotipos; rendimiento.

INTRODUCCIÓN

La producción de biocombustibles se ha convertido en un foco de atención a nivel mundial, en respuesta a futuros problemas de desabasto de los combustibles derivados del petróleo. En México, se investiga el uso de aceites vegetales no comestibles, con el fin de evitar competencia con la producción de alimentos, por lo que ha sido necesario buscar alternativas con cultivos de altos contenidos de aceite útiles para la producción de biodiesel [1]. En el estado de Colima, se ha tomado la iniciativa de generar alternativas de producción de cultivos oleaginosos, que sean destinados a la generación de combustibles renovables [3]. El biodiesel, es un combustible orgánico obtenido a partir de aceites o grasas vegetales, el cual puede ser extraído de las semillas de cultivos oleaginosos como la *Jatropha curcas* [1]. Las semillas de *J. curcas* contienen entre el 28 y 50% de aceite, el cual tiene una dvicensidad promedio de 0,933 $g \cdot cm^{-3}$. En la actualidad no existen variedades para su cultivo, por lo que se emplean ecotipos silvestres en su producción. Al utilizar ecotipos silvestres es muy variable la productividad que puede alcanzar, la que oscila entre 2 y 4 kg de semilla por árbol o 12,000 kg de semilla por ha por año. Las densidades de plantación más comunes oscilan entre 1,100 y 3,300 árboles por ha [2].

METODOLOGÍA

En el Laboratorio de Bromatología de la Unidad de Laboratorios del Campo Experimental Tecomán-CIRPAC, INIFAP; se llevó a cabo la extracción del aceite contenido en las semillas de *Jatropha curcas* para lo cual se utilizó un equipo de extracción marca ANKOM modelo XT-15, el cual se basa en la determinación rápida de grasa y aceite por medio de la extracción con solvente a alta temperatura (ANKOM Technology Method 2; 01-30-09 AOCS Official Procedure Am 5-04). Los experimentos fueron realizados por triplicado para cada uno de los 20 ecotipos evaluados, utilizando un aproximado de 3 g por muestra procesada, reportando la media expresada en unidades de porcentaje de aceite basado en el peso total de la semilla.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en la evaluación de rendimientos de aceite de los 20 ecotipos evaluados de *Jatropha curcas*, mostraron diferencias significativas entre sí. En la Figura 1, se reporta la media y la desviación estándar expresada en unidades porcentuales del contenido de aceite en base al peso total de la semilla.

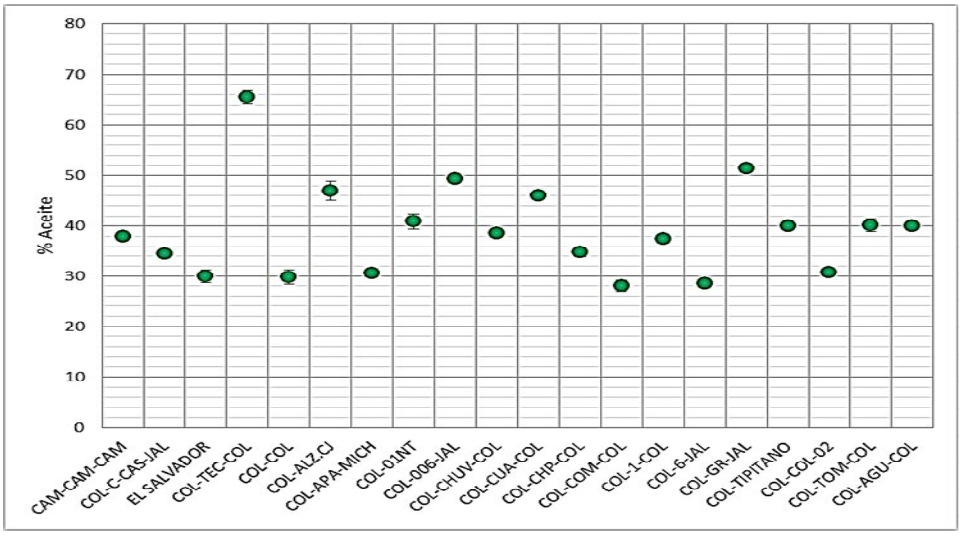


Figura 1. Evaluación de rendimientos de aceite en unidades porcentuales de 20 ecotipos de *Jatropha curcas.*

DISCUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos, se observó que el ecotipo COL-TEC-COL mostró mejores resultados que el resto de los ecotipos analizados, al presentar un porcentaje de aceite del 65.5%, seguido por el ecotipo COL-GR-COL con un 51.4%. Logrando obtener un rango de porcentaje de aceite de *Jatropha curcas* que oscila del 28% al 65%, lo cual es cercano a lo reportado por Paneque en 2012. Por otro lado, se logró determinar que el ecotipo COL-TEC-COL sobresale de entre los demás ecotipos evaluados, por tanto, se sugiere continuar con la evaluación tanto en campo como en laboratorio, con la finalidad de lograr su caracterización, así mismo será importante considerar los rendimientos de semilla de cada ecotipo, ya que la combinación de rendimiento de aceite y de semilla darán la pauta para elegir el más promisorio.

CONCLUSIONES

Los ecotipos COL-TEC-COL y COL-GR-COL presentaron los mejores rendimientos de aceite, los cuales podrían ser utilizados en programas de establecimiento y producción de biodiesel en el estado de Colima, México.

REFERENCIAS

[1] Martínez, V. B. B.; Zamarripa, C. A. y Solís, B. J. L. 2011. Caracterización química del aceite de semillas de piñón mexicano (*Jatropha curcas* L.) In: VI reunión nacional de investigación agrícola. León, Guanajuato, México. pág. 225.

[2] Paneque, M. 2012. Expansión de la frontera agrícola mediante la adaptación y validación de Jatropha en Chile. Seminario Bioenergía, Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad de Chile, Santiago, Chile. pág 53-59.

[3] Quiñones INS, García MK y Orozco SM. 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. pág. 253.

SCREENING OF FUNGAL STRAINS FROM CIATEJ'S COLLETION TO SEARCH HYDROLASES

(Cribado de hongos de la colección de cepas de CIATEJ para la búsqueda de hidrolasas)

José Marcos Vargas Sánchez[a]*, Xochitl Niehus[a], Ayala-Mendivil[a], Leticia Casa-Godoy[a], Georgina Sandoval[a+].

[a]Departamento de Biotecnología Industrial, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C (CIATEJ).

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: gsandoval@ciatej.mx / gsandoval@confluencia.net

Área del Conocimiento: Biocombustibles.

ABSTRACT
Enzymes are biological catalysts that accelerate or catalyze chemical reactions and have many applications due to their active power, specificity, stability in mild conditions, and biodegradability. In particular, hydrolases are important enzymes that are able to break molecules with high molecular weight by catalyzing hydrolysis reactions. Among their uses outstands the obtaining of simple molecules from complex wastes (such as lignocellulosic materials, used oils, aquaculture and food residues), that can be used to later produce biofuels like ethanol, biodiesel and biotubosine. CIATEJ's strains collection (Colección de cepas de CIATEJ, CCC) has a lot of wild type fungal strains without known potential applications. In this way, the main objective of this work was to make screenings to find strains capable to produce different hydrolases between 139 fungal strains from CCC (13 filamentous fungi and 126 yeasts). We focused on the search of strains that produce xylanases, cellulases, esterases, chitinases and proteases. For that purpose, we performed qualitative screenings on agar plates, with different formulations for each type of enzyme, that made possible to determine if the hydrolase was produced and how good producers the strains were. All strains had the capacity to produce at least one type of hydrolase, although there were strains that produced more than one. Among the fungal strains, 2 fungi and 7 yeast were capable to produce all types of tested hydrolases, indicating their metabolic versatility and expanding their range of potential applications. Specifically from the filamentous fungi the number of good producers of each type of enzymes were: xylanases 4, cellulases 5, esterases 10, chitinases 2 and proteases 3. While from the yeasts the number of good producers of each type of enzymes were: xylanases 3, cellulases 25, esterases 11, chitinases 19 and proteases 11. This information is useful for future researches.

Keywords: hydrolases, screening, filamentous fungi, yeasts.

INTEGRAL STUDY OF *Ricinus communis* SEED: EFFECT OF DRYING PROCESS ON THE MICROSTRUCTURE, YIELD AND QUALITY OIL AND BIODIESEL.

(Estudio integral de la semilla de *Ricinus communis*: effecto del proceso de secado sobre la microestructura, rendimiento y calidad del aceite y biodiesel).

Stephany Magaly Mora-Juárez[a], Carolina Rodríguez-Pineda[a*], María de Jesús Perea-Flores[b1+], Sergio Odin Flores-Valle[a], Israel Arzate-Vázquez[b2], Juan Vicente Méndez-Méndez[b2], Daniel Arrieta-Báez[b3].

[a]Laboratorio de Química Verde. Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias Extractivas.
[b1] Laboratorio de Microscopia confocal-multifotónica;
[b2]Laboratorio de Microscopía de Fuerza Atómica y Nanoindentación;
[b3]Laboratorio de Espectrometría de Masas. Centro de Nanociencias y Micro y Nanotecnologías, IPN.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: peflo_ma@hotmail.com

Área del Conocimiento: Biocombustibles.

ABSTRACT
Ricinus communis seed is an alternative crop that is used in the energy industry for the biodiesel production. The aim of this research was to study the effect of drying process on the microstructure, oil extraction and their quality and biodiesel production. Seeds were dried by fluidized bed at 80-110 °C for 240 min (Conditions A), and 120-50 min (Conditions B); after the microstructural changes on the seed coat was evaluated by scanning electron microscopy and mechanical methods. The oil was extracted by the soxhlet method, and oil yields were determined. Oil quality was determined by analytical methods and Nuclear Magnetic Resonance (NMR). Ricin oil was transformer by means of transesterification reaction for producing biodiesel, the calculated conversion yields and the reaction was validated through Thin Layer Chromatography (TLC) and NMR. Microstructural changes induced by drying process on the coat were associated with mechanical compression tests, the maximum force to fracture was 67.5 N to 62 N for native and dried seed; these data are useful for hulling processes. High drying temperatures increased destruction of cell structures in the endosperm, which was noticeable in the oil extraction yields obtained for the conditions A (61 to 64%) compared to untreated seeds (53.2%), Conditions B were obtained from 28 to 35% oil. Oil quality for 90 to 110°C showed lower qualities compared with 80°C, regardless of the temperature; it was affected by drying time. NMR spectra confirmed the principal fatty acids of oil (ricinoleic and linoleic acid). Partial conversion (biodiesel) was 27-65% for Condition A, and 21-67% for Condition B. TLC confirmed the biodiesel presence, and NMR was observed a change in the chemical structure of fatty acid. This research is important on the basic and applied knowledge related to better use and exploitation of R. *communis* seed in the energy industry.

Keywords: *Ricinus communis*, biodiesel, transesterification.

OVEREXPRESSION, PRODUCTION AND SECRETION OF *Myxobacter* sp. AL-1 GLICOSILHIDROLASE Cel48 IN *Bacillus subtilis*

(Sobreexpresión, producción y secreción de la glicosilhidrolasa Cel48 de *Myxobacter* sp. AL-1 en *Bacillus subtilis*)

Saúl Uriel Corona Bautista[a]*, Norma Ramírez Ramírez[a], Mario Pedraza Reyes[a+]

[a]Universidad de Guanajuato, División de Ciencias Naturales y Exactas, Departamento de Biología.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: pedrama@quijote.ugto.mx

Área del Conocimiento: Biología Molecular.

ABSTRACT
Cellulose is the most abundant biopolymer in the atmosphere (Ramírez Ramírez, 2008). Cellulose residues are generated in nature from decaying organic matter from trees and fungi, although some industries also produce this type of waste. The use of hydrolytic enzymes is a non-contaminant way of recycling such waste. *Myxobacter* sp. AL-1 is a soil microorganism that produces a battery of enzymes required to degrade cellulose (Tellez Valencia, 2003). Our working group, has previously designed *Bacillus subtilis* strains that overexpress endocellulase (*cel9*) and xylanase (*xynA*) genes form *Myxobacter* sp. AL-1 (Ramírez Ramírez, 2009); however, we still lack of a gene construct capable of overexpressing in the same genetic background an exocellobiohydrolase encoding gene; being this activity, together with the aforementioned enzymes, necessary for the efficient degradation of cellulose. The open reading frame of *cel48* from *Myxobacter* sp. AL-1 was amplified by PCR and the amplification product was cloned into the expression vector pDG148. The construct obtained (pDG148-*cel48*) was introduced by transformation into competent cells of *Bacillus subtilis*. A strain of *Bacillus subtilis* containing this construct was capable of overexpressing, synthesizing and exporting to the culture medium the recombinant enzyme Cel48 from *Myxobacter* sp. AL-1. The extracellular enzyme Cel48 obtained is active and it can degrade different forms of cellulose.

Keywords: Cellulose, Glycosyl hiidrolases, *Bacillus subtilis*, *Myxobacter* sp. Al-1

RESUMEN
La celulosa es el biopolímero más abundante en la biosfera (Ramírez Ramírez, 2008). Los residuos de celulosa son generados en la naturaleza por descomposición de árboles y hongos así como de diferentes desechos industriales. El uso de enzimas hidrolíticas es una forma no contaminante de reciclar este tipo de desechos. *Myxobacter* sp. AL-1 es un microorganismo aislado del suelo que produce una batería de enzimas requeridas para degradar celulosa (Téllez Valencia, 2003). En nuestro grupo de trabajo hemos obtenido cepas de *Bacillus subtilis* que sobreexpresan genes de una endocelulasa (*cel9*) y una xilanasa (*xynA*), sin embargo no hay una construcción que sobreexprese en el mismo fondo genético una exocelobiohidrolasa; siendo esta actividad, en conjunto con las anteriores, necesarias para la eficiente degradación de celulosa. El Marco de Lectura Abierto de *cel48* de *Myxobacter* sp. AL-1 fue amplificado por PCR y el producto de amplificación se clonó en el vector de expresión pDG148. La construcción

obtenida fue introducida por transformación en células competentes de *B. subtilis.* La cepa de *B. subtilis* obtenida fue capaz de sobreexpresar, sintetizar y excretar al medio de cultivo la enzima recombinante Cel48. La enzima extracelular Cel48 obtenida es activa y puede degradar diferentes formas de celulosa.

Palabras Clave: Celulosa, Glicosil Hidrolasa, *Bacillus subtilis*, *Myxobacter* sp. Al-1

INTRODUCCIÓN

La celulosa se encuentra constituida por residuos de D-glucosa unidos por enlaces β-1,4. En estado natural, cada cadena de celulosa contiene de 100 a 14,000 residuos de glucosa [1]. La transformación de celulosa a carbono y energía es llevada a cabo en gran parte por microorganismos del suelo. Estos microorganismos producen enzimas extracelulares (celulasas) capaces de degradar celulosa mediante el corte del enlace β-1,4-glicosidico [2]. Estas enzimas han sido clasificadas en dos grandes grupos de acuerdo a su modo de acción: endo-1,4-β-glucanasas y exo-1,4-β-glucanasas [3]. Las celulasas son de gran interés por su aplicación en la degradación y reciclaje de los residuos de celulosa que se producen a nivel industrial y en la naturaleza [4]. *Myxobacter* sp. AL-1, un microorganismo Gram negativo aislado del suelo, mostró la capacidad de crecer en un medio mínimo conteniendo celulosa como única fuente de carbono. Esta bacteria secreta de manera diferencial durante su ciclo de vida, al menos 5 celulasas [5]. En el operón *cel9-cel48* de *Myxobacter* sp. AL-1, se encuentran codificadas una endocelulasa y una exocelulasa respectivamente [6] cuyos productos podrían actuar de manera sinérgica, junto con otras glicosilhidrolasas, en la degradación de celulosa. En nuestro grupo de trabajo hemos generado anteriormente una cepa de *B. subtilis* que sobreproduce y secreta al medio de cultivo a la endocelulasa Cel9 [1,6], pero no existía una construcción génica equivalente que permita sobreexpresar y excretar a la enzima Cel48 en este contexto genético. Es posible que la expresión convergente de *cel9* y *cel48*, junto con el gen *xynA*, que codifica para una xilanasa, resulte en una cepa de *B. subtilis* útil en la degradación de residuos celulolíticos para su aplicación en distintos ámbitos industriales.

MÉTODOS

Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de crecimiento y selectividad. Las cepas bacterianas, así como los plásmidos que se utilizaron en este trabajo se listan en la Tabla 1. Para el crecimiento de *E. coli* y *B. subtilis* se utilizó el medio de cultivo Luria-Bertani (LB; [8]). Cuando se requirió los medios fueron suplementados con IPTG (0.5 mM y 2 mM), ampicilina (Amp; 100 µg/ml) y kanamicina (Kan; 10 µg/ml).

Tabla 1. Cepas empleadas en este estudio

Cepa o plásmido	Descripción	Referencia
PERM123	*E. coli* DH5α conteniendo el plásmido pPERM123.	Lab. MPR
PERM1215	*E. coli* DH5α conteniendo el plásmido pPERM1215	Este estudio
PERM1223	*E. coli* XL10GOLD conteniendo el plásmido pPERM1223; Amp^R, Kan^R.	Este estudio
PERM1259	*B. subtilis* conteniendo el plásmido pPERM1223; Amp^R, Kan^R.	Este estudio

PERM1272	*B. subtilis* conteniendo el plásmido pDG148	Este estudio
pDG148	Vector de expresión para *B. subtilis*; Amp^R, Kan^R.	[10]
pJET 1.2.	Vector de clonación; Amp^R	Thermo Scientific
pPERM123	pBR322 con un fragmento EcoRI-EcoRI de 6 kpb conteniendo el operón *cel9-cel48* de *Myxobacter* Sp. AL-1; Amp^R, Tc^R	Lab. MPR
pPERM1215	pJET conteniendo el marco de lectura abierto del gen *cel48* de *Myxobacter* sp. AL-1 insertado entre los sitios de corte SalI y SphI	Este estudio
pPERM1223	pDG148 conteniendo el marco de lectura abierto de *cel48* de *Myxobacter* Sp. AL-1 insertado entre los sitios SalI-SphI; Amp^R, Kan^R.	Este estudio

Técnicas de genética y biología molecular. La preparación de células competentes de *E. coli* y *B. subtilis*, y su transformación con ADN plasmídico se efectuaron de acuerdo a los métodos descritos por Boylan y col (1972) y Sambrook y Russel (2001), respectivamente [7, 8]. Para la extracción de ADN cromosómico de *B. subtilis* se siguió el protocolo descrito por Cutting y Vanderhorn (1990) [9]. La obtención de ADN plasmídico a pequeña escala, la manipulación enzimática y el análisis electroforético de ADN en geles de agarosa se llevó a cabo utilizando técnicas estándar [8].

Reacción de PCR para la amplificación del gen *cel48*. Usando como templado el plásmido pPERM123 (Tabla 1), se amplificó un fragmento de 2150 pb desde el nucleótido 2159 al 4309 conteniendo el marco de lectura completo de *cel48* [11] por PCR empleando los siguientes oligonucleótidos sintéticos: 5´-GCGTCGACAAACGAAAGCTTGAAGCT-3´ (oligo directo con sitio de corte para SalI, subrayado) y 5´-GCGCATGCTTATGCATTTCCGATTAA-3´ (oligo reverso con sitio de corte para SphI, subrayado). La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador (MJ Research, USA) usando Vent DNA polimerasa de acuerdo a las especificaciones del fabricante (New England Biolabs; Beverly, MA).

Electroforesis de proteínas. La electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Laemmli (1970) [12]. Las muestras d proteína provenientes de las células recombinantes fueron resuspendidas en 50 µL de buffer de carga. Las muestras de proteína provenientes del medio de crecimiento fueron precipitadas con ácido tricloroacético (TCA) en hielo por 60 min, el TCA fue posteriormente eliminado por centrifugación; la pastilla obtenida fue lavada con etanol absoluto frio y resuspendida en 50 µL de buffer de carga. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie, desteñidos con metanol: ácido acético (40:10 v/v) y fotografiados.

RESULTADOS

Amplificación del gen *cel48* mediante PCR. El gen *cel48* se amplificó mediante PCR utilizando como templado el DNA plasmídico de la cepa PERM123 (Figura 1A), oligonucleótidos específicos y la DNA polimerasa Vent (New England BioLabs. Beverly. MA).

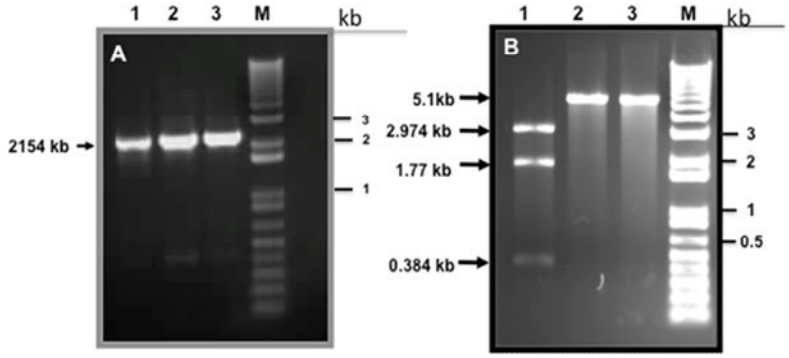


Fig. 1A,B. (A). Análisis electroforético de los productos de PCR de *cel48* (2150 pb). Se utilizaron temperaturas de alineamiento de 60, 65 y 70 °C, (carriles 1-3). (B). En mezclas de reacción independientes, el plásmido pPERM1215 se cortó con las enzimas BglII (carril 1), SalI (carril 2) y SphI (carril 3) y los productos de la reacción se analizaron en un gel de agarosa al 1%. M. Marcadores de DNA.

Clonación de cel48 en *E. coli* en el vector pJET 1.2. El gen *cel48*, amplificado por PCR, se separó y purificó de un gel de agarosa de bajo punto de fusión y se mezcló con el vector de clonación pJET 1.2, y a la reacción se le adicionó T4-DNA ligasa. La reacción de ligación se utilizó para transformar células competentes *de E. coli* DH5α. Para comprobar la presencia de la construcción, se realizaron minipreparaciones de DNA plasmídico de colonias transformantes Amp^R y se analizaron con enzimas de restricción (Figura 1B).

Clonación de cel48 en el vector de expresión para *B. subtilis* pDG148. Después de corroborar la identidad del plásmido pPERM1215, este se digirió con las enzimas SalI y SphI para liberar al gen *cel48*. Por otra parte, el vector de expresión pDG148 fue cortado con las mismas enzimas. Se montó una reacción de ligación, con T4 DNA ligasa, para insertar el ORF de *cel48* en pDG148 y los productos de esta reacción se introdujeron a células competentes de la cepa *E. coli* XL10GOLD. 5 colonias transformantes resistentes a Amp se crecieron en medio LB y se digirieron con BglII para corroborar la presencia de la construcción (Fig. 2A).

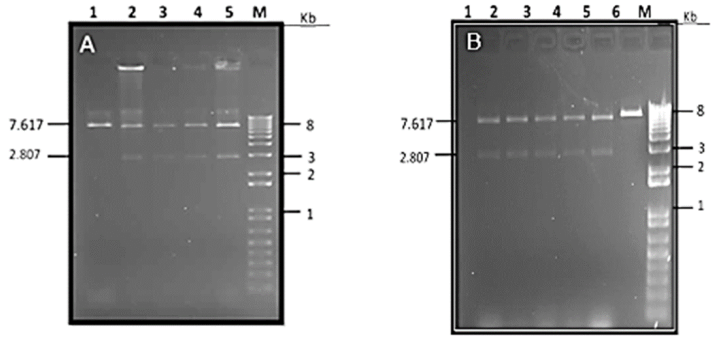


Fig. 2A,B. (A). Análisis de restricción de minipreparaciones de plásmidos aislados de 5 transformantes de *E. coli* cortados con BglII. (B) Se realizaron análisis de restricción de minipreparaciones de plásmidos

aislados de 5 colonias transformantes de *B. subtilis* PERM1259 (carriles 1-5), cortados con BglII. M, marcadores de DNA.

Obtención de cepas de *B. subtilis* para sobreexpresar a *cel48*. La construcción requerida para sobreexpresar al gen *cel48* en *B. subtilis* se denominó pPERM1223 (Tabla 1) y se utilizó para transformar células competentes de *B. subtilis*. Las células transformantes fueron seleccionadas en placas de medio LB suplementado con Kan (resistencia conferida por la construcción). Posteriormente, se corroboró la presencia del plásmido en 5 transformantes, el cual se purificó mediante un protocolo de lisis alcalina (8). Las 5 preparaciones de DNA plasmídico se trataron con la enzima de restricción BglII y los productos obtenidos se analizaron en un gel de agarosa al 1% (Figura 2B).

Expresión de *cel48* en *B. subtilis*. Para el crecimiento de la cepa *B. subtilis* PERM1259, se inocularon 50 mL de medio LB suplementado con kanamicina, el cultivo se agitó en un incubador metabólico a 37 °C hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5 a 600 nm. En este punto el cultivo se dividió en tres matraces, el primero empleado como control, el segundo y tercero suplementados con IPTG a una concentración de 0.5 mM y 2 mM respectivamente. Los cultivos se mantuvieron en agitación a 37 °C durante 8 h más. A continuación, de cada cultivo se colectaron muestras de 1 mL las cuales se centrifugaron a 13 000 *g* durante dos minutos, a continuación las muestras fueron analizadas mediante SDS-PAGE (Figura 3).

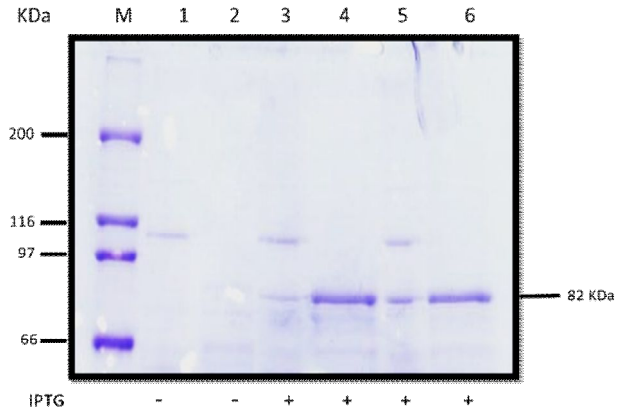


Fig. 3. Electroforesis SDS-PAGE. En el carril 1 y 2 se encuentran las muestras control de la pastilla celular y medio respectivamente. En los carriles 3 y 4 se encuentran las muestras provenientes de la fracción celular y del medio de cultivo, respectivamente, suplementado con 0.5 mM de IPTG, en los carriles 5 y 6 se encuentran las muestras de la fracción celular y medio de cultivo, respectivamente, suplementado con 2 mM de IPTG. M, marcadores de Peso Molecular.

DISCUSIÓN

Empleando un gradiente de temperaturas de alineamiento de 60, 65 y 70 °C se logró obtener un producto mayoritario de PCR, con el tamaño esperado para el ORF de *cel48* (~2150 pb). El empleo de la DNA polimerasa tipo Vent, la cual posee una alta fidelidad durante la síntesis *in vitro* de DNA, incrementó la posibilidad de obtener un producto libre de errores en la secuencia del gen *cel48*. Después de transformar células competentes de *E. coli* DH5α, las transformantes se seleccionaron en placas de LB suplementadas con ampicilina ya que el vector contiene un casete de resistencia a dicho antibiótico. Así mismo, los vectores que ligaron al gen en cuestión interrumpen un gen existente en el vector cuya expresión resulta letal, asegurándonos de esta manera que las colonias transformantes Amp^R contienen la construcción deseada. La aseveración anterior fue corroborada mediante análisis de restricción, como se muestra en la figura 1B. Posteriormente se liberó a *cel48*, el cual fue ligado en el vector de expresión pDG148, que posee un promotor P*spac*, inducible por IPTG; los productos de esta ligación, denominada pPERM1223 fueron empleados para transformar células competentes de *E. coli* XL10 Gold. Colonias resistentes a Kan obtenidas de esta transformación fueron analizadas mediante restricción con BglII en busca de un plásmido con el tamaño esperado; es decir de ~10.4 kb, tal y como se muestra en la Fig. 2A. Después de la amplificación de pPERM1223 en *E. coli*, este vector se utilizó para transformar células competentes de *B. subtilis*, analizando nuevamente con la enzima BglII si estas contenían la construcción. Los resultados de este análisis, en la Fig. 2B, demuestran que las 5 preparaciones poseen la construcción de interés. En contraste, el vector pDG148 cortado con la misma enzima, sólo genera una banda de 8.2 kb debido a que este no tiene integrado el gen *cel48*. Respecto a las preparaciones mostradas en los carriles 1-5 en la figura 2B, luego del corte con BglII se esperaban 2 bandas una de 7.617 kb y otra de 2.807 kb, ya que tanto el vector pDG148, en la posición 6162, como el gen *cel48* en la posición 384 contienen un sitio de corte para esta enzima. Estos resultados demuestran la obtención de cepas de *B. subtilis* (PERM1259) que contienen la construcción de interés (Tabla 1). La inducción para la sobreexpresión del gen *cel48* se analizó en un gel de poliacrilamida (Figura 3), y como era de esperarse, en los carriles 1 y 2 del control no se observó la banda de proteína correspondiente a la enzima Cel48 mientras que en los carriles 3 a 6 si se observó la presencia de dicha banda, no observándose diferencias significativas entre las dos concentraciones de inductor empleadas. Es de resaltarse la mayor cantidad de proteína existente en el medio de cultivo con respecto al homogenado celular, lo cual indica que la mayor parte de la proteína recombinante producida es procesada para su secreción, siendo este resultado muy importante ya que incrementa el potencial de esta cepa para su aplicación en el reciclamiento de residuos de celulosa. En un estudio posterior [13] se analizó la capacidad de la cepa para la degradación de diferentes formas de celulosa: AVICEL®, AVICEL® hinchado y Carboximetil Celulosa (CMC), observando un incremento en su capacidad de degradación de hasta 6 veces sobre AVICEL® Hinchado y de 2 veces sobre AVICEL® Y CMC

CONCLUSIONES

Se obtuvo una cepa de *B. subtilis* conteniendo una construcción para sobreexpresar y excretar al medio el producto del gen *cel48* de *Myxobacter* Sp. AL-1. Trabajos futuros se enfocaran en expresar conjuntamente el producto de los genes *cel9*, *cel48* y *xynA* en *B. subtilis*.

AGRADECIMIENTOS

Trabajo apoyado por la DAIP-UGTO (324-2013 and 602-2015). S. C-B agradece la beca otorgada por la DAIP para realizar sus estudios de licenciatura de QFB.

REFERENCIAS

[1] Ramírez Ramírez N. (2008). Caracterización molecular del locus *cel9-cel48* de *Myxobacter* Sp.AL-1. México, Gto. Tesis Doctoral. Universidad de Guanajuato.

[2] Avitia CI, Castellanos-Juarez FX, Sanchez E, A. Tellez-Valencia A, Fajardo-Cavazos P, Nicholson W and M. Pedraza-Reyes M. (2000). "Temporal secretion of a multicellulolytic system in *Myxobacter* sp. AL-1", Eur. J. Biochem. 267, 7058-7064

[3] Ramírez-Ramírez N, Romero-García ER, Calderón VC, Avitia CI, Téllez-Valencia A, Pedraza-Reyes M. (2008). "Expression, characterization and synergistic interactions of *Myxobacter* Sp. AL-1 Cel9 and Cel48 glycosyl hydrolases", Int. J. Mol. Sci. 9, 247-257

[4] Teresa Ponce Noyola y Odilia Pérez Avalos (2002), "Celulasas y xilanasas en la industria", Avance y Perspectiva 21: 273-277

[5] Téllez-Valencia A, Sandoval A, Pedraza-Reyes M. (2003). "The non-catalytic amino acid Asp446 Is essential for enzyme activity of the modular endocellulase Cel9 from *Myxobacter* Sp. AL-1", Curr. Microbiol. 46, 307–310

[6] Ramirez-Ramirez N, Castellanos-Juarez FX, E. Espinoza V, E. Castellano L, Téllez-Valencia A, Pedraza-Reyes M (2009). "Role of the novel protein TmcR in regulating the expression of the *cel9-cel48* operon from *Myxobacter* Sp. AL-1", Antonie Van Leeuwenhoek 95, 239-248

[7] Boylan R.J., Mendelson N.H., Brooks D. y col., (1972), "Regulation of the bacterial cell wall: analysis of a mutant of *Bacillus subtilis* defective in biosynthesis of teichoic acid", J. Bacteriol. 110, 281-290.

[8] Sambrook J. y Russel D. W., (2001), Molecular cloning: a laboratory manual (3a ed.). EUA, New York: Cold Spring Harbor.

[9] Cutting S. M. Vander Horn. P. B., (1990), Molecular biological methods for *B. subtilis* (1a ed.). Chichester, N.Y.: John Wiley & sons.

[10] Sun D, Stragier, P., Setlow, P. (1989) "Identification of a new sigma factor wich allows RNA polymerase to transcribe the *sspE* gene during sporulation of *Bacillus subtilis*", Genes Dev. 3, 141-149.

[11] Avitia y col. Myxobacter sp. AL-1 cel9-cel48 (tmcR) gene cluster, complete sequence. [En línea]. Ver: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/220966762?report=genbank&log$=nuclalign&blast_rank=1&RID=YW6MZPPH01R [Consulta: 24 mayo 2013].

[12] Laemmli UK (1970), "Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophague lamda T4", Nature 227:680-685

[13] Corona Bautista S.U. (2014). Sobreexpresión, producción y secreción de la glicosilhidrolasa Cel48 de *Myxobacter* Sp. Al-1 en *Bacillus subtilis*. Mexico, Gto. Tesis de licenciatura. Universidad de Guanajuato

EXPLORATIVE AND RETROSPECTIVE STUDY OF A TEST FOR THE EARLY DIAGNOSIS OF DENGUE VIRUS INFECTION

(Estudio exploratorio y retrospectivo de una prueba para el diagnóstico temprano de la infección por virus dengue)

Abner Julián Márquez-Fernández[a]*+, Angel Ramos-Ligonio[a,b], Enrique Méndez-Bolaina[a,b], Aracely López-Monteon[a,b].

[a] Centro de Investigaciones Biomédicas, Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, México
[b] LADISER Inmunología y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Veracruzana, Orizaba, Veracruz, México

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: amarquezfdz@gmail.com

Área del Conocimiento: Biología Molecular / Biotecnología Clínica.

ABSTRACT
Dengue is currently one of the most important public health diseases, is caused by one of the four serotypes of dengue virus (DEN-1, 2, 3 and 4) and it is transmitted to humans by the bite of the mosquito *A*. *aegypti*; infection by any of the serotypes may lead to different clinical symptoms, from asymptomatic form to certain clinical symptoms, can even cause death. It is estimated that there is an annual incidence of 50 to 100 million cases of dengue with or without alarm signals, and between 250,000 to 500,000 cases of severe dengue, and since there is no vaccine to prevent the infection; it is necessary to have an effective and accurate diagnosis, which is essential for clinical care, early detection of severe cases, case confirmation and differential diagnosis with other infectious diseases. In this work, we evaluate the recombinant proteins (rNS3) as a candidate for the diagnosis of infection by dengue virus, an “in house” ELISA assay was performed using a “pool” of recombinant proteins derived from NS3 of the four serotypes and compared with two diagnostic kits available on the market (determination of IgM and IgG Dengue Panbio/NS1 antigen detection), the rates according to the 3 tests were high. In retrospective validation stage, the optimal serum dilution, concentration of antigen, the chromophore and developing time were determined. The results showed that the optimal serum dilution was 1:50, the antigen concentration of 2 µg/mL and the development time was 30 minutes. It can be concluded that the rNS3 antigen is a good candidate for carrying out a test for the early diagnosis of dengue virus infection.

Palabras Clave: dengue; proteína NS3; ELISA “casera”; validación retrospectiva

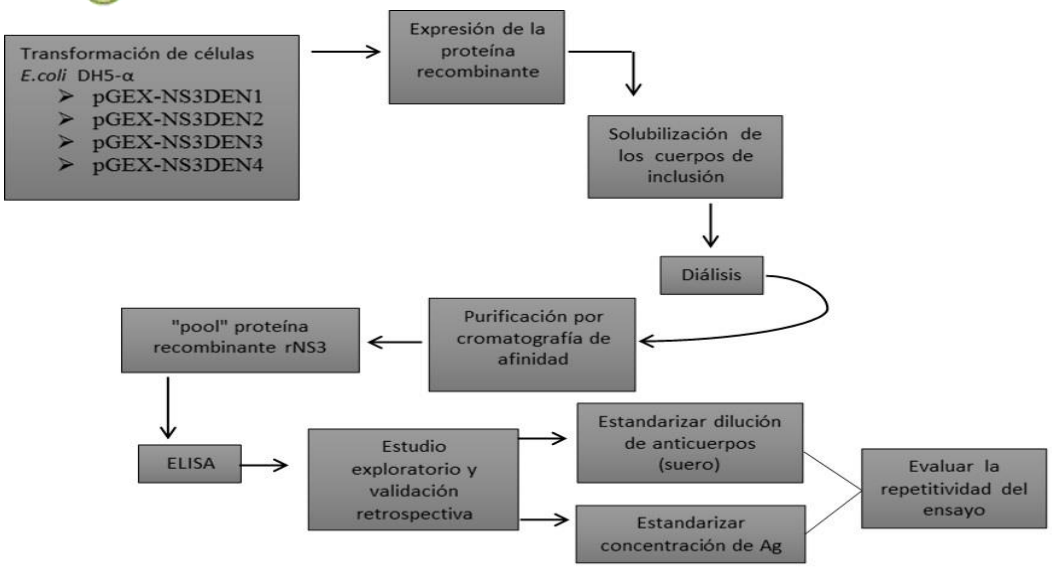
INTRODUCCIÓN

El dengue es una enfermedad causada por un virus perteneciente a la familia flaviviridae, el cual es transmitido al humano a través de la picadura de un mosquito hembra hematófaga del género *Aedes*; siendo *Aedes aegypti* el vector principal [1]. Existen cuatro serotipos del DENV estrechamente relacionados pero antigénicamente distintos denominados: DEN1, DEN2, DEN3 y DEN4 [2]. El genoma

viral contiene un único marco de lectura abierto que codifica para una poliproteína de 3,391 aminoácidos, que se procesa en 10 proteínas individuales. Tres de estas proteínas son estructurales membrana (M), cápside (C), y de envoltura (E) y 7 de ellas son no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) [3]. El corte de esta poliproteína, que representa un paso esencial para la replicación viral, se realiza por enzimas del huésped y por la proteasa viral NS3 [4].

En la actualidad, se estima que se encuentran en riesgo de adquirir la infección dos quintas partes de la población mundial, la infección es endémica en más de 100 países y se contempla una proyección anual de unos 50-100 millones de casos nuevos/año, con 36 millones de casos dengue, más de 2 millones de casos de dengue grave y más de 21,000 muertes se producen cada año [5]. Hasta ahora, la incidencia de la infección por dengue se ha subestimado ya que la mayoría de los casos no se diagnostican adecuadamente, especialmente en ciudades pequeñas o pueblos donde hacen falta laboratorios privados o estatales para el diagnóstico [6]. En México como en otras partes del mundo la presencia del dengue está condicionada a la existencia del vector, México podría ser considerado como una región endémica para el dengue ya que el mosquito vector *Aedes aegypti* está presente en más del 85% del país [7]. A la fecha no hay ninguna vacuna para prevenir la infección con el virus del dengue (DENV) y las medidas de protección más eficaces hasta el momento son los que evitan las picaduras de los mosquitos. Debido a esto, es de fundamental importancia para la atención clínica tener un diagnóstico eficiente y preciso del dengue, es decir, la detección temprana de casos graves, la confirmación de casos y el diagnóstico diferencial con otras enfermedades infecciosas. El diagnóstico del virus se realiza a través la detección del antígeno NS1, determinación de anticuerpos IgM e IgG, serotipificación por RT-PCR y el aislamiento viral, sin embargo, todos ellos son métodos caros que necesitan en algunos casos equipo y áreas especializadas. El método de ELISA es el método de elección debido a su facilidad [8].
Sin embargo, las pruebas de diagnóstico siguen siendo insuficientes para la identificación eficiente y precisa de la infección del DENV, por lo cual es necesario buscar alternativas para el diagnóstico de la enfermedad que tengan alta sensibilidad y especificidad y que sean de fácil realización, para lo cual es necesario validar el proceso. La validación es un proceso que determina la idoneidad de una prueba, que se ha desarrollado, optimizado y estandarizado adecuadamente para un fin concreto, esta debe seguir varias etapas, dentro de las que se encuentran las siguientes: Estudio preliminar o exploratorio, estudio de validación retrospectiva, estudio de validación prospectiva y evaluación del impacto y utilidad de la prueba [9]. La proteína NS3 también es capaz de producir anticuerpos específicos ya que se ha reportado que anticuerpos monoclonales hacia NS3 del DEN1 son capaces de incrementar el tiempo de sobrevivencia de ratones retados con dosis letales del serotipo, aunque el mecanismo aún no se encuentra definido. Se han reportado que en infecciones con el serotipo DEN2, están presentes anticuerpos de NS3 en muestras de fase aguda de casos primarios y secundarios, pero principalmente en casos secundarios. Esto abre la posibilidad de implementar un ensayo diagnóstico con alta sensibilidad para la detección del antígeno NS3 en algunos casos de dengue y dengue grave [10, 11].

METODOLOGÍA



RESULTADOS

Las proteínas recombinantes GST-NS3 de los cuatro serotipos fueron purificadas por medio de cromatografía de afinidad a glutatión, las cuales fueron separadas electroforéticamente en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) para su identificación. La proteína recombinante mostró un peso molecular aproximado de 49 kDa (Figura 1).

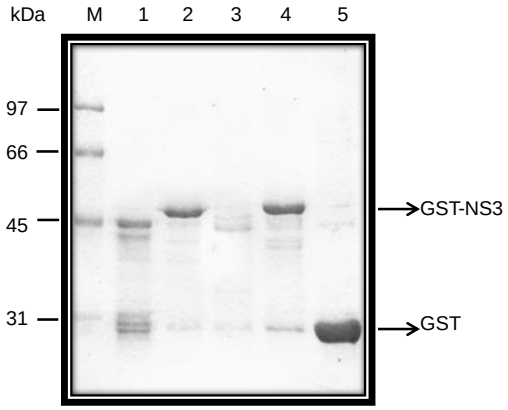


Figura 1. Purificación de la proteína recombinante GST-NS3- DEN1, 2, 3, 4 y GST. Las proteínas GST-NS3-DEN1, 2, 3, 4 fueron purificadas de *E. coli* DH5α transformadas con pGEX-NS3-DEN de cada serotipo del DENV por cromatografía de afinidad a glutatión. El gel de poliacrilamida-SDS al 10% fueron teñidos con azul de coomassie. M, marcadores de peso molecular; carril 1, GSTNS3-DEN1; carril 2, GSTNS3-DEN2; carril 3, GSTNS3-DEN3; carril 4, GSTNS3-DEN4 y carril 5, GST.

Las proteínas recombinantes GST-NS3 de los cuatro serotipos, se cuantificaron mediante el método de micro Bradford. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Concentraciones de las proteínas GST-NS3-DEN1, GST-NS3-DEN2, GST-NS3-DEN3, GST-NS3-DEN4

GST-NS3-1		GST-NS3-2	GST-NS3-3	GST-NS3-4
Eluído	Concentración (µg/µl)	Concentración (µg/µl)	Concentración (µg/µl)	Concentración (µg/µl)
1	0.506	0.602	0.625	0.609
2	0.505	0.593	0.562	0.535
3	0.470	0.576	0.532	0.480
4	0.453	0.539	0.532	0.466
5	0.448	0.532	0.391	

Una vez cuantificada las proteínas GST-NS3 de los cuatro serotipos se utilizó para determinar la dilución óptima de los sueros en una prueba de ELISA "casera", las proteínas o antígenos se utilizaron en la forma de un "pool" de proteínas GST-NS3 de los cuatro serotipos del virus. Para esto, se utilizaron 18 sueros positivos al dengue obtenidos del Hospital Regional de Río Blanco, Ver., diagnosticados previamente a través de las pruebas Panbio IgM e IgG, así como por la determinación del antígeno NS1. Se utilizaron las diluciones de 1:50, 1:100 y 1:150 (Figura 2). Los sueros fueron considerados positivos cuando presentaron 3 o más densidades ópticas que el suero negativo. Los resultados mostraron que la dilución óptima para detectar adecuadamente los sueros positivos es la de 1:50, ya que todos los sueros problema quedaron como positivos a dengue a través de la ELISA "casera", tal como se había diagnosticado con las pruebas antes mencionadas.

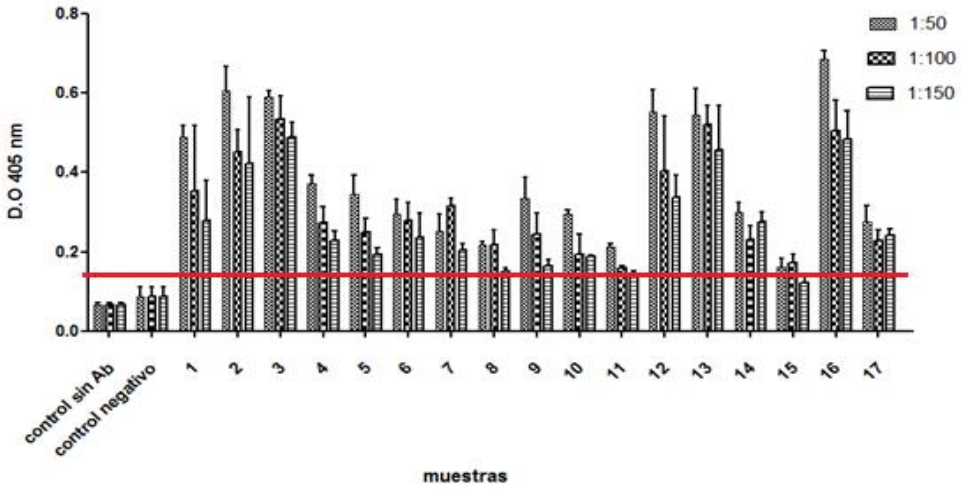


Figura 2. Determinación de la dilución óptima de los sueros. Las placas de ELISA fueron recubiertas con un "pool" de la proteína GST-NS3 de los cuatro serotipos del virus dengue a una concentración de 2 µg/mL, los sueros (18 muestras) de pacientes positivos al dengue se probaron a diluciones de 1:50, 1:100 y 1:150. Las densidades ópticas fueron leídas a 405 nm.

Para determinar la concentración óptima del "pool" de proteínas con el cual se tendrían que recubrir los pozos de las placas de ELISA, se utilizó como antígeno, el "pool" de proteínas GST-NS3 de los cuatro serotipos del virus dengue. Se probaron diferentes concentraciones de proteína que variaron desde 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 µg/mL. Para la determinación de la concentración óptima de proteína se utilizaron 22

sueros positivos a dengue obtenidos del Hospital Regional de Río Blanco, Ver. Los sueros fueron considerados positivos cuando presentaron 3 o más densidades ópticas que el suero negativo. Durante la estandarización de la concentración de antígeno, también se estandarizaron los tipos de reveladores [OPD (Ortofenilendiamina) y ABTS (acido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiasolina)-6-sulfonico)], asimismo también se estandarizaron los tiempos de revelado (15 y 30 min). Al comparar los resultados de las estandarizaciones de concentración de antígeno, tipo de revelador y tiempo de revelado para detectar adecuadamente los sueros positivos se determinaron las condiciones óptimas. La concentración que mejor resultados mostró fue la concentración de 2.0 µg/mL, aunque la concentración de 1.5 µg/mL mostró resultados muy parecidos, también se determinó que el revelador con mejores resultados fue el ABTS y un tiempo de 30 minutos de revelado. (Figura 3). Cabe aclarar que con el revelador OPD también se obtuvieron buenos resultados pero los resultados con ABTS fueron más consistentes.

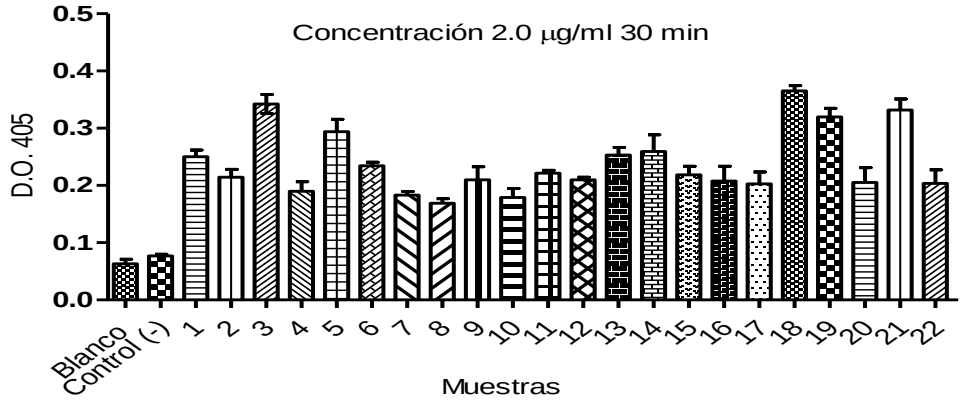


Figura 3: Determinación de concentración de antígeno. Las placas de ELISA fueron recubiertas con un "pool" de la proteína GST-NS3 del virus dengue a una concentración de 2.0 µg/mL, los sueros (22 muestras) de pacientes positivos se utilizaron a una dilución 1:50. Como revelador se utilizó ABTS, las densidades ópticas fueron leídas a 405 nm a los 30 min de revelado.

DISCUSIÓN

La infección por el virus dengue es la principal causa de enfermedad y muerte en los trópicos y subtrópicos, con una incidencia de casi 100 millones de personas infectadas por año [5]. A la fecha no hay ninguna vacuna para prevenir la infección con el virus del dengue. Debido a esto, es de fundamental importancia para la atención clínica tener un diagnóstico eficiente y preciso del dengue, es decir, la detección temprana de casos graves, la confirmación de casos y el diagnóstico diferencial con otras enfermedades infecciosas [8]. En estudios previos, utilizando una proteína recombinante derivada de la parte de proteasa de la proteína NS3 como antígeno en una prueba de ELISA "casera", se encontró una alta correlación con los métodos más utilizados para la detección de dengue. Los resultados obtenidos en el estudio por Álvarez-Rodríguez [12] al evaluar la concordancia entre las tres pruebas de ELISA, los resultados fueron muy prometedores. Al comparar el ELISA de IgM PanBio contra el ELISA "casero" con la proteína rNS3 se obtuvo un índice Kappa (k) de 0.93 ± 0.064 (IC95%=0.808-1.061), al compararlo contra el ELISA de IgG PanBio el índice Kappa fue de 0.87± 0.048 (IC95%= 0.779-0.965). La concordancia entre la detección del antígeno NS1 contra el ELISA de rNS3 mostró también resultados muy buenos con un índice k= 0.837± 0.066 (IC 95%= 0.708 – 0.966). Esto abrió la posibilidad de implementar un ensayo diagnóstico con alta sensibilidad para la detección del antígeno NS3 en algunos casos de dengue

y dengue grave, por este motivo, se empleó a la proteína NS3 derivada de los cuatro serotipos del virus dengue en una prueba para el diagnóstico temprano de la infección. Uno de los métodos indirectos más utilizados para el diagnóstico de las enfermedades infecciosas es la prueba de ELISA. El desarrollo tecnológico de los últimos años ha permitido incorporar a la práctica clínica-médica novedosos y sofisticados medios diagnósticos que, sin duda, constituyen adelantos en el perfeccionamiento del trabajo biomédico. Lamentablemente, estos adelantos en los medios diagnósticos se han acompañado también de una tendencia a su uso indiscriminado. La incorporación de nuevas pruebas diagnósticas a la práctica clínica no ha tenido este razonable control. Recientes estudios demuestran que, incluso en las revistas más prestigiosas, los trabajos referidos a pruebas diagnósticas adolecen de importantes déficit metodológicos con sesgos que tienden a sobreestimar la validez de las mismas [13]. La validación es un proceso que determina la idoneidad de una prueba, que se ha desarrollado, optimizado y estandarizado adecuadamente para un fin concreto. La validación de las pruebas diagnósticas debe seguir varias etapas [9]. La primer etapa o exploratoria fue reportada por Álvarez-Rodríguez [12], mientras que en la etapa retrospectiva se evalúa la capacidad discriminativa, pero no la predictiva de la prueba [14].

CONCLUSIONES

Se logró la purificación de las cuatro proteínas recombinantes GST-NS3 de los cuatro serotipos del virus dengue En la etapa retrospectiva se determinó la dilución óptima de los sueros, siendo la dilución de 1:50 la que permite detectar a todos los sueros positivos a dengue. La concentración óptima de antígeno fue de 2.0 µg/mL, el revelador a utilizar fue ABTS y el tiempo de revelado de 30 min.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACyT por la beca otorgada a AJMF (Becario Número 297543, CVU 559561), estudiante del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas.

REFERENCIAS

[1] Durbin A. P. and Whitehead S. S. (2011), “Next-generation dengue vaccines: novel strategies currently under development,” Viruses, 3(10):1800–1814.
[2] Gubler D. J. (1998.),“The global pandemic of dengue/dengue hemorrhagic fever: current status and prospects for the future,” Annals of the Academy of Medicine Singapore, 27,(2):227–234.
[3] Harris E., Holden K. L., Edgil D., Polacek C., and Clyde K. (2006), “Molecular biology of flaviviruses,” Novartis Foundation Symposium, 40,(71-73),:251–253.
[4] Acosta-Bas, C. y Gómez-Cordero I. (2005), Biología y métodos diagnósticos del dengue. Biología y métodos diagnósticos del dengue. RevIsta Biomédica. 16:113-137.
[5] Murrell S, Wu SC, Butler M. (2011), “Review of dengue virus and the development of a vaccine” Biotechnology Advances; 29(2):239-247.
[6] Moreno-Altamirano M. M. B., F. J. Sánchez-García, I. López-Martínez et al. (2009), “Improving dengue virus diagnosis in rural areas of Mexico,” Dengue Bulletin, 33(1):87–94.
[7] CENAVECE. (2014). “Dengue; distribución del vector,” http://www.cenave.gob.mx/Dengue
[8] InDRE-SINAVE. (2012). “Lineamientos para la vigilancia por Laboratorio de Dengue”, Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública.
[9] C. Carnero-Pardo. (2005), “Evaluación de las pruebas diagnósticas”. Revista de Neurología, 40(11):641-643.
[10] Chen Z., Tian Y., Liu L., y An J. (2008), “Production of a monoclonal antibody against non-structural protein 3 of dengue virus-2 by intrasplenic injection”. Hybridoma, 27(6): 467-471.

[11] Valdés K., Álvarez, M., Pupo M., Vázquez S., Rodríguez R. y Guzmán M. (2000), "Human dengue antibodies against structural and nonstructural proteins". Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 7: 856-857.

[12] Álvarez Rodriguez L.M., Ramos-Ligonio A., Rosales-Encina J.L., Martínez-Cazeres M.T., Parisi-Crivelli A., López-Monteon A. (2012), "Expression, purification, and evaluation of Diagnostic potential and immunogenicity of a recombinant NS3 protein from all serotypes of dengue virus". Journal of Tropical Medicine, Article ID 956875

[13] Lijmer J, Mol B, Heisterkamp S, Bonsel G, Prins M,Van der Meulen J, et al. (1999), "Empirical evidence of design-related bias in studies of diagnostic test". JAMA 282: 1061-1066.

[14] Carnero C, Lendínez A. (1999), "Utilidad del test de fluencia verbal semántica en el diagnóstico de demencia", Revista Neurología, 29: 709-714.

IDENTIFICATION OF PROTEINS ASSOCIATED WITH CHILLING INJURY TOLERANCE INDUCED BY HYDROTHERMAL TREATMENT IN TOMATO FRUIT

(Identificación de proteínas asociadas con tolerancia al daño por frío inducida por tratamiento hidrotérmico en frutos de tomate)

María de Lourdes Valenzuela-Ponce[a*+], Misael Odín Vega-García[a], Karen Virginia Pineda-Hidalgo[a], Nancy Yareli Salazar-Salas[a], Jeanett Chávez-Ontiveros[a], José Angel López-Valenzuela[a]

[a]Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: Lourdessv_fctn@hotmail.com

Área del Conocimiento: Biología Molecular.

ABSTRACT
Tomato is sensitive to chilling injury (CI) when exposed to temperatures below 12°C; this physiological disorder results in several symptoms that affect fruit quality. Hydrothermal treatments (HT) have been successfully used in tomato fruit to induce tolerance against this disorder. However, little is known about the biochemical basis underlying CI symptoms and the tolerance induced by HT. The aim of this study was to identify proteins related to CI tolerance induced by hydrothermal treatment in tomato fruit cv Imperial. Tomato fruit were divided into two batches; one of them was subjected to hydrothermal treatment (HT) (5 min, 42°C) and the other was used as control (WHT). Tomato fruit from both treatments were stored at chilling temperature (5°C) for 20 days. Fruit quality parameters (color, firmness), chilling injury index, electrolyte leakage and malondialdehyde (MDA) were evaluated; protein expression patterns were also analyzed by using two dimensional electrophoresis and the proteins differentially expressed between both treatments were identified by mass spectrometry. Fruit quality parameters and chilling injury index indicated that HT favored normal ripening and decreased visible CI symptoms. The induced CI tolerance was further evidenced by the lower electrolyte leakage and lipid peroxidation observed in HT fruit. Proteome comparative analysis indentified several proteins associated with CI tolerance, which were mainly related to oxidative stress and cellular detoxification, suggesting that they might be working together to maintain the cellular homeostasis under cold stress.

Keywords: Chilling injury, hydrothermal treatment, cold tolerance, proteomics.

IMMUNOGENICITY OF PAPAYA RINGSPOT VIRUS-LIKE PARTICLES DISPLAYING A PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 2 EPITOPE

(Inmunogenicidad de partículas pseudovirales del virus de la mancha anular de la papaya que presentan un epítope del circovirus porcino tipo 2)

Eugenia Aguilera, Brenda[a]*, Gabriela Chávez-Calvillo[b], Darwin Elizondo-Quiroga[a], Mónica Noemí Jiménez-García[c], Mauricio Carrillo-Tripp[c], Laura Silva-Rosales[b], Rodolfo Hernández-Gutiérrez[a], Abel Gutiérrez-Ortega[a+].

[a] Unidad de Biotecnología Médica y Farmacéutica, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C., Normalistas 800, Colinas de la Normal, 44270, Guadalajara, Jalisco, México
[b] Departamento de Ingeniería Genética, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, km 9.6 Libramiento Norte, Carretera Irapuato-León, Irapuato, Guanajuato 36821, México
[c] Laboratorio de la Diversidad Biomolecular, Unidad de Genómica Avanzada, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Libramiento Norte km 9.6, Carretera Irapuato-León, Irapuato, Guanajuato, 36821, México

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: aortega@ciatej.mx

Área del Conocimiento: Biología Molecular.

ABSTRACT
Virus-like particles (VLPs) have structural characteristics that make them excellent nanomaterials, and nowadays it is possible expressing them effectively in a variety of systems. They are recently being studied as vaccine adjuvants, both as scaffolds for epitope presentation and immune response enhancers. Papaya ringspot virus (PRSV) capsid protein (CP) has been previously expressed in *Escherichia coli* and used as epitope-scaffold, but epitope insertion effects on virus-like particle assembly have not been evaluated so far. In this work, a porcine circovirus type 2 (PCV2) protective epitope was inserted by genetic fusion in three different locations of PRSV CP (N- , C-termini and an *in silico* predicted antigenic region). In addition, molecular tertiary structures were generated (also *in silico*), expressed in *E. coli*, purified, assembled into VLPs and visualized by transmission electron microscopy. It was found that epitope position in PRSC CP influences its assembly into VLPs, affecting stability. Epitope insertion into the predicted antigenic region resulted in longer and more VLPs per amount of protein, as compared to the other chimeric particles. Finally, chimeric VLPs with the epitope fused at the C-terminus elicited higher IgG levels against the PCV2 epitope in immunized BALB/c mice.

Keywords: papaya ringspot virus capsid protein, virus-like particles, porcine circovirus 2 epitope, IgG response.

RESUMEN

Las partículas tipo virus (VLPs) han demostrado ser excelentes nano materiales por sus características estructurales y posibilidad de ser expresadas en sistemas distintos. Recientemente se ha estudiado su aplicación como plataformas de presentación de epítopes para su uso como adyuvante en vacunas. Partículas tipo virus de la mancha anular de la papaya (PRSV) han sido ya exitosamente expresadas y utilizadas como plataforma de presentación de un péptido de 15 aminoácidos, sin embargo no se evaluaron los efectos que dicha inserción produjo en el ensamblaje. En el presente trabajo, un epítope del circovirus porcino tipo 2 (PCV2) con características protectoras fue insertado por fusión genética en tres diferentes ubicaciones en la proteína de la cápside (CP) del PRSV, en los extremos amino y carboxilo, así como en un sitio evaluado como de alta antigenicidad, generando sus estructuras moleculares in silico, y obteniendo sus respectivas proteínas quiméricas purificadas y formación de PTVs, demostrado por microscopía electrónica de transmisión. Se encontró que la inserción del péptido influye en el ensamblaje de las partículas, derivando en su estabilidad y con ello variando la longitud de éstas. La versión que mostró generar mayor cantidad de partículas por cantidad de proteína con un tamaño superior a las otras fue la versión con la inserción en el sitio de alta antigenicidad. Pero por el contrario, aquellas que alcanzaron menores longitudes, fueron las producidas con la inserción en el extremo carboxilo, las cuales al mismo tiempo fueron las partículas que al administrarse en ratones generaron una reacción antigénica más elevada.

Palabras Clave: proteína de la cápside del Virus de la Mancha Anular de la Papaya, partículas tipo virus, Circovirus porcino tipo 2, respuesta de IgG.

INTRODUCTION

VLPs are self-assembled systems formed spontaneously after the expression of one or more viral proteins resembling its original shape, size and symmetry, but lacking a genome, so they cannot replicate and are not infectious. With VLPs, it is possible to induce immune responses that are as potent as those induced by viral infection but without the associated risks [1].

Potyviruses are flexuous filamentous plant viruses, ranging from 700 to 900 nm long. The N and C termini of the potyvirus CP are exposed at the surface of virions and are reported to be highly immunogenic [2]. Hence, modifications in N- and/or C-termini of the CP might contribute to the display of attached molecules at the surface, without affecting particle formation or disrupting the core particle [2-4].

Papaya Ring-Spot virus (PRSV) is a member of the genus Potyvirus and its genome is surrounded by ~2,000 subunits of CP [5]. The CP N-terminus presents 11 repeats of charged amino acids, predominantly, glutamic acid and lysine [6]. At present, there are two reports about the use of PRSV CP expressed in *E. coli* as an antigen carrier or adjuvant [7, 8]. The presentation of a 15 amino acid antigenic peptide genetically fused to the C- terminus of PRSV CP enhanced the antibody response to the peptide in immunized mice, but the effect of the inserted peptide on VLP formation and the consequence that this may have to immunogenicity were not investigated [8].

Porcine Circovirus (PCV) belongs the Circoviridae family and PCV type 2 is responsible for a number of clinicopathological conditions in pigs, referred to as PCV associated diseases (PCVD) [9], causing important economic losses in the pig industry, worldwide [10]. A fragment of 3 to 20 amino acids at C-terminus of PCV-2 CP has demonstrated to be immunogenic and it has been recently displayed at the surface of Cucumber Mosaic Virus by genetic fusion, resulting in the increased production of antibodies against the epitope in immunized mice and pigs [11]. In the present work, the C-terminus PCV2 epitope

was inserted into three different regions of PRSV CP, N- and C-termini and a predicted antigenic region located near the N-terminus, in order to generate chimeric particles. The particles were expressed in *E. coli*, purified and their structure analyzed by transmission electron microscopy (TEM). Also, the antibody response against the fused epitope after mice immunization with the chimeric VLPs was compared.

METHODOLOGY

Three chimeric PRSV-CP genes were designed to include the PCV2b-224 epitope (FNLKDPPLNP) in a site of high antigenicity according to an analysis carried out with CLC Main Workbench 6.0 (CLC Bio, USA), N- and C-termini, named PRSV-PCV2$_{19-28}$, PRSV-PCV2-N and PRSV-PCV2-C, respectively. The first one was commercially synthetized (Genscript, USA) while the last two were generated by two rounds of PCR with a set of three primers each, using native CP gene from a PRSV isolate as the initial template. The three chimeric versions were provided with an NcoI cleavage site, a translation start and a glycine codon at the 5' and an XhoI cleavage site at the 3' end. The sequences were digested with NcoI/XhoI enzymes, purified and ligated into pET-28a(+) prokaryotic expression vector (Merck-Millipore). *E. coli* One Shot BL21Star (DE3) cells (Life Technologies, USA) were transformed with each plasmid.

Chimeric capsid protein expression was carried out as Guerrero-Rodriguez with a few modifications [7]. Six hours after 1 mM IPTG addition, bacterial cells were collected by centrifugation, resuspended in 1:10 of the original culture volume in lysis buffer (10 mM Tris, 300 mM NaCl, 10 mM EDTA, pH 7.2) and sonicated. Total protein lysate was centrifuged (4 °C, 20 min and 5000 rpm), and all fractions (total, soluble and insoluble) were analyzed by SDS-PAGE and Coomassie Blue staining.

Particles were precipitated with 4 % (w/v) PEG 8000 for 1.5 h at 4°C with constant shaking and left for 1 h at room temperature. Afterwards, samples were centrifuged (4°C, 20 min, 5000rpm), and the precipitate was solubilized overnight in ¼ v/v of immunization buffer (10 mM PBS, 300mM NaCl, 10 mM EDTA, pH 7.4) and centrifuged (4°C, 20 min, 5000rpm) to separate non soluble fraction. Finally, VLPs were filtrated with 100 kDa Amicon Ultra Centrifugal Filter Units (Merck-Millipore). Samples were collected at each step for monitoring the precipitation and filtration processes by SDS-PAGE. Protein concentration was estimated with Bradford reagent.

Purified particles were adsorbed on carbon formvar-coated copper grids and negatively stained with 2% uranyl acetate solution. The observations were performed on a JEM-100C electron microscope at an accelerating voltage of 80 kV.

For the antibody response assay, four weeks old female BALB/c mice (Harlan, USA) were divided into 4 groups of 5 mice each and immunized with 20µg of PRSV-PCV2-N, PRSV-PCV2$_{19-28}$, PRSV-PCV2-C, or native PRSV cp (PRSV wt) in a prime and single boost scheme. Immune serum samples obtained after the immunization protocol were analyzed for IgG antibody response against PCV2 epitope and VLPs by sandwich ELISA, using as capture antigen 5 µg/well of PCV2 epitope soluble peptide or whole purified VLP as corresponds. In the PCV2 epitope ELISA, sera were pooled by groups and diluted 1:10, while in the VLP ELISA, it was diluted individually 1:2500. HRP-donkey anti-mouse IgG diluted 1:1,000 was used as conjugate. Differences between groups were analyzed by One-way ANOVA followed by Multiple Range test using Statgraphics Centurion XVI software (Statpoint Technologies, USA).

RESULTS

The molecular tertiary structure of the wild type and chimeric PRSV CP monomers were generated *in silico* (Figure 1a). The PRSV wt molecular tertiary structure prediction is mainly alpha, orthogonal bundle with helix hairpins (CATH classification 1.10.287). The structure correlates well with experimental data that suggests that both N-terminus and C-terminus are exposed at the surface [2]. In the chimeric

proteins the inserted epitope is also located at the CP surface. In the case of PRSV-PCV2-N and PRSV-PCV2-C the epitope is displayed in a pocket. On the contrary, the epitope protrudes, along with the glutamic acid/lysine repeat region, from the PRSV-PCV2$_{19-28}$ CP monomer surface.

Expression plasmids were constructed and chimeric proteins were successfully expressed in IPTG-induced cultures as analyzed by SDS-PAGE Coomassie blue staining, where a protein of 34 kDa was observed in the soluble fraction, in agreement with the theoretical weight (data not shown). Previously, it was demonstrated that *E. coli*-expressed PRSV CP native protein can be purified by immobilized metal affinity chromatography, even though it does not possess a histidine tag [7]. In contrast, none of the chimeric proteins were able to bind to nickel-charged columns, as they were observed in the flow-through fraction during the binding step (data no shown). For this reason, chimeric PRSV particles were purified through PEG precipitation and diafiltration. The estimated yield of partially purified PRSV-PCV2-N, PRSV-PCV2$_{19-28}$ and PRSV-PCV2-C particles is 85, 65 and 85 mg per L of culture, respectively. The partially purified particles were visualized by transmission electron microscopy (Figure 1b). VLPs ranging from 150-500 nm in the PRSV-PCV2$_{19-28}$ sample were formed, while VLPs no longer than 200 nm were observed in the PRSV-PCV2-N. Conversely, the PRSV-PCV2-C sample presented VLPs smaller than 100 nm.

Anti-PCV2 epitope IgG levels in serum samples collected from BALB/c mice were determined by ELISA (Figure 2a). PRSV-PCV2-C induced IgG titers at least 2.5-fold higher than the other VLPs. There is, however, a statistically significant difference between the PRSV-PCV2$_{19-28}$ and PRSV-PCV2-N treatments, where the former elicited a higher IgG response. The IgG response against the VLPs themselves was also investigated (Figure 2b). Both PRSV-PCV2-N and PRSV-PCV219-28 induced similar IgG levels that were superior to the ones induced by PRSV-PCV2-C.

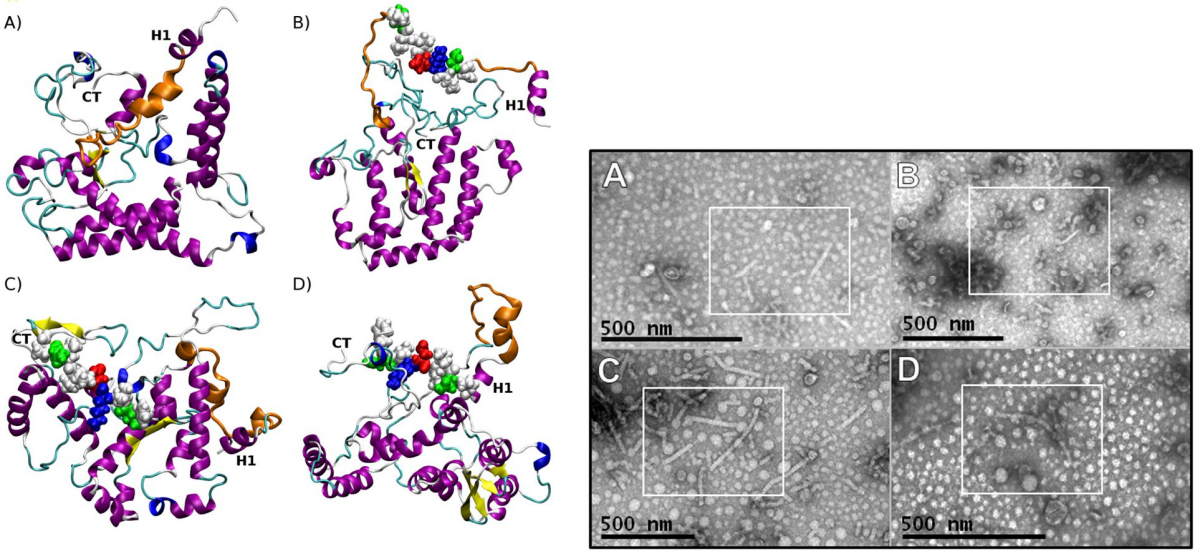


Figure 1. a)Tertiary molecular structure of the PRSV CP wt (A), PRSV-PCV219-28 (B), PRSV-PCV2-C (C) and PRSV-PCV2-N (D). Several features are highlighted: alpha helix motif at the N-terminus (H1), C-terminus (CT), alpha helix (magenta), beta sheet (yellow), glutamic acid/lysine repeat region (orange) and epitope in space filling representation for non-polar (white), polar (green), acidic (red) or basic (blue) amino acids. Molecular visualization made with VMD. b) Observation of VLPs derived from PRSV-PCV2-N (A), PRSV-PCV2-C (B), PRSV-PCV2$_{19-28}$ (C) and PRSV wt (D) by transmission electron microscopy.

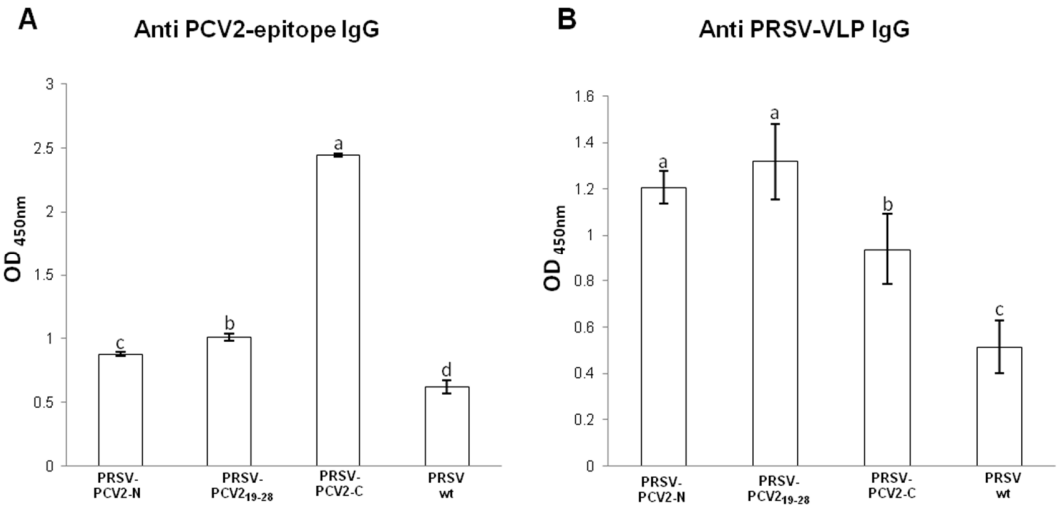


Figure 2. IgG response in mice immunized with PRSV chimeric versions and wild type 15 days after second immunization. a) IgG antibodies vs. PCV2 epitope. b) IgG antibodies vs. corresponding PRSV CP VLPs. Lowercase letters a, b, c and d indicate statistically significant differences between groups.

DISCUSSION

As demonstrated previously, the native PRSV CP can be purified by immobilized metal affinity chromatography despite it does not possess a hexahistidine tag. It was previously hypothesized that the glutamic acid-lysine repeat creates a specific environment at the VLP surface able to interact with the metal matrix [7]. Epitope insertion within or near this repeat may change the particular environment, negatively affecting its affinity to the matrix, which would be the case of PRSV-PCV2-N and PRSV-PCV2$_{19-28}$. Similarly, PRSV-PCV2-C was not able to bind to the metal matrix, suggesting that the PRSV CP C-terminus may contribute to maintain such environment in a VLP context, considering that the interaction of N- and C-termini at an early stage is critical for capsid assembly in a member of the potyvirus family [3]. Apparently, PCV-2 epitope insertion at PRSV CP N- terminus and high antigenicity site did not impair CP assembly into rod-shaped VLPs. On the contrary, particle assembly was dramatically affected by the epitope insertion at the PRSV CP C-terminus. Regarding the antibody response against the chimeric VLPs, it was surprising that the PRSV-PCV2$_{19-28}$ did not induce a higher IgG response against the epitope. It has been found that minor displacements in the insertion site affect dramatically the immunogenicity against the foreign sequence [12-14]. Chimeric PRSV-PCV2-C particles elicit a better IgG response against the epitope in comparison to the other chimeric VLPs. Macromolecules that are smaller than 100–200 nm enter the lymphatic system reaching the lymphoid organs directly through lymph drainage within hours of injection; by contrast, particles that are larger than 200–500 nm do not efficiently enter lymph capillaries in a free form, but they need to be carried into the lymphatic system by specialized cells, such as dendritic cells [1]. It is possible that PRSV- PCV2-C VLPs could have reached the B and T cell regions at the lymph node and present PCV2 epitope directly to the cells [1]. Nevertheless, further studies to confirm this hypothesis are needed.

CONCLUSION

In the present work, a PCV2 epitope has been inserted in three different positions of PRSV CP and its effect on virus-like particle assembly and immunogenicity has been studied. Epitope insertion between amino acids 18 and 19 of PRSV CP resulted in rod-shaped VLPs of up to 500 nm length. The C-terminal insertion induced the best IgG response in a two-shot immunization scheme in BALB/c mice without the aid of an adjuvant. Derived from these findings, the chimeric VLPs, should be evaluated in swine as a vaccine candidate against PCV2, considering that PCV2 remains as one of the main problems in swine exploitations, worldwide [15, 16].

REFERENCES

[1] Bachmann, M. F.,Jennings, G. T.,(2010),"Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns", Nat Rev Immunol,10 (11): 787-96.

[2] Shukla, D. D., Strike, P. M., Tracy, S. L., Gough, K. H.,Ward, C. W.,(1988),"The N and C Termini of the Coat Proteins of Potyviruses Are Surface-located and the N Terminus Contains the Major Virus-specific Epitopes", Journal of General Virology,69 (7): 1497-1508.

[3] Anindya, R.,Savithri, H. S.,(2003),"Surface-exposed amino- and carboxy-terminal residues are crucial for the initiation of assembly in Pepper vein banding virus: a flexuous rod-shaped virus", Virology,316 (2): 325-336.

[4] Jagadish, M. N., Edwards, S. J., Hayden, M. B., Grusovin, J., Vandenberg, K., Schoofs, P., Hamilton, R. C., Shukla, D. D., Kalnins, H., Mcnamara, M., Haynes, J., Nisbet, I. T., Ward, C. W.,Pye, D.,(1996),"Chimeric potyvirus-like particles as vaccine carriers", Intervirology,39 (1-2): 85-92.

[5] Shukla, D. D.,Ward, C. W.,(1989),"Structure of potyvirus coat proteins and its application in the taxonomy of the potyvirus group", Adv Virus Res,36 273-314.

[6] Silva-Rosales, L., Becerra-Leor, N., Ruiz-Castro, S., Teliz-Ortiz, D.,Noa-Carrazana, J. C.,(2000),"Coat protein sequence comparisons of three Medican isolates of papaya ringspot virus with other geographical isolates reveal a close relationship to American and Australian isolates", Arch Virol,145 (4): 835-43.

[7] Guerrero-Rodriguez, J., Manuel-Cabrera, C. A., Palomino-Hermosillo, Y. A., Delgado-Guzman, P. G., Escoto-Delgadillo, M., Silva-Rosales, L., Herrera-Rodriguez, S. E., Sanchez-Hernandez, C.,Gutierrez-Ortega, A.,(2014),"Virus-like particles from escherichia coli-derived untagged papaya ringspot virus capsid protein purified by immobilized metal affinity chromatography enhance the antibody response against a soluble antigen", Mol Biotechnol,56 (12): 1110-20.

[8] Chatchen, S., Juricek, M., Rueda, P.,Kertbundit, S.,(2006),"Papaya ringspot virus coat protein gene for antigen presentation in Escherichia coli", J Biochem Mol Biol,39 (1): 16-21.

[9] Allan, G. M., Mc Neilly, F., Meehan, B. M., Kennedy, S., Mackie, D. P., Ellis, J. A., Clark, E. G., Espuna, E., Saubi, N., Riera, P., Bøtner, A.,Charreyre, C. E.,(1999),"Isolation and characterisation of circoviruses from pigs with wasting syndromes in Spain, Denmark and Northern Ireland", Vet Microbiol,66 (2): 115-123.

[10] Segalés, J.,Domingo, M.,(2002),"Postweaning mulstisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review", Veterinary Quarterly,24 (3): 109-124.

[11] Gellert, A., Salanki, K., Tombacz, K., Tuboly, T.,Balazs, E.,(2012),"A cucumber mosaic virus based expression system for the production of porcine circovirus specific vaccines", PLoS One,7 (12): e52688.

[12] Fernández-Fernández, M. R., Martínez-Torrecuadrada, J. L., Roncal, F., Domínguez, E.,García, J. A.,(2002),"Identification of Immunogenic Hot Spots within Plum Pox Potyvirus Capsid Protein for Efficient Antigen Presentation", J Virol,76 (24): 12646-12653.

[13] Rueda, P., Hurtado, A., Del Barrio, M., Martinez-Torrecuadrada, J. L., Kamstrup, S., Leclerc, C.,Casal, J. I.,(1999),"Minor displacements in the insertion site provoke major differences in the induction of antibody responses by chimeric parvovirus-like particles", Virology,263 (1): 89-99.

[14] Taylor, K. M., Lin, T., Porta, C., Mosser, A. G., Giesing, H. A., Lomonossoff, G. P.,Johnson, J. E.,(2000),"Influence of three-dimensional structure on the immunogenicity of a peptide expressed on the surface of a plant virus", Journal of Molecular Recognition,13 (2): 71-82.

[15] Segalés, J., Allan, G. M.,Domingo, M.,(2005),"Porcine circovirus diseases", Animal Health Research Reviews,6 (02): 119-142.

[16] Gillespie, J., Opriessnig, T., Meng, X. J., Pelzer, K.,Buechner-Maxwell, V.,(2009),"Porcine Circovirus Type 2 and Porcine Circovirus-Associated Disease", Journal of Veterinary Internal Medicine,23 (6): 1151-1163.

CLONING, EXPRESSION AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF LIPASES FROM *Carica papaya* IN *Pichia pastoris*

(Clonación, expresión y caracterización bioquímica de lipasas de *Carica papaya* en *Pichia pastoris*)

Tania Diaz Vidal[a,b]*, Georgina Sandoval[a+].

[a] Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ).
[b] Universitat Autònoma de Barcelona.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: gsandoval@ciatej.mx.

Área del Conocimiento: Biología Molecular.

ABSTRACT
Lipases are ubiquitous enzymes which can be found in animals, plants, microorganisms and insects. In this sense, lipases from plants show interesting catalytic properties as they are stable at a pH range between 4 and 9 and show activities at temperatures between 37-80ºC. Since 1925, the presence of lipolytic activity in the latex of *Carica papaya* has been reported. However, the extraction and purification of those lipases has not been possible as they are covalently linked to the latex matrix. Therefore, an alternative method to extract and characterize the lipases from *C. papaya* is crucial to understand the lipolytic activity of the latex. In the present work, *Pichia pastoris* is used as an expression system to produce recombinant lipases from the latex of *C. papaya*. The synthetic genes of the lipases will be cloned and subsequently transformed in *P. pastoris*. Biomass will be followed by optical density (DO) and dry weight. One recombinant lipase from *C. papaya* has been successfully cloned in *P pastoris*.

Keywords: lipase; *Carica papaya*; *Pichia pastoris*.

MOLECULAR ANALYSIS OF THE STRAINS VARIABILITY IN DRUG-RESISTANT *M. Tuberculosis* IN POPULATION OF JALISCO STATE

(Análisis molecular de la variabilidad de cepas de *M. Tuberculosis* farmacorresistente en población del estado de Jalisco)

Gladys Guadalupe López Avalos [a*+], Martín López Rodríguez [b], Gustavo Mora Aguilera[c], Manuel Sandoval Díaz[b], Carlos Villanueva Arias[b], David Ulises Miranda Hernández[a], Carlos Arturo Vazquez Chacón[d], Ikuri Alvarez Maya[a].

[a] Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco
[b] Laboratorio Estatal de Salud Pública
[c] Colegio de posgraduados
[d] Instituto de diagnóstico y referencia epidemiológica

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: gladys.fcq@gmail.com

Área del Conocimiento: Biología Molecular.

ABSTRACT
TB is a health problem worldwide that has been controlled, but has not been possible to eradicate it. There are molecular biology techniques that lets us identify the genetic variability of samples present in our population, and they are able to determinate whether there is a reinfection or a reactivation, cross contamination and transmission dynamics of the strains. The aim of this study was to determine the genetic variability and transmission dynamics of the strains present in our study, thinking that strains are interrelated and are scattered throughout the state of Jalisco. The samples were obtained of state public health laboratory, the DNA was extracted by CTAB technique and a PCR was performed to amplified the insert IS6110 in order to verify that samples belong the Mycobacterium tuberculosis complex. After the Spoligotyping technique and MIRU-VNTR of 24 loci was performed, the results were analyzed into dendograms and minimum spanning trees. In the study, 64 samples were analyzed and the spoligotyping technique shows discrimination index of 0.64%. Seven different lineages were identified, orphans 53.96%, T 25.63%, H 7.93%, MANU 4.76%, X 3.17%, LAM y EAI5 1.68%, with the formation of six clusters, which would indicate that there are different points of infection in the community. However when performing MIRU technique which has a discrimination index of 0.99 no cluster formation by suggesting that may be the strains are not interrelated, but it is related perhaps to low adherence to treatment.

Keywords: *M. tuberculosis*; Spoligotyping; MIRU-VNTR; Dendograms

RESUMEN
La tuberculosis es un problema de salud a nivel mundial que ha sido controlado, pero no ha sido posible su erradicación. Existen diferentes técnicas de biología molecular que nos permite identificar la variabilidad genética de las muestras presentes en nuestra población, y son capaces de distinguir si la cepa es una reinfección o una reactivación o si se trata de una contaminación cruzada y las dinámicas

de transmisión de las muestras. El objetivo de este estudio fue determinar la variabilidad genética y las dinámicas de transmisión de las muestras presentes en nuestro estudio, nuestra hipótesis es que las muestras están interrelacionadas y están distribuidas a través de todo el estado de Jalisco. Las muestras fueron obtenidas del laboratorio estatal de salud publica, el DNA fue aislado por la técnica de CTAB y se realizó una PCR para amplificar la secuencia de inserción IS6110 para verificar que las muestras pertenecían al complejo Mycobacterium tuberculosis. Después de esto la técnica de Spoligotyping y MIRU-VNTR de 24 locis fue realizada, los resultados fueron analizados mediante dendogramas y árboles de expansión mínima usando apropiados programas de bioinformática. En el estudio, 64 muestras fueron analizadas y la técnica de spoligotyping mostró un índice de discriminación de 0.64%. Siete diferentes linajes fueron identificados, huérfanos 53.96%, T 25.63%, H 7.93%, MANU 4.76%, X 3.17%, LAM y EAI5 1.68%, con la formación de seis clusters, lo cual sugiere que existen diferentes puntos de infección en la comunidad. Sin embargo cuando se realizó la técnica de MIRU, la cual tiene un índice de discriminación de 0.99, no se observó la formación de ningún cluster sugiriendo que las muestras no están interrelacionadas, y quizá está variabilidad esta relacionado a la baja adherencia al tratamiento.

Palabras Clave: M. tuberculosis; Spoligotyping; MIRU-VNTR; Dendogramas

INTRODUCTION

According to estimates of the World Health Organization (WHO), a third of the world´s population is infected with *Mycobacterium Tuberculosis* and 5-10% of infected people may develop active tuberculosis through his life [1]

Tuberculosis is a disease caused by the bacterium *M. tuberculosis*, which mainly attacks the lungs but can damage other organs such as the kidney, spine and brain; this disease if not treated properly can be deadly. Tuberculosis is spread through droplets that are released when an infected person with pulmonary TB coughs, sneezes, speaks or sings [2]

To identify strains, markers were based on the characteristics expressed by microorganisms, currently it has been replaced by molecular techniques that analyze the genetic fingerprint. In 1991 was obtaining sequences in the genome of *M. Tuberculosis*, this has been the starting point for comparing the genetic fingerprints of different isolates and therefore differentiate between different strains [3].

A variety of methods have been used to display polymorphism in *M. Tuberculosis* complex strains, these include restriction fragment length polymorphisms (RFLP), DNA hybridization (Spoligotyping), PCR (MIRU-VNTR) and combination of these methods [4]. Genotyping of clinical isolates of *M. Tuberculosis* has changed so many revolutionary concepts about tuberculosis transmission that had been accepted for decades[3] contributing to disease control, indicating possible epidemiological association between patients, detecting suspicious outbreaks, cross-contamination in the laboratory and distinguishing exogenous reinfection of endogenous reactivation in case of relapse [5].

The two methods that are used most often are Spoligotyping and MIRU-VNTR. Spoligotyping is widely used because of its relative simplicity, speed and low cost. Uses a locus in the genome of *M. tuberculosis* complex, the locus of the direct repeat (DR) consisting of alternating identical and different spacers. This technique detects variations in the locus of DR, which are sequences of 36 bp in 43 interposed DNA fragments of 31-41 bp not repeated spacer sequences [6]. The MIRU-VNTR technique is based on variable number of tandem repeat (VNTR`s) of genetic elements called mycobacterial interspersed repeat units (MIRU´s) [7]. This method is based on PCR amplification of multiple loci using primers specific for the regions flanking each locus repeated, this will give us an amplicon, which with its size reflects the number of copies of MIRU-VNTR [8].

In addition to the utility of the technique of MIRU to track the transmission of TB these markers also shed phylogenetic information, especially the 24 locus and can be used to predict clustering among the lineages of strains. This information is useful in view of the epidemiological control and can provide information on the source of cases of TB namely where the first case originated in an infection [9].

METHODOLOGY

We worked with strains isolated from patients with active tuberculosis, of pulmonary origin and extrapulmonary. The strains were granted by the State Public Health Laboratory of Jalisco with the corresponding drug susceptibility which was held at the VersaTREK equipment; the strains were inactivated by boiling (15 minutes at 100º C, vortex and reheated 15 minutes at 100º C). DNA was extracted by the CTAB method [10], and the insertion fragment amplification was performed with IS6110 conditions: Buffer 10X 2.5 µl, dNTP 0.5 µl, Primers 1 µl c/u, water 17.5 µl, DNA 20 ng, Taq 0.2 µl. Once it was confirmed that the samples belonged to Mycobacterium tuberculosis complex Spoligotyping technique was performed as previously described [11].

The technique of MIRU-VNTR locus 24 was also carried out as recommended by the author [12]. Once the results of both methods are obtained, this are entered in digital databases to obtain information concerning the proper lineage of strains of the study, for spoligotyping analysis the data is entered into the database of the Pasteur Institute of Guadaloupe (http://www.pasteur-guadeloupe.fr/tb/bd_myco.html) so far in this study is contained 58187 registred strains. In the case of data MIRU-VNTR digits are entered into the database www.miru-vntrplus.org where dendograms and minimum spanning trees are also conducted. The level of discrimination of the method was calculated using the Hunter-Gaston discriminatory index [13] and the rate of recent transmission [14].

RESULTS

México has an incidence of 16.8 cases reported per 100 000 habitants for 2012 which corresponded to 19697 TB cases reported. In this study 64 samples analyzed it was observed that there is a relationship of men: women 1.5, the mean age was 44.6 years, the most common drug resistance was isoniazid, the most common sample was spitting and the region in which more cases were obtained was in Puerto Vallarta. The samples were classified according to their resistance monoresistant give 33 samples (resistant to one antibiotic), 10 multiresistant (resistant to two or more different antibiotics isoniazid + rifampicin), 9 MDR (resistant to isoniazid + rifampicin) and 12 sensitive (without any antibiotic resistance).

Risk factors associated with tuberculosis were also assessment; social issues such as education and occupation were evaluated it was observed that there is no a clear tendency because the unemployed was just slight higher compared to patients with formal and informal jobs. No significant difference was observed in the education of patients because we have both without and with secondary school, high school and even finished bachelor degree. Were also evaluated comorbidities with tuberculosis the disease with the highest incidence was diabetes followed by HIV and the most common condition was alcoholism followed by malnutrition.

Amplification of the insert IS-6110 confirmed that all samples belong to the complex Mycobacterium, and then through Spoligotyping was performed genotyping by amplifying spacer sequences by PCR and hybridization in nylon membrane loaded with the DR region and finally developed with chemiluminiscence protocol. After the membrane was obtained each of the samples became to binary code and then an octal code for insertion into the database and they obtained different lineages present in the population: Orphans (53.96%), T (25.63%), H (7.93%), MANU (4.76%), X (3.17%), LAM y EAI5 (1.68%). A dendogram was made by the NJ technique to analyze whether there were clusters in the population which could point us that there are multiple infection points in this study and evolutionary distances can be evaluated in samples, results are shown in Figure 1a, sample analysis was also carried out using a minimum spanning tree which is shown in Figure 1b.

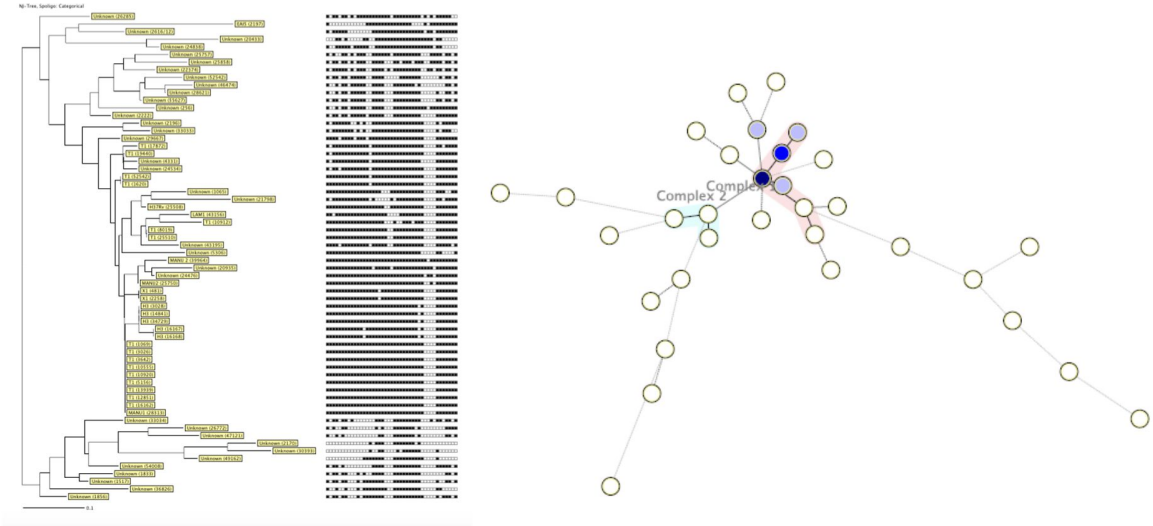


Figure 1a Dendogram clinical samples analyzed by the technique of spoligotyping, 1b minimum spanning tree.

In the dendogram we observe six well defined clusters as the spoligotyping pattern was identical, in the minimum spanning tree were observed two complex samples that had similar patterns among them, and samples referred to as orphaned observed in the farthest part of the branches of the tree that speaks of samples are genetically different to those previously reported.

The level of discrimination of the method was calculated using the Hunter- Gaston discriminatory index yielding a rate of 0.64, it was also calculated the transmission rate, which was 0.20 suggesting that in our population samples are not spreading actively.

Technique MIRU-VNTR loci 24 are then performed in dendogram analysis of samples with the two techniques, the analysis results are seen in Figure 2.

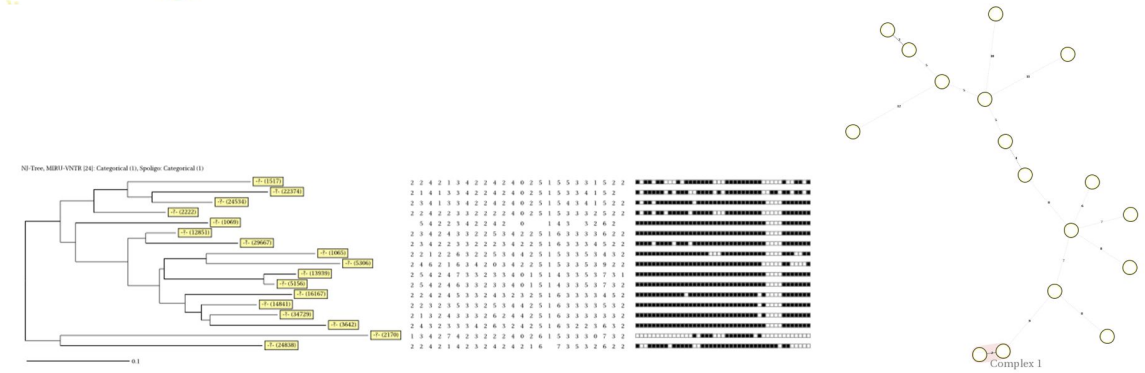


Figure 2. a) Dendogram of samples analyzed by the technique of Spoligotyping and 24 MIRU-VNTR loci; b) minimum spanning tree by both techniques.

Once the samples were analyzed by both techniques it was observed that no clusters were formed in the study population and in the minimum spanning tree, also they observed that the samples are dispersed throughout all branches, by forming a small complex suggesting that the samples are different from each.

DISCUSSIONS

In the population analyzed the relationship male: female for tuberculosis was 1.5. This data is according with previous studies that demonstrated that men probably has a risk factor for the disease [15]. In the population it became clear that the most common co-infection was diabetes which is a consistent with a study [16] in which they determined that the risk of active tuberculosis is several times that of conditions which are considered as major determinants of the incidence, they found that diabetes mellitus increases the risk of getting TB by a factor of 2-3 [17].

Regarding the technique spoligotyping in México have been reported data on genetic variability above, one of these was the study in Monterrey, México [18] in which he found that the family was the most prevalent with 41% which is consistent with our study because it equally has the most prevalence with 30% contrary to a study in Brazil where the predominant family with 47% was the LAM [19]. Strains with a unique pattern are called orphan consider that were acquired by migration, a recent reactivation of infection acquired in the distant or strains that are endemic in the region while they are studying [8, 20]. When analyzing samples only with the technique of Spoligotyping 6 cluster formation is observed in which patients who are within these clusters living in the same region or in nearby regions and even in some cases, antibiotic resistance is the same what might speak of a direct transmission of these same samples, however it is only 29% of the study population and was also reported previously that the method used spoligotyping autonomously has a high rate of clusters(76.3%) and low power of discrimination (HG 0.814) so we corroborate data with a second technique of genotyping in this case the MIRU-VNTR technique since this technique has a rate of formation of clusters of 15.5% and discrimination power of 0.999 but when used together have a rate of formation of clusters of 8.3% and discriminating power of 0.999 [19, 21] it is meaning that the analysis becomes more sensitive to form clusters with greater specificity; to analyze the data together with the two techniques is observed that there is no formation of clusters, namely all samples are different from each other so that the results suggest that there is a wide genetic variability in the study strains which may be due not to an active spread in the population if not for lack of adherence to treatment of patients in our population.

CONCLUSIONS

All the samples used for the study belonged to Mycobacterium tuberculosis complex. Orphans and T lineages were the most prevalent in our population, the highest proportion of orphaned strains may be due to strains endemic in the region, a possible human migration and evolution.

In conducting the study with both genotyping techniques, it was observed that the samples present in the state of Jalisco are different from each other so there is a large genetic variability in the population studied.

REFERENCES

[1] CENAVECE. *Guia para la atención de personas con tuberculosis resistente a fármacos*. 2010.

[2] CDC. *Tuberculosis*. Available from: http://www.cdc.gov/tb/.

[3] García-Pachón E., and Rodríguez J.C. Epidemiología molecular de la tuberculosis: principales hallazgos y su aplicación en España. Arch Bronconeumol, 2005, 41(11): p. 618 - 624.

[4] Kremer, K., van Soolingen, D., Frothingham, R., Haas, WH., Hermans, PW., Martín, C., Palittapongarnpim, P., Plikaytis, BB., Riley, LW., Yakrus, MA., Musser, JM., van Embden, JD. "*Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of Mycobacterium tuberculosis complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility".* J Clin Microbiol, 1999. **37**(8): p. 2607-18.

[5] Supply, P., Allix, C., Lesjean, S., Cardoso-Oelemann M., Rüsch-Gerdes, S., Willery, E., Savine, E., de Haas, P., van Deutekom, H., Roring, S., Bifani, P., Kurepina, N., Kreiswirth, B., Sola, C., Rastogi, N., Vatin, V., Gutierrez, M., Fauville, M., Niemann, S., Skuce, R., Kremer, K., Locht, C., van Soolingen D. "*Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of Mycobacterium tuberculosis".* J Clin Microbiol, 2006. **44**(12): p. 4498-510.

[6] Nava-Aguilera, E., López-Vidal, Y., Harris, E., Morales-Pérez, A., Mitchell, S., Flores-Moreno, M., Villegas-Arrizón, A., Legorreta-Soberanis, J., Ledogar, R., Andersson, N. "Clustering of Mycobacterium tuberculosis Cases in Acapulco Spoligotyping and Risk Factors". Clinical and Developmental Immunology.2011, 2011: 1-12.

[7] Varma-Basil, M., Kumar, S., Arora, J., Angrup, A., Zozio, T., Banavaliker, JN., Singh, UB., Rastogi, N., Bose, M. "*Comparison of spoligotyping, mycobacterial interspersed repetitive units typing and IS6110-RFLP in a study of genotypic diversity of Mycobacterium tuberculosis in Delhi, North India".* Mem Inst Oswaldo Cruz, 2011. **106**(5): p. 524-35.

[8] Said, H.M., Kock, M., Ismail, N., Mphahlele, M., Baba, K., Omar S., Osman, A., Hoose, A., Ehlers, M. "*Molecular characterization and second-line antituberculosis drug resistance patterns of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates from the northern region of South Africa".* J Clin Microbiol, 2012. **50**(9): p. 2857-62.

[9] Cardoso Oelemann, M., Harrison, M., Willery, E., Possuelo, L., Batista, K., Allix-Béguec, C., Locht, C., Yves-Olivier, L., de la Salmoniere, G., Gutierrez, M., Suffys, P., Supply, P. "*The forest behind the tree: phylogenetic exploration of a dominant Mycobacterium tuberculosis strain lineage from a high tuberculosis burden country".* PLoS One, 2011. **6**(3): p. e18256.

[10] Del Sal, G., Manfioletti, G., Schneider, C. (1989), "The CTAB-DNA precipitation method: a common mini-sclae preparation of template DNA from phagemids, phages or plasmids suitable for sequencing, Bio Techniques, 7 (5): 514-520.

[11] Kamerbeek, J., Schouls, L; Kolk, A., Van Agterveld, M., Van Soolingen, D., Kuijper, S., Bunschoten, A., Molhuizen, H., Shaw, R., Goyal, M., Van Embden J. (1997), "Simultaneous detection and strain

differentiation of Mycobacterium tuberculosis for diagnosis and epidemiology", J. Clin. Microbiol, 35 (4): 907 – 914.

[12] Supply, P., Allix, C., Lesjean, S., Cardoso, M., Rüsch, S., Willery, E., Savine, E., Bifani, P., Kurepina, N., Kreiswirth, B., Sola, C., Rastogi, N., Vatin, V., Gutierrez, M., Fauville, M., Niemman, S., Skuce, R., Kremer, K., Locht, C., van Sooliingen, D. (2006), "Proposal for standization of optimized Mycobacterial interspersed repetitive Unit Variable Numer Tandem Repeat Typing of Mycobacterium tuberculosis", J. Clin. Microbiol, 44 (12): 4498 – 4510.

[13] Hunter, P., Gaston, M. (1988), "Numerical index of the discriminatory ability of typing systems an application of Simpson`s index of diversity", J. Clin. Microbiol, 26 (11): 2465 – 2466.

[14] Small, P., Hopewell, P., Singh, S., Paz, A., Parsonnet, J., Ruston, D., Schecter, G., Daley, Ch, Schoolnik, G. (1994), "The epidemiology of tuberculosis in San Francisco—A population-Based study using conventional and molecular methods", N Engl J Med, 330 (24): 1703 – 1709.

[15] Ezekiel, G., Obi, L., Okoh, A., Nchabeleng, M., De Villiers, B., Letsoalo, T., Hoosen, A., Bessong, P., Ndip R. (2013), "IS6110 Restriction fragment length polymorphism typing of drug resistant Mycobacterium tuberculosis strains from Northeast South Africa", J health Popul Nutr, 31 (1): 1 – 10

[16] Aguilar, C. (2005), "Diabetes y tuberculosis: En el laberinto del subdesarrollo", Rev Invest Clin, 57 (1): 82-84.

[17] Kumar, A., Jain, D., Satyanarayana, S., Zachariah, R., Harries, A. (2013), "Screening of patients with tuberculosis for diabetes mellitus in India", TM y IH, 0 (0): 1-9.

[18] Molina-Torres, C.A., et al., *Mycobacterium tuberculosis spoligotypes in Monterrey, Mexico.* J Clin Microbiol, 2010. **48**(2): p. 448-55.

[19] Pitondo-Silva, A., et al., *Comparison of three molecular typing methods to assess genetic diversity for Mycobacterium tuberculosis.* J Microbiol Methods, 2013. **93**(1): p. 42-8.

[20] Luciani, F., A.R. Francis, and M.M. Tanaka, *Interpreting genotype cluster sizes of Mycobacterium tuberculosis isolates typed with IS6110 and spoligotyping.* Infect Genet Evol, 2008. **8**(2): p. 182-90.

[21] Huang, S.F., et al., *Association of Mycobacterium tuberculosis genotypes and clinical and epidemiological features - a multi-center study in Taiwan.* Infect Genet Evol, 2012. **12**(1): p. 28-37.

EVALUATION OF CLONAL ANERGY AND APOPTOSIS IN MURINE SPLENOCYTES IMMUNIZED WITH THE RECOMBINANT PROTEIN GST-NS3 OF DENGUE VIRUS

(Evaluación de anergia clonal y apoptosis en esplenocitos murinos inmunizados con la proteína recombinante GST-NS3 del virus dengue)

Karen García-Alejandro[a*+], Víctor Adolfo Romero-Cruz[a], Angel Ramos-Ligonio[a,b], Aracely López-Monteon[a,b].

[a] Maestría en Ciencias en Procesos Biológicos, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Veracruzana, Orizaba, Veracruz, México
[b] LADISER Inmunología y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Veracruzana, Orizaba, Veracruz, México

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: karenalex2590@gmail.com

Área del Conocimiento: Biología Molecular

ABSTRACT
Dengue is one of the most important disease in public health with the highest incidence in the world; it's caused by one of all four serotypes (DEN-1, 2, 3 and 4) of dengue virus, which is transmitted to humans by the bite of *A. aegypti* mosquito; these serotypes are responsible of the infection that can cause dengue or severe dengue. To date, there is no effective vaccine against the dengue virus, in previous studies it was found that there´s no proliferation in mouse splenocytes immunized with GST-NS3 recombinant protein derived from the four serotypes of the dengue virus. It has been reported that NS3 protein of dengue virus, causes apoptosis in cells of immune system infected with this virus, through the exposure of phosphatidylserine and the activation of effector caspases 3 and 7; as well as this protein inhibits the interaction between co-stimulatory molecules (CD28, CD80, CD86, CD278) and/or produce inhibitory molecules of proliferation (CTLA-4), inducing clonal anergy in cells of immune system. In this study, the ability of the recombinant protein was evaluated for inducing clonal anergy and apoptosis in mouse splenocytes; for this, flow cytometry assays were performed to determinate clonal anergy or apoptosis. The recombinant protein GST-NS3 induced translocation of phosphatidylserine and activation of effector caspases 3 and 7 in mouse splenocytes immunized by recombinant proteín GST-NS3 of dengue virus. Similarly, it induced the expression of the marker CTLA-4. In conclusion, the recombinant protein GST-NS3 induced apoptosis and clonal anergy in mouse splenocytes.

Keywords: dengue; NS3 protein; clonal anergy; apoptosis.

RESUMEN
El dengue es una de las enfermedades más importantes en salud pública con la más alta incidencia en el mundo; es causado por uno de los cuatro serotipos (DEN-1, 2, 3 y 4) del dengue virus, el cual es transmitido a los humanos por la picadora del mosquito *A. aegypti*; estos serotipos son los responsables de la infección que puede causar dengue o dengue severo. A la fecha, no existe una vacuna eficiente en contra del virus dengue, y en estudios previos se encontró que no hay proliferación en esplenocitos de

ratones inmunizados con la proteína recombinante GST-NS3 derivada de los cuatro serotipos del virus. Se ha reportado que la proteína NS3 del virus dengue, causa apoptosis en células del sistema inmune infectadas con el virus, a través de la exposición de fosfatidilserina y la activación de las caspasas efectoras 3 y 7; así como también, esta proteína inhibe la interacción entre moléculas co-estimulatorias (CD28, CD80, CD86, CD278) y/o produce moléculas de inhibición de la proliferación (CTLA-4), induciendo anergia clonal en células del sistema inmune. En este estudio, se evaluó la habilidad de la proteína recombinante de inducir anergia clonar o apoptosis. La proteína recombinante GST-NS3 induce la translocación de la fosfatidilserina y la activación de caspasas efectoras 3 y 7 en esplenocitos de ratones inmunizados con la proteína recombinante GST-NS3 del virus dengue. Similarmente, ésta indujó la expresión del marcador CTLA-4. En conclusión, la proteína recombinante GST-NS3 induce apoptosis y anergia clonal en esplenocitos de ratones.

Palabras Clave: dengue; proteína NS3; anergia clona; apoptosis

INTRODUCCIÓN

El dengue es una enfermedad viral perteneciente a la familia flaviviridae; su principal vector es el mosquito hembra del género *Aedes aegipty* y es transmitido al humano a través de la picadura de éste [1]. Existen cuatro serotipos del DENV (DEN1, DEN2, DEN3 y DEN4) que están estrechamente relacionados pero son antigénicamente distintos [2]. El genoma viral contiene un único marco de lectura abierto que codifica para una poliproteína de 3,391 aminoácidos, que se procesa en 10 proteínas individuales, tres estructurales: proteína de membrana (M), de cápside (C) y de envoltura (E) y 7 no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) [3]. La escisión de esta poliproteína, que representa un paso esencial para la replicación viral, se realiza por enzimas del huésped y por la proteasa viral NS3 [4].

La infección por el DENV en América, como en el resto del mundo, está aumentando drásticamente. Actualmente, México podría ser considerado como una región endémica para el dengue ya que el mosquito vector *A aegypti* está presente en más del 85% del país [5]. En la actualidad, se estima que se encuentran en riesgo de adquirir la infección dos quintas partes de la población mundial, ya que la infección es endémica en más de 100 países y se contempla una proyección anual de unos 50-100 millones de casos nuevos/año, con 36 millones de casos dengue, más de 2 millones de casos de dengue grave y más de 21,000 muertes por año [6, 7].

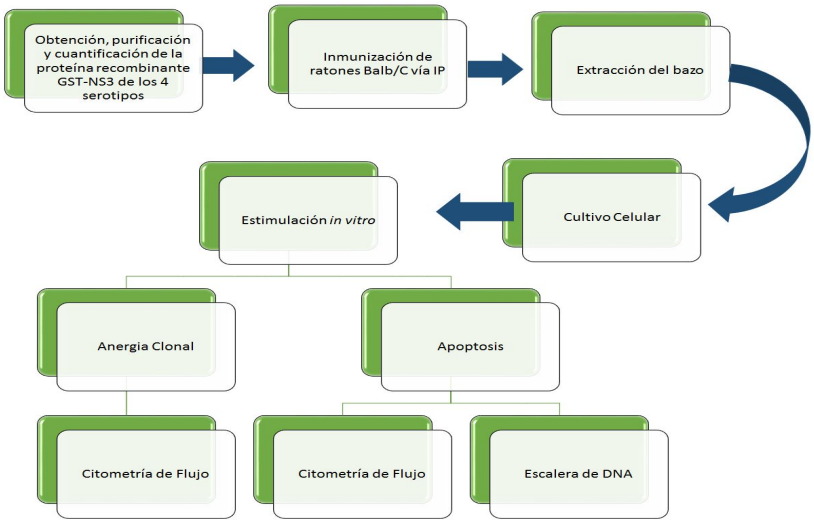
La respuesta inmune celular tiene un papel importante en la protección contra la infección por el virus dengue y actualmente existen pocos trabajos que se enfoquen al estudio de la respuesta inmune generada por proteínas recombinantes. Generalmente, cuando el sistema inmune es activado, deben existir procesos de desactivación que ayuden a que el organismo no entre en un estado de autoinmunidad, sin embargo, estos procesos no deben de presentarse antes de que la respuesta inmune celular sea completada para que el patógeno en particular pueda ser eliminado y no deberá interferir con el establecimiento de una adecuada memoria inmunológica [8].

La proteína NS3 del virus dengue es una proteasa que participa activamente durante la replicación del virus además contiene la mayoría de epítopes para células T y es el principal blanco de células T $CD4^+$ y $CD8^+$ [9], por lo que la proteína recombinante GST-NS3 es considerada una candidata a vacuna contra el virus dengue, sin embargo, en trabajos recientes en donde se estudió el potencial inmunógenico, específicamente en la respuesta inmune celular, se observó que la proteína GST-NS3 no indujo una proliferación de linfocitos T de ratón. La falta activación de las células T puede ser explicada por una hiperactivación de las células de bazo de los ratones inmunizados con las proteínas recombinantes lo

que conllevo a que las células entrarán en un estado de anergia o de una falta total de inmunidad de memoria [10]. Por otro lado, existen varios reportes en donde se ha visto que la replicación viral activa o la expresión de proteínas virales pueden contribuir a la inducción de apoptosis en células hepáticas, neuronas y células epiteliales [11].

METODOLOGÍA.

Se obtuvo, se purificó y se cuantificó la proteína recombinante GST-NS3 de los 4 serotipos; una vez lista la proteína se procedió a inmunizar a ratones hembra de la cepa Balb/C vía intraperitoneal. Una vez inmunizados los ratones, se esperó el tiempo necesario y se procedió a la extracción del bazo para realizar el cultivo celular y estimular las células *in vitro*. Al término del tiempo de incubación se realizaron los tratamientos pertinentes para el marcaje de las células de acuerdo a anergia clonal o apoptosis, para posteriormente ser leídas en el citómetro de flujo; y con electroforesis se determinó el patrón de escalera de DNA ocasionado por la apoptosis.



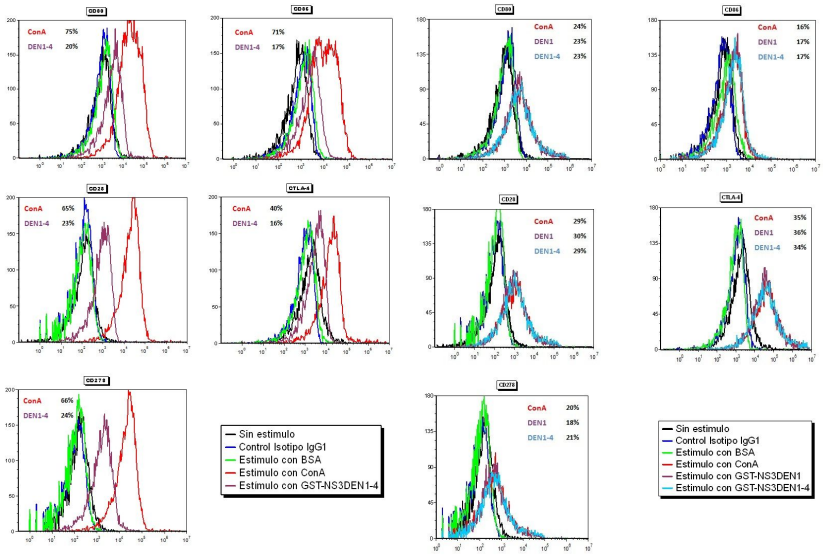
RESULTADOS

La proteína recombinante GST-NS3 de cada uno de los serotipos (DEN1, DEN2, DEN3 Y DEN4) se purificó por cromatografía de afinidad a glutatión. Estas fueron purificadas a partir de la transformación de *E. coli* DH5α en el plásmido pGEX-5x-1 que contenía al gen NS3 de cada serotipo (pGEX-NS3DEN1, pGEX-NS3DEN2, pGEX-NS3DEN3 y pGEX-NS3DEN4). Las proteínas de los cuatro serotipos se separaron electroforéticamente en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10% para su identificación, observándose las cuatro proteínas recombinantes de un peso molecular aproximado de 49 kDa, correspondientes a 22 kDa de la región proteasa de la proteína NS3 más 27 kDa de la proteína de fusión. Con las proteínas purificadas y cuantificadas se realizaron los cálculos pertinentes para la inmunización de ratones hembra de la cepa BALB/c. Después de inmunizar a los ratones con las proteínas recombinantes de cada serotipo, se realizó la extracción de los bazos, con los cuales se obtuvieron suspensiones celulares que fueron estimuladas *in vitro* con las proteínas de cada serotipo y con sus respectivos controles; una vez trascurrido el tiempo de incubación, se procedió a realizar los ensayos de citometría de flujo para determinar anergia clonal y la apoptosis. Para la determinación de anergia clonal, a las células obtenidas

de las placas se le adicionaron los anticuerpos de acuerdo a descrito en la Tabla 1, y se leyeron en el citómetro de flujo (Figura 1).

Tabla 1. Marcaje de células con anticuerpos para ensayos de citometría de flujo

Células de bazo	Estímulo	Anticuerpos
Ratones No inmunizados	S/E	Sin marcaje
Ratones No inmunizados	S/E	Marcadas con: α-CD28- PE-Cy®5 α-CD80 (B71) - FITC α-CD152 (CTLA-4) - PE α-CD278 (ICOS) - Pacific Blue™
Ratones No inmunizados	Antígenos	
Ratones inmunizados	S/E	
Ratones inmunizados	Antígenos	
Ratones No inmunizados	S/E	α-isotipo IgG1



No inmunizados Inmunizados

Figura 1. Histogramas correspondientes a células de bazo de ratones no inmunizados e inmunizados con la proteína GST-NS3 del serotipo 1 y estimulados con los antígenos. Se muestra el porcentaje de expresión de moléculas de coestimulación (CD80, CD86, CD28 y CD278) y moléculas de inhibición (CTLA-4) en los esplenocitos de ratón.

En lo que respecta a determinación de apoptosis las células fueron estimuladas con la proteína GST-NS3 de los cuatro serotipos y fueron marcados con Anexina V para detectar la exposición de la fosfatidilserina; y para la detección por activación de caspasas 3 y 7 se marcaron con el fluorocromo SYTOX, después del marcaje, se leyeron a en el citómetro de flujo de acuerdo a su fluorocromo. Las gráficas muestran un resultado representativo (GST-NS3DEN4), debido a que los cuatro serotipos se comportaron de igual manera (Figura 2).

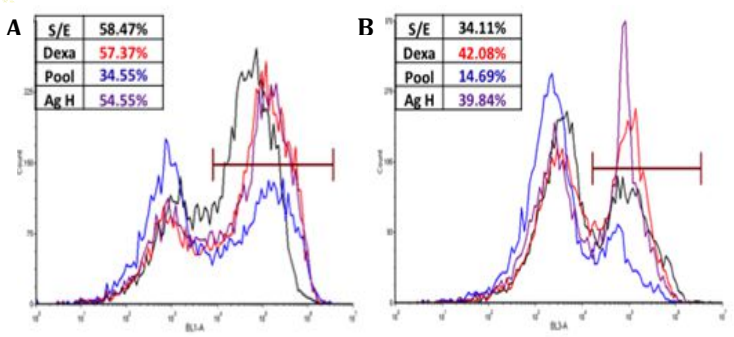


Figura 2. **A)** Determinación de apoptosis mediante la unión con Anexina V en esplenocitos de ratones inmunizados con la proteína GST-NS3DEN4, bajo las siguientes condiciones: S/E (línea negra), desametaxona 20 µg/mL (línea roja), con el *pool* de proteínas 10 µg/mL (línea azul) y con GST.NS3DEN4 10 µg/mL (línea morada). **B)** Tinción con SYTOX para activación de caspasas 3 y 7 en esplenocitos de ratones nmunizados con la proteína GST-NS3DEN4, bajo las siguientes condiciones: S/E (línea negra), desametaxona 20 µg/mL (línea roja), con el *pool* de proteínas 10 µg/mL (línea azul) y con los antígenos homólogos según corresponda 10 µg/mL (línea morada).

DISCUSIÓN

En estudios previos, se observó que la proteína NS3 induce inmunosupresión en células de bazo de ratones inmunizados [12] y se ha demostrado que puede inducir apoptosis en células epiteliales, células hepáticas y neuronas durante la replicación o al expresarse las proteínas virales [13]. Esta reportado que debe existir un equilibrio dinámico entre la activación de las células T, la proliferación de éstas y su muerte celular. La activación y la muerte de estas células conllevan a la liberación de citocinas, lo cual se ha visto que provoca la inducción masiva de muerte celular de linfocitos T CD4+ y CD8+ en varios modelos murinos [14]. El reconocimiento por las células T de un complejo MHC-péptido antigénico (señal 1) causa en ocasiones un estado de falta de respuesta llamado anergia clonal, caracterizado por incapacidad de las células de proliferar en respuesta a un complejo péptido-MHC. El desarrollo de expansión o anergia clonal depende de la presencia o ausencia de una señal coestimuladora (señal 2), que se produce por la interacción de CD28 en células T con B7 en células presentadoras de antígeno. Una célula T puede ser anergizada de varias maneras. Además de la falta de señales coestimuladoras, la presencia de CTLA-4 en una célula que ha recibido tanto la señal 1 como la señal 2 puede bloquear la coestimulación y funcionalmente dar por resultado anergia [15], este efecto fue observado en nuestros resultados ya que hubo presencia de moléculas coestimuladoras como CD28 y CD80, sin embargo, también hubó expresión de la molécula CTLA-4, lo que da lugar a la ausencia de proliferación en los esplenocitos de ratón. Los resultados de apoptosis concuerdan con los obtenidos por Ramanathan en el 2005, observándose la activación de caspasas 3 y 7 [16].

CONCLUSIONES

Los resultados permiten concluir que la proteína GST-NS3 de los cuatro serotipos del virus inducen anergia clonal a través de la expresión de la molécula de inhibición CTLA-4. De igual manera se logró determinar la traslocación de la fosfatidilserina y la activación de caspasas efectoras, lo que demuestra que ambos mecanismos intervienen en el efecto de inhibición de la proliferación de los esplenocitos de ratón.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACyT por la beca otorgada a KGA (Becario Número 288057, CVU 515483), estudiante del Programa de Maestría en Ciencias en Procesos Biológicos.

REFERENCIAS

[1] Durbin A. P. and Whitehead S. S. (2011). "Next-generation dengue vaccines: novel strategies currently under development," Viruses, vol. 3, no. 10, pp. 1800–1814

[2] Gubler D. J. (1998.). "The global pandemic of dengue/dengue hemorrhagic fever: current status and prospects for the future," Annals of the Academy of Medicine Singapore, vol. 27, no. 2, pp. 227–234

[3] Harris E., Holden K. L., Edgil D., Polacek C., and Clyde K. (2006). "Molecular biology of flaviviruses," Novartis Foundation Symposium, vol. 40, no. 71-73, pp. 251–253.

[4] Acosta-Bas, C. y Gómez-Cordero I. (2005). Biología y métodos diagnósticos del dengue. Biología y métodos diagnósticos del dengue. Rev Biomed. 16:113-137.

[5] CENAVECE. (2014). "Dengue; distribución del vector," http://www.cenave.gob.mx/Dengue

[6] Durbin, A. P.; Whitehead, S. S.; Blaney, J. E. y Murphy, B. R. (2007). Prospects for a dengue virus vaccine. *Nature*, 5: 518-528.

[7] Murrell, S; Wu, S.C.; Butler, M. (2011). Review of dengue virus and the development of a vaccine. *Biotechnol Adv.* 29 (2):239-47.

[8] Bronte, V.; Wang, M.; Overwijk, W.W.; Surman, D.R.; Pericle, F.; Rosemberg, S.A. y Restifo, N.P. (1998). Apoptotic death of CD8+ T lymphocytes after immunization: induction of a suppressive population of Mac-1/Gr-1+ cells. *J. Immunol*, 161 (10): 5313-5320.

[9] Mathew, A. y A. L. Rothman. (2008). Understanding the contribution of cellular immunity to dengue disease pathogenesis. Immunological Reviews, vol. 225(1):300–313.

[10] Schwartz, R.H. (2003). T cell anergy. *Annu Rev*, 21:305-334.

[11] Duarte Dos Santos, C.N.; Frenkiel, M.P.; Courageot, M.P.; Rocha, C.F.; Vazeille-Falcozz, M.C.; Wien, M.W.; Rey, F.A.; Deubel, V. y Despres, P. (2000). Determinants in the envelope E protein and viral RNA helicase NS3 that influence the induction of apoptosis in response to infection with dengue type 1 virus. *Virology*, 274(2): 292-308.

[12] Álvarez-Rodríguez, LM (2012). Estudio de la respuesta immune inducida por la inmunización de una proteína recombinante derivada del virus dengue (Tesis Doctoral, Universidad Veracruzana): 90-95.

[13] Shafee, N. and AbuBakar, S. (2003), "Dengue virus type 2 NS3 protease and NS2B-NS3 protease precursor induce apoptosis". Journal of General Virology, 84: 2191-2195.

[14] Mongkolsapaya, J., Dejnirattisai, W., Xu, X., Vasanawathana, S., Tangthawornchaikul, N., Chairunsri, A., Sawasdivorn, S., Duangchinda, T., Dong, T., Rowland-Jones, S., Yenchitsomanus, P., McMichael, A., Malasit, P. and Screaton, G. (2003), "Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever". Nature Medicine, 9(7): 921-927.

[15] Kindt, T., Goldsby, R., Osborne, B. (2007). Inmunología de Kuby. (6 ed). México, DF. McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C.V. pp 245-266.

[16] Ramanathan, M.P., Chambers, J.A., Pankhong, P., Chatergoon, M., Attatippaholkum, W., Dang, K., Shah, N. and Weiner, D.B. (2005), "Host cell killing by the West Nile Virus NS2B-NS3 proteolytic complex: NS3 alone is sufficient to recruit caspase-8-based apoptotic pathway" Virology 345: 56-72.

IDENTIFICATION OF IMMUNOGENIC PROTEINS FROM OVARIAN TISSUES OF THE CATTLE TICK *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* BY AN IMMUNOPROTEOMIC APPROACH

(Identificación de proteínas inmunogénicas de tejido de ovarios de la garrapata de ganado *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* mediante un enfoque inmunoproteómico)

Patricia Berenice Ramírez Rodríguez[a*], Rodrigo Rosario Cruz[b], Rodolfo Hernández Gutiérrez[a], Sara Elisa Herrera Rodríguez, Daniel Ortuño Sahagún[c], Delia Inés Domínguez García[a], Darwin Elizondo[a], Moisés Martínez Velázquez[a+]

[a] Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.
Biotecnología Médica y Farmacéutica. Avenida Normalistas 800, Col. Colinas de la Normal, 44270, Guadalajara, Jalisco, México.
[b] Unidad Académica de Ciencias Naturales. Centro de Investigaciones en Biotecnología Salud y Ambiente BioSA-UAGro. Carretera Fed. Chilpancingo-Acapulco s/n, exrancho Shalako Petaquillas, Guerrero.
[c] Instituto de Investigación en Ciencias Biomédicas (IICB), CUCS, Universidad de Guadalajara. Sierra Mojada No. 950, Col. Independencia, 44340, Guadalajara, Jalisco, México.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: mmartinez@ciatej.mx

Área del Conocimiento: Biología Molecular

ABSTRACT
Rhipicephalus (Boophilus) microplus ticks are a serious health problem for livestock at tropical and subtropical areas around the world. They are the most important vectors of tropical diseases and represent major economic losses on cattle industry. Furthermore, the increased development of acaricide resistance and the possibility of environmental contamination by the chemical treatments have led to the search of alternative control methods, such as vaccination. In this light, vaccines are a feasible tick control strategy that reduces environmental impact and food contamination. The commercial vaccine Gavac, formulated with the recombinant Bm86 antigen, a tick gut membrane protein, has been used in several vaccination programs. However, different levels of efficacy to *R. microplus* strains have been observed, which can be attributed to genetic variations in the target protein. Tick ovaries play a key role in physiological and reproductive functions of the parasite and, therefore, they represent essential targets in the life cycle of the tick. For this reason, the objective of this study was to characterize immunogenic proteins from ovary tissues in order to find novel vaccine candidates. Briefly, tick ovaries were collected from engorged adult female ticks; proteins were extracted from the tissues and used to immunize susceptible cattle in controlled conditions. Serum antibody titer from immunized animals was measured by ELISA assays. Subsequently, proteins were analyzed by SDS-PAGE 1D and 2D and Western Blot procedure. The proteins recognized by immune sera on Western Blot assays were analyzed by LC-MS/MS. Sample analyses resulted in the identification of seven proteins named as 1-Ova-sol through 7-Oval-sol. The identified immunogenic proteins may represent novel vaccine candidates. The one labeled as 3-Ova-sol was selected for further characterization as a future candidate vaccine target.
Keywords: Ticks, *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*, vitellogenin, ovary, vaccine.

RESUMEN
Las garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* son un problema de salud grave para la ganadería en zonas tropicales y subtropicales del mundo. Son los vectores más importantes de enfermedades tropicales y representan grandes pérdidas económicas para la ganadería. El aumento de la resistencia hacia los acaricidas y la posibilidad de contaminación ambiental durante el uso de tratamientos químicos, han impulsado la búsqueda de métodos de control alternativos. En este sentido, las vacunas son una estrategia de control de garrapata factible que reduce el impacto ambiental y contaminación de los alimentos. La vacuna comercial Gavac, formulada con el antígeno recombinante Bm86, una proteína de membrana del intestino medio de garrapata, se ha utilizado en varios programas de vacunación. Sin embargo, diferentes niveles de eficacia para cepas de *R. microplus* han sido observados, lo que puede atribuirse a variaciones genéticas en la proteína blanco. Los ovarios de la garrapata desempeñan un papel clave en funciones fisiológicas y reproductivas del parásito y por lo tanto, constituyen objetivos esenciales en el ciclo de vida de la garrapata. Por esta razón, el objetivo de este estudio fue caracterizar las proteínas inmunogénicas de tejidos de ovario para encontrar a nuevas candidatas de vacuna contra la garrapata. Brevemente, los ovarios se recolectaron de garrapatas hembras adultas ingurgitadas; las proteínas fueron extraídas de los tejidos y usadas para inmunizar bovinos susceptibles en condiciones controladas. La concentración de anticuerpos en el suero de animales inmunizados fue medida mediante ensayos de ELISA. Posteriormente, se analizaron las proteínas por SDS-PAGE 1D y 2D y Western Blot. A continuación, se analizaron las proteínas reconocidas por sueros inmunes en los ensayos Western Blot por LC-MS/MS. Los resultados mostraron la identificación de siete proteínas nombradas 1-Ova-sol hasta 7-Oval-sol. Las proteínas inmunogénicas identificadas podrían ser nuevas candidatas para vacunas. Aquella etiquetada como 3-Ova-sol fue seleccionada para su caracterización con el objetivo de presentarse como una futura candidata para vacuna.

Palabras Clave: Garrapatas, *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*, vitelogenina, ovario, vacuna.

INTRODUCCIÓN
Las garrapatas *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* son el principal ectoparásito hematófago que afecta al ganado bovino, ya que sirve como vector de agentes causantes de enfermedades como los protozoos *Babesia bovis* y *B. bigemina* y bacterias como *Anaplasma marginale*. También, causan una baja productividad en la industria bovina, ya que provocan anemia, reducción en la producción de leche y carne, disminución de su peso, así como la depreciación del valor comercial de la piel [1,2]. Para controlar las poblaciones de garrapatas, se utilizan acaricidas químicos; sin embargo, el manejo indebido de estas moléculas ha incrementado la incidencia de garrapatas resistentes a los acaricidas [4,6]; además, de provocar contaminación ambiental y problemas con la inocuidad de los alimentos. La vacuna Gavac®, es capaz de inducir una respuesta en los animales vacunados, que permite mantener controlados a estos parásitos. Esta vía tiene como perspectiva una protección de mayor duración y está exenta de problemas de índole ambiental [7]. La vacuna se compone de un antígeno recombinante (Bm86), derivado de una proteína de membrana del intestino de la garrapata [9]. Su uso resulta en la reducción de entre 60% y 80% dependiendo de la región en que se utilice. Estas diferencias en la eficacia protectora se han atribuido a variaciones genéticas de la proteína blanco. Por otro lado, se ha observado que la digestión del alimento de la sangre aporta nutrientes importantes para mantener la ovogénesis del parásito y las vías metabólicas [5]. De ahí la importancia de desarrollar vacunas a partir de proteínas del intestino de la garrapata o de los ovarios; si se logra obtener una proteína blanco de ovario la cual

sea capaz de inducir la producción de anticuerpos contra estas mismas, se podría evitar la producción de huevos de las garrapatas y tratar el problema del control de poblaciones de garrapatas. Sin embargo, hasta la fecha sólo un número limitado de proteínas de garrapatas han sido identificadas. Por lo que el desarrollo de una vacuna con proteínas de intestino o de ovario contra las garrapatas, representa en la actualidad una mejor opción para sustituir el control químico [3].

METODOLOGÍA

Obtención y preparación de muestras de tejidos de ovario de la garrapata *R. microplus* y extracción de proteínas (INIFAP). La extracción de tejidos de ovario y proteínas, fue de la cepa de la garrapata *R. microplus* donada el laboratorio de artrópodos del Cenid-Pavet, INIFAP una cepa susceptible a ixodicidas que fue colectada originalmente en Tapalpa, Jal., México.

SDS-PAGE de proteínas de ovarios de garrapata *R. microplus* en 1D (INIFAP y CIATEJ). Se realizaron geles de poliacrilamida de 7cm de ancho x 8cm de largo y 1.0 mm de espesor, a concentraciones de 12% y 15%. La electroforesis se llevó a cabo con el sistema Mini-PROTEAN® Tetra System de Bio-Rad. Las imágenes digitales se tomaron con el Fotodocumentador Bio-Rad® modelo Gel-Doc 2000XR.

Electroforesis de proteínas en 2D (CIATEJ). Se realizaron según el manual 2-D Electrophoresis (GE Healthcare).

Inmunizaciones (INIFA, Guerrero). Protocolo de Inmunización. Los bovinos fueron distribuidos en 3 grupos de 2 bovinos cada uno. El primer grupo testigo, fue tratado con solución salina más adyuvante. Los 4 animales fueron inmunizados con 2 dosis de 100 µg de proteínas adyuvadas en Montanide (ISA50V, Sepic®) en un volumen final de 2 ml por dosis los días 0, 15 y 30, vía intramuscular profunda mediante jeringas de 5 ml con agujas de 18G.

Recolección de sueros inmunes (INIFAP, Guerrero). Se obtuvieron muestras de sangre de la vena caudal en tubos de 5 ml de todos los animales semanalmente durante dos meses y medio. El suero se obtuvo por centrifugación a 1500 rpm y se almacenó a -20°C.

Título de anticuerpos mediante ELISA (INIFAP, Guerrero). ELISA tipo sándwich: Se agregó 0.1 µg/pozo de cada antígeno de larva para cubrir las placas, se incubaron durante una noche a temperatura de 4°C. Los sueros fueron diluidos a concentraciones de 1:10, 1:100 y 1:1000 en solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) adicionada con Tween 20 al 0.5% (PBS-T 0.5%) con un pH de 7.2 y suero bovino de la sexta semana de inmunización, las placas incubadas 1 hora a 37°C. Posteriormente las placas fueron incubadas con IgG de bovino acoplado a peroxidasa a una concentración 1:10,000 durante 1 hora a 37°C. Se adicionó el sustrato y la reacción de color se desarrolló con tetrametyl bencidina (Sigma). La reacción de color se detuvo mediante la adición de H_2SO_4 2 N.

Segunda Dimensión (SDS-PAGE). Se realizó en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), se llevó a cabo en el sistema MiniPROTEAN® Tetra Electrophoresis System de Bio-Rad. Se prepararon los geles de poliacrilamida de 7cm de ancho x 8 cm de largo y 1.0 mm de espesor, a una concentración de 10%. Al igual que en los ensayos de electroforesis 1-D, los geles se prepararan con dos fases: gel concentrador y gel separador. Se utilizaron marcadores de peso molecular de Kaleidoscopio preteñidos (Bio-Rad Laboratories).

Ensayos de Western Blot. La electrotranferencia se llevó a cabo a partir de un gel SDS-PAGE de una o dos dimensiones, que contenía proteínas totales a una membrana de nitrocelulosa. Para el cual se utilizó el equipo Mini-Trans-Blot (Bio-Rad Laboratories). La electrotransferencia se llevó a cabo a 120V 60 min.

LC/MS-MS de proteínas. El análisis de las proteínas se realizó en la Columbia University Collegue of Physicians and surgeons.

Amplificación de los genes que codifiquen para las proteínas identificadas, mediante LC-MS/MS (CIATEJ). Los espectros obtenidos de las huellas peptídicas de cada proteína con LC-MS/MS, se

compararon con los datos reportados en la base de National Center for Biotechnology Information (NBCI) para identificar a qué proteína corresponden. Posteriormente se diseñaron los oligonucleótidos. La amplificación se llevó a cabo mediante técnica de PCR con un Kit de la marca illustra™ puReTaq Ready-To-Go PCR Beads. Y se realizó un gel de electroforesis de agarosa al 1% para comprobar si se habían amplificado los productos.

RESULTADOS

Extracción de tejidos de ovario de la garrapata *R. microplus.* Se colocó una garrapata en el centro de la caja Petri con PBS (15mL) para diseccionarla y obtener los tejidos de ovario.

Extracción de proteínas totales de los tejidos de ovario de la garrapata *R. microplus.* Se colocaron 100mg de tejido de ovario de las garrapatas en tubo eppendorf con 1mL de PBS. Se disgregaron con pistilo para eppendorf. Se pasaron por jeringa de insulina entre 7 y 10 veces hasta visualizarse los tejidos disueltos completamente, se colocaron a -70 °C durante 5 min tres veces, para dar choque térmico y finalmente se resuspendieron. Por último se centrifugaron a 12 000 rpm durante 15 min a 4°C. Las pastillas que se recuperaron, se lavaron con PBS y se centrifugaron 5 min a 4°C a 13000 rpm. A continuación estas muestras fueron sonicadas 5 min. Finalmente las proteínas se cuantificaron por el método de Bradford en microplaca y se visualizaron en gel de poliacrilamida.

Dosis de proteínas para inmunizar a los bovinos. Se utilizaron 100µg de proteínas de ovario solubles e insolubles disueltas en 2mL de PBS más adyuvante 1:1. 2mL para el día 0 y 2mL para el día 15 por cada animal.

Grupos de animales para inmunizarse. Se formaron grupos a partir de seis bovinos; estos animales fueron seleccionados al azar, tres personas participaron, en este sorteo. Cada una sacó de una bolsa dos papeles, donde venía marcado el número de los animales y de otra bolsa, el nombre de una proteína, para hacer los grupos. El procedimiento se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Grupos de bovinos con el número de arete de cada uno

Grupo 1	**Grupo 2**	**Grupo 3**
Proteínas de Ovario solubles (Ova-Sol)	Proteínas de Ovario insolubles (Ova-Insol)	Testigo
Arete No. 46 Arete No. 42	Arete No. 52 Arete No. 43	Arete No. 48 Arete No. 45

Calendario de inmunización. Para llevar un control adecuado se realizó un calendario de actividades en el cual se detallaron los días de sangrado e inmunización (Fig. 1).

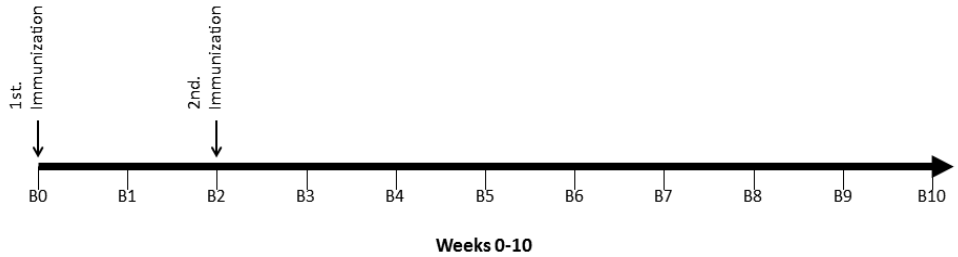


Figura 1. Línea en el tiempo en la cual se señala el día cero la 1ra. Inmunización y al día 15 la segunda inmunización. Las letas B0 a B10 significan los sangrados que se realizaron semanalmente a los bovinos.

Ensayos de ELISA. Se realizaron ensayos de ELISA tipo sándwich, con los sueros inmunes colectados, para evaluar el título de anticuerpos. Se muestra la curva del comportamiento de las proteínas en la gráfica (figura 2). Se puede apreciar el aumento de anticuerpos IgGs con respecto al tiempo, durante 11 semanas, considerada la semana uno como la semana cero. La prueba de ELISA se realizó con 110

muestras por triplicado, se leyó a los 20 min y a los 30 min en espectrofotómetro Bio-Rad xMARK™. Se puede apreciar además que el testigo permaneció constante, sin incremento de anticuerpos.

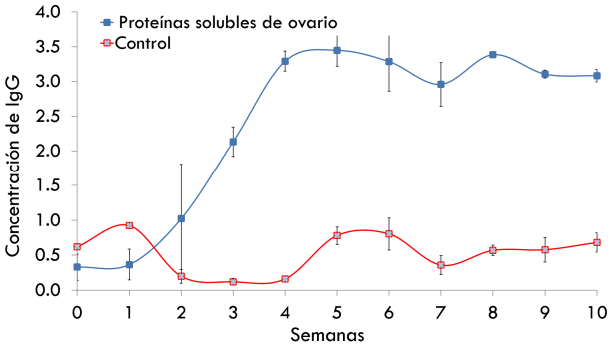


Figura 2. De color rojo se muestra la línea de las proteínas de ovario solubles, de color azul se muestra la línea de las proteínas insolubles y finalmente de color morado se muestra la línea del testigo.

SDS-PAGE y Western-Blot 1D. Se corrieron las fracciones proteicas solubles e insolubles y la unión de las dos fracciones nombradas como completa en geles SDS-PAGE y posteriormente se transfirieron a membrana de nitrocelulosa (Figura 3A y 3B). Para el ensayo de Western Blot se utilizó como primer anticuerpo los sueros de la sexta semana de las muestras 46 y 42 IgG de bovino como segundo anticuerpo. Además, de realizar este mismo tipo de ensayos, para los sueros control (Figura 3C y 3D) y sueros preinmunes (Figura 3E).

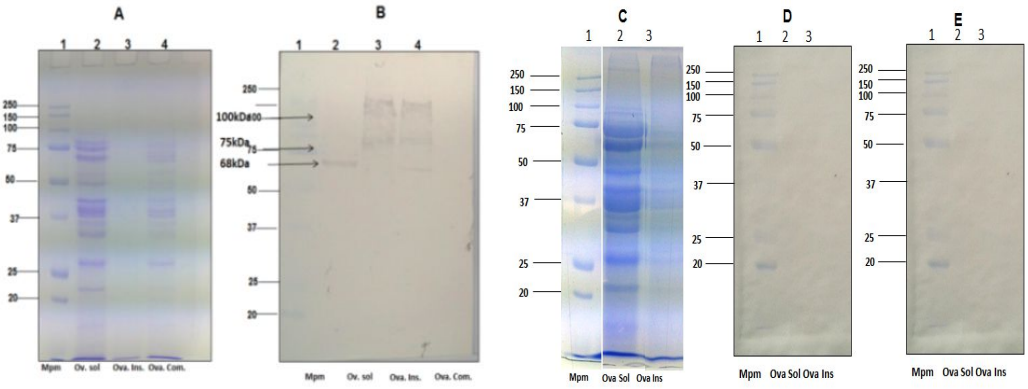


Figura 3A, B, C, D y E. 3A) Se muestra SDS-PAGE en el carril uno, marcador de peso molecular (mpm). En el carril dos, proteínas de Ova-Sol. En el carril tres, proteínas de Ova-Insol. En el carril cuatro proteínas de Ova-Completa. 3B) Se muestra Western-Blot, en el carril uno mpm, en el carril dos, proteína de Ova-Sol de peso molecular de 68 kDA. En el carril tres, proteínas de Ova-Insol de peso molecular de 75 kDa y 100 kDa. En el carril cuatro, proteínas de Ova-Completa de peso molecular de 75 kDa y 100 kDa. 3C) Se muestra SDS-PAGE, en el carril uno mpm. En el carril dos, proteínas de Ova-Sol. En el carril tres, proteínas de Ova-Insol. 3D) Se muestra Western-Blot en el carril uno mpm. En el carril dos, no hubo reconocimiento de proteína de Ova-Sol. En el carril tres no hubo reconocimiento de proteínas de Ova-Insol. 3E) Se muestra Western-Blot en el carril uno mpm. En el carril dos, no hubo reconocimiento de proteína de Ova-Sol. En el carril tres no hubo reconocimiento de proteínas de Ova-Insol.

SDS-PAGE y Western-Blot 2D. Se realizaron ensayos SDS-PAGE y Western-Blot 2D de las proteínas de Ova-Sol (Figura 4A, 4B y 4C). En los ensayos de Western Blot se utilizaron como primer anticuerpo los sueros de la sexta semana de las muestras 46 y 42. En la figuras 4A y 4B, se muestra la réplica del gel SDS-PAGE el cual fue electrotransferido y las proteínas que fueron reconocidas por los sueros de los

bovinos de la semana sexta 46 y 42 y como segundo anticuerpo IgG de bovino. Se ubicaron en la réplica del gel con ayuda del marcador de peso molecular comparando la membrana con la réplica y se cortaron del gel, para posteriormente ser enviadas a espectrometría de masas.

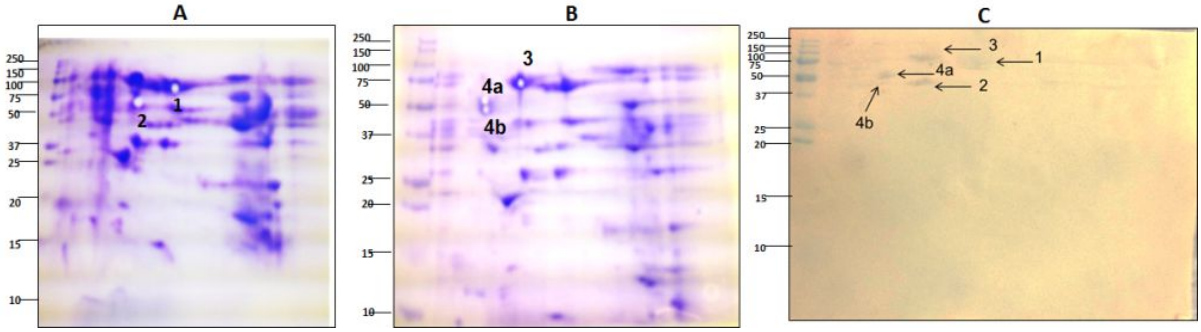


Figura 4A, B y C. 4A y B) Se muestra SDS-PAGE 2D con proteínas de Ova-Sol en las cuales se señalan las proteínas cortadas como 1, 2, 3, 4a y 4b. 4C) Se muestra Western-Blot de las proteínas de Ova-Sol.

LC/MS-MS. Las proteínas que se mandaron a analizar mediante técnica LC/MS-MS, se muestran en la tabla 2.

Amplificación del gen que codifica para la proteína vitelogenina 2. Se seleccionó la proteína 3-Ova-Sol para caracterizar su secuencia codificante y generar la proteína recombinante de interés. Para ello, se diseñaron los oligonucleótidos específicos del gen que codifica para la proteína (figura 5), se amplificaron los fragmentos y posteriormente se enviaron a análisis de secuenciación. En la figura 6 se muestran los geles de agarosa de los fragmentos del gen que codifica para la proteína vitelogenina 2, que por su tamaño se dividió en nueve fragmentos. Una vez determinada la secuencia codificante de la vitelogenina 2, se están buscando las regiones inmunodominantes para proceder a la síntesis y evaluación de la proteína recombinante de interés.

Tabla 2. Proteínas identificadas mediante LC/MS-MS

Nombre	Gi	Proteína identificada	Peso Molecular	IP	Secuencia
1-Ova-Sol	82878755	Vitelogenina	85	6.0	FVLSAGK
2-Ova-Sol	82878755	Vitelogenina	65	4.8	FVLSAGK
3-Ova-Sol	523713961	Precursor de viteloninga-2	75	5.5	YTGTLLGLCGD
4a-Ova-Sol	62199768	Yema de huevo de cathepsina	60	4.8	VYTIFK
4b-Ova-Sol	62199768	Yema de huevo de cathepsina	50	4.8	VYTIFK



Figura 5. Gen que codifica para la proteína vitelogenina 3 de la especie *R. microplus.*

Nombre	Secuencia	Nombre	Secuencia
Vg. Rm3-1F	TTTGGACGTGCCCTACTC	Vg.Rm3-4F	GACTGGGTCAAGGAGAAGTG
Vg. Rm3-1R	CGTAGGTCAGGTTGCTGTAG	Vg.Rm3-4R	GACAAACTCGACTCCGTAGG
Vg. Rm3-2F	AGAGCTACAGCAACCTGACC	Vg.Rm3-5F	GACAGTCCGTCAGACCTACC
Vg. Rm3-2R	CTCGTAGTCCTCGTCCTTGT	Vg.Rm3-5R	GTCACTCCGCTGTAGAGGTC
Vg. Rm3-2´F	TACGAGACCACTGTGTCCTG	Vg.Rm3-6F	AGCGAGTACGAGGACGATAG
Vg. Rm3-2´R	GGGTGTGGTAGGTGTAGGAG	Vg.Rm3-6R	TTGTTGTCACCACAGAGACC
Vg.Rm3-3F	CCTCCTACACCTACCACACC	Vg.Rm3-6´F	AGCGAAGATGCTACGACTCT
Vg.Rm3-3R	TGTACGTCATGGTCTTGGTC	Vg.Rm3-6´F	ACTCGAGTTCCTTCTTCTCG
Vg.Rm3-7F	GTCGCAGTACGAGTACGTCA		
Vg.Rm3-7R	GACGCTCTTGGTGATGGT		

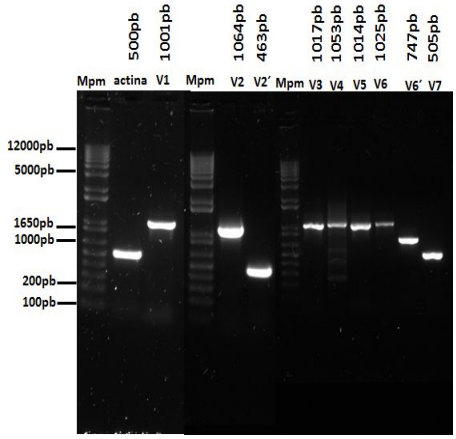


Figura 6. Gel de agarosa al 1%, en el Carril1, mpm. Ccarril 2, muestra de actina. Carril 3, Vitelogenina 1 (V1). Carril 4, mpm. Carril 5, V2, Carril 6, V2'. Carril 7, mpm. Carril 8, V3. Carril 9, V4. Carril 10, V5. Carril 11, V6. Carril 12, V6'. Carril 13, V7.

DISCUSIÓN

Se espera que la inmunización de terneros con la forma nativa o recombinante de las proteínas identificadas en este trabajo, pueda tener efectos negativos directos sobre la ovogénesis de la garrapata, lo que resultaría en la producción disminuida de huevos, y pueda interferir con la función de la vitelina en la desintoxicación del hemo en la garrapata, como fue observado por otros autores al utilizar proteínas de ovario como antígenos para prevenir infestaciones de garrapatas [1]. Por otro lado, estas proteínas pueden servir como base para desarrollar una vacuna contra la garrapata que presente un nivel de protección mayor en las regiones mexicanas ya que la vacuna comercial (Bm86) desarrollada en Australia y Cuba puede variar dramáticamente en diferentes áreas geográficas [1].

CONCLUSIONES

Se necesitan más investigaciones para determinar cuáles son las funciones de estas proteínas, y cómo su inhibición puede afectar la viabilidad y la capacidad reproductiva de las garrapatas. Se espera que la inmunización de bovinos con las proteínas recombinantes identificadas en este trabajo, pueda tener efectos directos sobre la ovogénesis de la garrapata.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue apoyado por el Fondo Institucional del CONACYT, Proyectos de Desarrollo Científico pata Atender Problemas Nacionales, 2013, PDCPN2013-01-216321 y por el Fondo del CONACYT-Programa de Estancias Sabáticas Nacionales, Estancias al Extranjero y Estancias Cortas para la Consolidación de Grupos de Investigación 2014-246310.

REFERENCIAS

[1] De La Fuente, J. and K. M. Kocan (2006). "Strategies for development of vaccines for control of ixodid tick species." Parasite Immunology **28**(7): 275-283.

[2] Esteves, E., A. C. Fogasa, et al. (2009). "Antimicrobial activity in the tick Rhipicephalus (Boophilus) microplus eggs: Cellular localization and temporal expression of microplusin during oogenesis and embryogenesis." Developmental & Comparative Immunology **33**(8): 913-919.

[3] Jonsson, N. N., A. L. Matschoss, et al. (2000). "Evaluation of TickGARDPLUS, a novel vaccine against Boophilus microplus, in lactating Holstein Friesian cows." Veterinary Parasitology **88**(3): 275-285.

[4] Klafke, G. M., G. A. Sabatini, et al. (2006). "Larval immersion tests with ivermectin in populations of the cattle tick Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari: Ixodidae) from State of Sao Paulo, Brazil." Veterinary Parasitology **142**(3): 386-390.

[5] Kongsuwan, K., P. Josh, et al. (2010). "Activation of several key components of the epidermal differentiation pathway in cattle following infestation with the cattle tick, Rhipicephalus (Boophilus) microplus." International Journal for Parasitology **40**(4): 499-507.

[6] Luís Fernando Parizi, Paula Cristiane Pohl, et al. (2009). "New approaches toward anti-*Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* tick vaccine." Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária **18**(1): 1-7.

[7] Rodríguez Valle, M. (2000). "Respuesta inmunológica contra garrapatas." Biotecnología Aplicada **17**(4): 215-220.

[8] Tirloni, L., Seixas A., et al. (2014) "A family of serine protease inhibitors (serpins) in the cattle tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*" Experimental Parasitology 137(4): 25–34**.**

[9] Willadsen, P., G. A. Riding, et al. (1989). "Immunologic control of a parasitic arthropod. Identification of a protective antigen from *Boophilus microplus*." The Journal of Immunology **143**(4): 1346-51.

ANALYSIS AND PROSPECTS FOR GENOME SEQUENCING *Paenibacillus larvae* LARVAE MEX14 ISOLATED FROM HONEY BEE IN MEXICO CITY

(Análisis y perspectivas de la secuenciación del genoma de *Paenibacillus larvae* MEX14 aislado de larvas de abeja de la miel en la ciudad de México)

Bernardo Sachman-Ruiz[a*+], Raquel Cossio-Bayugar[a], Estefhan Miranda-Miranda[a], Juan Diego Peréz de la Rosa[b], José Javier Pérez de la Rosa [b], Luis Lozano[c].

[a] Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, Colonia Progreso Jiutepec, Morelos, México.
[b] Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, Colonia Progreso Jiutepec, Morelos, México.
[c] Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: sachman.bernardo@inifap.gob.mx

Área del Conocimiento: Biología Molecular.

ABSTRACT.
Paenibacillus larvae are the cause American Foulbrood (ABF) and is present in practically all honey-producing countries. ABF is a facultative anaerobic endospore-forming bacterium that infects *Apis mellifera* larvae. Strain Mex14 was isolated using culture medium agar MYPGP from domestic bees larvae collected at a backyard in Mexico City. The genome was obtained with 454 GS FLX + (Roche) sequencing technology with an estimated size of 4.18 Mb and harbors 4806 coding genes (CDSs) assembled using Newbler version 2.8 and the annotation was made by RAST. Comparison of two *P. larvae* genomes provides evidence that ABF causative agent contains a large number of virulent genes and multimodular enzymes, in addition to variability in size and a high number of genes, which suggest that making such a genome comparison with the MEX14 strain will provide new insights in the biology of this economically important pathogen of bees.

Keywords: American foulbrood; genome; bees; colony collapse disorder

RESUMEN
Paenibacillus larvae es la causa de la enfermedad del loque americano y está presente en prácticamente todos los países productores de miel. Es una bacteria anaerobia facultativa que forma endosporas e infecta a *Apis mellifera* en el estadio larvario. La cepa denominada Mex14, se aisló en medio agar MYPGP de larvas de abejas productoras de miel provenientes de un traspatio en la Ciudad de México. El genoma obtenido se secuencio con la tecnología 454 GS FLX + (Roche), con un tamaño estimado de 4.81Mb y 4806 genes codificantes (CDSs), el ensamble se realizó con Newbler versión 2.8 y la anotación con RAST. El análisis genómico con los genomas disponibles evidencia que el loque contiene un gran número de genes de virulencia y enzimas multimodulares, una variación de tamaño de genoma y de

genes alto, lo que sugiere que la cepa Mex14 aportará nueva información en el estudio de la biología de este importante patógeno de las abejas productoras de miel.

Palabras Clave: loque, genoma, abejas, Síndrome del Colapso de las Colmenas.

INTRODUCCIÓN

Paenibacillus larvae es un Firmicute Gram+ que causa la enfermedad en abejas conocida como loque americana (ABF, American Foulbrood). Se ha detectado en prácticamente todos los países productores de miel, y México, el tercer mayor exportador y el quinto mayor productor de miel en el mundo, no es la excepción. ABF se ha reportado en México desde 1994 [1] y desde entonces sólo algunos pocos casos han sido reconocidos oficialmente, por parte del ministerio de la agricultura mexicana.

Mientras los científicos continúan buscando diferentes 'ómicas, hay una necesidad de genomas de alta calidad que serán utilizados como templete comparativo. La genómica comparativa tiene la capacidad de analizar múltiples genes y proteínas de interés en diversos temas importantes en la interacción patógeno-huésped.

Por otro lado, *P. larvae* ha sido estudiado desde principios de 1900, y un siglo más tarde, el mecanismo molecular de la infección sigue siendo difícil de dilucidar, por lo que la comparación de genomas más el estudio de transcriptomas y proteomas, utilizando como templete a varios genomas, podría ayudar al entendimiento de los mecanismos de infección de este importante patógeno [2].

METODOLOGÍA

La cepa *P. larvae* MEX14 se aisló de una colmena de abejas de producción casera de un traspatio al Sur de la Ciudad de México en el 2014. Se inoculo en el medio sólido MYPGP (medio agar Mueller-Hinton con extracto de levadura, fosfato de potasio, glucosa y piruvato) durante 24 horas a 30°C. Después de 3 pases, una UFC (Unidad Formadora de Colonia) se creció en 10ml de medio líquido MYPGP con las mismas condiciones de crecimiento en una mesa agitadora. Parte del cultivo se guardó a -70°C al 30% de glicerol estéril. La extracción del DNA se realizó con el kit High Pure PCR Templete Preparation de Roche siguiendo las indicaciones del fabricante. La concentración se midió por medio de fluorometría y se visualizó en un gel de agarosa al 1%. La secuenciación completa del genoma se obtuvo con la tecnología 454 GS FLX + (Roche). El ensamblado del genoma se realizó con el programa Newbler versión 2.8 y la anotación con RAST (rast.nmpdr.org) [3]

RESULTADOS

Se obtuvieron un total de 380, 502 lecturas y se ensamblaron en un total de 139 contigs para finalmente tener 4, 185, 110 pares de bases con una n50= 75413. Se anotaron 4806 genes codificantes a proteína (CDS), 52 rRNAs y 71 tRNAs, con un contenido de GC del 40%. El análisis comparativo de las secuencias codificantes arrojaron que la cepa MEX14 comparte un 99.8% de identidad con *P. larvae* subsp. *larvae* DSM 25430, siendo la cepa con la que comparte una mayor similaridad. La comparación genómica revela que *P. larvae* tiene un gran número de genes de virulencia, enzimas multimodulares y una variabilidad en el tamaño y número de genes entre diferentes cepas [4]. Por lo que la información que provee la secuencia genómica de *P. larvae* subsp. *larvae* MEX14 ayudará en el entendimiento de este patógeno de las abejas con un alto impacto económico. La secuencia completa del genoma se depositó

en el DDBJ/EMBL/GenBank con el número de acceso LAWY00000000, la versión descrita en este trabajo tiene el número LAWY01000000.

DISCUSIONES

La genómica comparativa puede encontrar posibles factores de virulencia y genes únicos que han sido seleccionados y son específicos a *P. larvae*. Las funciones putativas de estas proteínas se predicen mediante la búsqueda de coincidencias en contra de la base de datos de dominio conservadas (CDD).
Dentro de las regiones únicas encontradas en *P. larvae*, se incluyen varios marcos de lectura abiertos (ORFs) con fuerte homología a las sintetasas del antibiótico lipopeptídico plipastatina, el cual inhibe la fosfolipasa A2 y surfactina, que poseen actividad hemolítica. La región también contiene putativamente a sintetasas policetidas del Tipo I, cuyos productos son metabolitos secundarios, algunos de los cuales tienen efectos antibióticos, del inmunosupresor, o son tóxicos [1]. Otra región codifica para homólogos de un gen putativo hierro-sideróforo que es un Transportador ABC, que permite la absorción de hierro del medio, un proceso importante para muchas infecciones en bacterias [2].
Estos estudios son los que se estarán desarrollando gracias a la obtención del genoma completo de *P. larvae* subsp. *larvae* MEX14.
Por otro lado, en el genoma MEX14 se encontraron 3 fragmentos de un bacteriófago, relacionados con HB10c2 GenBank: KP202972.1.

CONCLUSIONES

La obtención del genoma completo de *P. larvae* subsp. *larvae* MEX14 será la base para desarrollar investigaciones de genómica comparativa y otros más de las ciencias de las ´ómicas.

REFERENCIAS

[1]. Djordjevic S, Ho-Shon M and Hornitzky M. 1994. DNA restriction endonuclease profile and ping of geographically diverse isolates of *Bacillus larvae*. Journal of Apicultural Research. Vol. 33 No. 2 pp 95-103.

[2]. Chan Queenie Wt, Cornman R Scott, Birol Inanc, Liao Nancy Y, Chan Simon K, Docking T Roderick, Jackman Shaun D, Taylor Greg, Jones Steven Jm, de Graaf Dirk C, Evans Jay D and Foster Leonard J. 2011. Updated genome assembly and annotation of Paenibacillus larvae, the agent of American foulbrood disease of honey bees. BMC Genomics, Vol. 12 p1-15

[3]. Overbeek R, Olson R, Pusch GD, Olsen GJ, Davis JJ, Disz T, Edwards RA, Gerdes S, Parrello B, Shukla M, Vonstein V, Wattam AR, Xia F, Stevens R. 2014. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). Nucleic Acids Res 42: 206–D214.

[4]. Djukic M, Brzuszkiewicz E, Fünfhaus A, Voss J, Gollnow K, et al. 2014. How to Kill the Honey Bee Larva: Genomic Potential and Virulence Mechanisms of Paenibacillus larvae. PLoS ONE 9(3): e90914.

MiRNA DETECTION AND LOCALIZATION IN CROP PLANTS

(Detección y localización de miRNAs en plantas de interés agronómico)

Flor de Fátima Rosas-Cárdenas[a,b*], Rocío Escobar-Guzmán [a], Andrés Cruz-Hernández[c] , Nayelli Marsch-Martínez[d], Stefan de Folter[a+]

[a] Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Guanajuato, México.
[b] Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada del Instituto Politécnico Nacional, Tlaxcala, México
[c] Facultad de Ingeniería, Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México.
[d] Departamento de Biotecnología y Bioquímica, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Guanajuato, México.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: sdfolter@langebio.cinvestav.mx

Área del Conocimiento: Biología Molecular

ABSTRACT
MiRNAs are a class of non-coding small RNAs (sRNAs) that are important regulators of gene expression at the post-transcriptional level by mRNA cleavage or translation inhibition. The use of sRNAs allows the development of biotechnological applications in plants. To develop these types of applications, and to better understand the natural roles they play, it is important to be able to detect and to localize these sRNAs at the plant tissue level. Sometimes, in crop plants this can be challenging. In this work we aimed to develop an easy protocol that would allow the in situ detection of miRNAs in relatively large plant tissues or organs. For this we used the combination of tissue printing and hybridization. Here we provide a simple, rapid, and useful protocol to detect miRNAs from different tissues and organs of plant species. Using this tissue printing hybridization protocol we were able to determine the spatial–temporal expression pattern of miR159 and miR164 in different tissues. Moreover, we showed the possibility to detect the expression of miRNAs in fruit juice using a dot blot hybridization approach. This allows for instance the semi-high throughput screening for the presence of a miRNA in fruits when no tissue localization is required.

Keywords: tissue-printing, miRNA detection, hybridization, fruits, miR164.

RESUMEN
Los miRNAs son una clase de RNAS pequeños no codificantes (sRNAs) que juegan un papel importante como reguladores de la expresión génica a nivel postranscripcional por la degradación o inhibición de la traducción de sus blancos. El uso de sRNAs permitirá el desarrollo de herramientas biotecnológicas para la aplicación en plantas. Para desarrollar este tipo de aplicaciones y comprender mejor su papel de forma natural, es importante detectarlos y localizarlos a nivel de tejido. Algunas veces en plantas de

interés agronómico estos pueden estar cambiando. El objetivo de este trabajo fue desarrollar un fácil y eficiente protocolo que permita la detección in situ de miRNAs en una gran variedad de tejidos de diferentes plantas. Por esto nosotros utilizamos la combinación de *tissue printing* e hibridaciones. En éste trabajo proporcionamos un simple, rápido y eficiente protocolo para detectar miRNAs de diferentes tejidos y órganos de plantas. Usando este protocolo de *tissue printing* e hibridación, pudimos detectar el patrón de expresión espacio-temporal de miR159 y miR164 en diferentes tejidos. Además, mostramos la capacidad de detectar la expresión de miRNAs en jugo de frutos usando *dot blot*. Esto permite un rápido escrutinio y detección de miRNAs en diversos tejidos cuando su localización no es requerida.

Palabras Clave: *Tissue printing*, detección de miRNAs, hibridaciones, frutos, miR164.

INTRODUCTION

MicroRNAs (miRNAs) are a class of small RNAs (sRNAs) that are fundamental regulatory elements of eukaryotic genomes [1] and their widespread conservation and divergence in the plant kingdom has been demonstrated [2]. Detection of the spatio-temporal expression of miRNAs is critical to understand their function [3]. Several techniques such as Northern-blot hybridization [4], microarray analysis [5], stem-loop RT-PCR analysis [6], or sRNA-seq analysis [2] permit the identification of miRNA expression patterns, which may suggest their involvement in certain biological processes. Besides these advantages, a drawback of these techniques is the lack of information about the actual localization of the miRNA in the tissue or organ itself, which is important for understanding the biological function of the miRNA.

A technique overcoming this drawback is in situ hybridization, which also allows the detection of miRNAs in thin tissue sections using a labeled complementary probe against the miRNA of interest [7]. Nevertheless, the generation of thin tissue sections from large tissues using paraffin-embedding or cryosections may be challenging. Tissue printing in nitrocellulose or nylon membranes is a technique employed to study the localization of proteins, nucleic acids, and soluble metabolites from freshly cut tissue slices. Tissue printing has been defined as 'the art and science of visualizing cellular material and information that are transferred to a receptive surface when the cut surfaces of section of tissues or organs are pressed against such a surface' [8]. Is a simple procedure by which the uppermost layer of cells and the surrounding extracellular matrix of the cut surface from plant tissue are transferred to a membrane after physical contact with the membrane surface generating a bidimensional anatomical image on which the molecule of interest can be visualized. This technique does not require RNA extraction or the preparation of thin tissue sections, and it allows the simultaneous analysis of many samples. Therefore, this technique is especially convenient for large tissues or organs, such as fleshy fruits that are often difficult to section for in situ hybridizations. To date almost no examples have been reported for the detection of miRNAs in plants using tissue printing (e.g., [9]). Here we report a protocol for tissue printing combined with hybridization in order to detect and to localize known miRNAs at the tissue level in different species. Although we focused mainly on fruits, this protocol may be used for other fleshy tissues as we demonstrate here by detecting miRNAs in floral buds. Moreover, we show also the possibility to detect the expression of miRNAs in fruit juice using a dot blot hybridization approach.

MATERIAL AND METHODS

The samples were washed and dried at room temperature. The samples were cut in longitudinal and/or transverse sections. After cutting the samples, they were immediately placed with the cut surface face down on the membrane (Amersham Hybond-N; GE Healthcare). The different sections were firmly pressed on the nylon membrane for 30 s, subsequently the tissue was carefully removed and the membrane was dried (around 5–20 min) at room temperature. The membranes were incubated in this fixation solution for 1 h at 65◦C, and then rinsed twice with water. The EDC fixation solution was prepared as describe Pall and Hamilton (2008) with some modifications. The membranes were dried at room temperature, and stored at −20◦C till further use. MiRNA detection was carried out as the hybridization analysis. To prepare the probes we used the following synthesized oligonucleotides, which sequences are complementary to each 21 nucleotide mature miRNA of interest. The hybridization was made as we described before in Rosas-Cárdenas et al. (2011, [10]) with some modifications. In summary, the used hybridization solution was the Rapid-hyb buffer (GE healthcare), which contains chemical blocking agents and therefore does not require heterologous DNA to control nonspecific binding of probes to the membrane. The membranes were pre-hybridized with 15 ml hybridization solution for 1 h at 42◦C with constant agitation, followed by adding the labeled probe of interest, and then incubated for 24 h at 42◦C with constant agitation. Membranes were washed with wash solution (2x SSC, 0.1% SDS), first for 4 min, and afterwards for 2 min at room temperature, followed by exposure to a storage phosphor screen for 24 h and/or 48 h at room temperature (highly expressed miRNAs can be detected already at 12 h). Finally, the storage phosphor screen was scanned in a Storm 860 Gel and Blot Imaging System (Amersham Biosciences). This protocol is not yet tested with the use of non-radioactive probes, but we expect it to work.

RESULTS

The tissue printing hybridization protocol previously described was designed to observe the spatio-temporal expression of miRNAs in different tissues. We first tried the protocol with a green tomato fruit (Figure 1a). A strong miR164 signal was observed in seeds, a signal in the exocarp and/or mesocarp, and a moderate signal in the endocarp. The U6 signal was also clearly observed in the seeds and a lower signal in the pericarp tissues. MiR164 expression was detected in strawberry, guava, and again tomato in two different developmental stages (Figure 1b). Again, the strongest hybridization signal can be observed in seeds and a lower expression in pericarp tissues. Notably, a clear signal can be seen from the printed seeds that are on the outside in the case of strawberry. Furthermore, we also tried floral buds to see if we could detect signal for miR164 and for miR159.

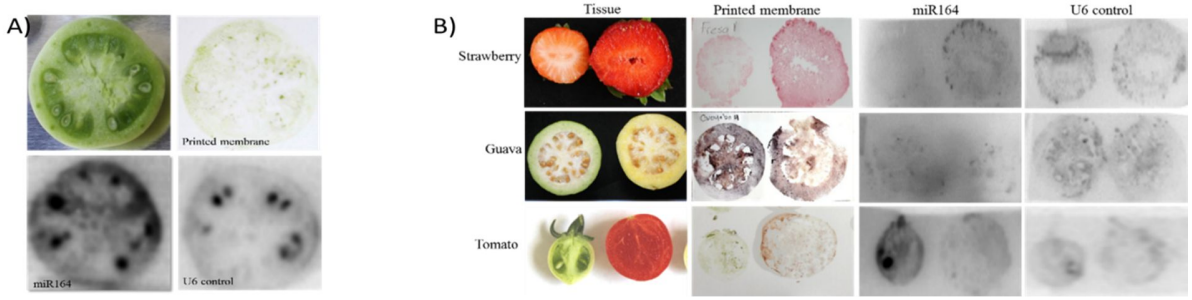


Figure 1. MiR164 detection by tissue printing hybridization in fruits. A) MiR164 detection on the membrane made from a transverse cut tomato fruit; B) miR164 detection by northern blot hybridization of strawberry, guava, and tomato fruits. Fruits were cut in half and then printed on the membrane. The

membranes were fixed and then hybridized with 32P-labelled oligonucleotide probe complementary to miR164 or to the nucleolar U6 (positive control)

Expression of miR164 and miR159 was analyzed in the apical, medial, and basal region of agave floral buds by tissue printing hybridization. Two different stages of agave floral buds were analyzed. MiR159 and miR164 were detected in two developmental stages of floral buds from agave (Figure 2). We observed signal for both miRNAs, miR164 more in placenta/transmitting tract tissue and miR159 more in ovules.

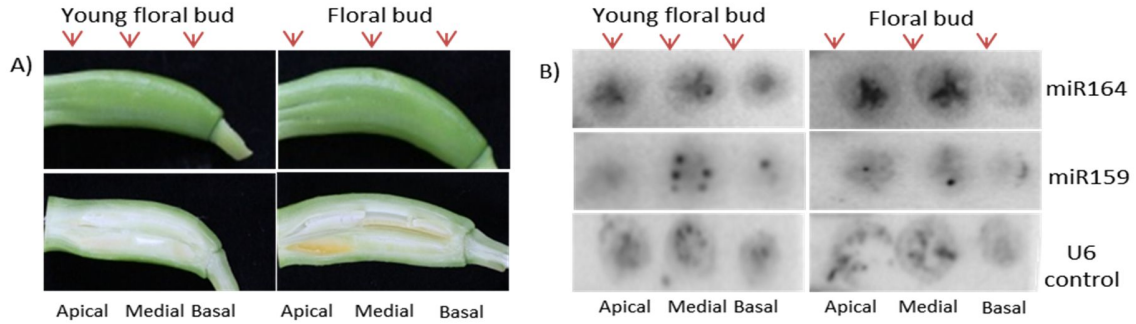


Figure 2. Spatio-temporal expression of miRNA164 and miR159 by tissue printing hybridization in floral buds of agave. A) Transverse sections of the agave floral buds were used to make the tissue prints; arrows indicate the apical, medial, and basal region were the cuts were made. Below each floral bud a longitudinal section is shown to indicate the developmental stage. B) Detection of miR164, miR159, and nucleolar U6 (positive control) in agave floral buds by northern blot hybridization.

Moreover we could detect these miRNAs in juice of lemon, mandarin, prickly pear cactus fruit, and tomato fruit (Figure 3A). Furthermore, we tried fruit juice of three different developmental stages of tomato fruits and hybridized it with the probe against miR159 (Figure 3B).

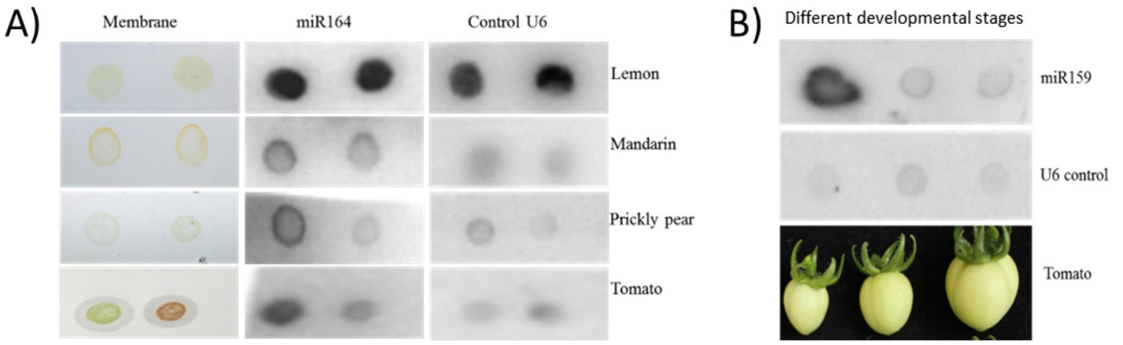


Figure 3. MiR164 and miR159 detection in fruit juices of different plant species by dot blot hybridization. Five microliter of fruit juice were spotted on membranes and the miRNAs were detected by hybridization assays. A) Expression of miR164 in lemon and mandarin juice, and in crude extract of green and ripe stages of prickly pear cactus and tomato fruits. B) Expression of miR159 in different developmental stages of tomato crude extracts. The tomato fruit stages used for the crude extracts are shown below the membrane.

DISCUSSION

We developed an easy protocol based in tissue printing and northern blot hybridization, which allowed the *in situ* detection of miRNAs in relatively large plant tissues or organs. The observed hybridization patterns in the different experiments for miR159, miR164, and nucleolar U6 are differential, indicating that the observed signals are not background. We corroborate that miR164 is a conserved miRNA expressed in different fruits. Furthermore, we observed differential expression of miR159 and miR164 in floral buds of agave and tomato suggesting these miRNAs play an important roles during plant development. Sometimes it might not be important to know exactly where in the tissue the miRNA is expressed, but for instance just presence or absence, which could be useful to analyze genetically modified crops. We reasoned that it should be possible to detect miRNA expression in fruit juice (or crude extract). In summary, this is an alternative way to quickly detect the expression of a miRNA. Also for miR159 a clear signal was observed in tomato, which was the highest in the youngest fruit stage, suggesting that miR159 is more expressed at that stage.

CONCLUSION

Here we provide a simple, rapid, and useful protocol to detect miRNAs from different tissues and organs of plant species. Using this tissue printing hybridization protocol we were able to determine the spatial–temporal expression pattern of miR159 and miR164 in different tissues. Moreover, we showed the possibility to detect the expression of miRNAs in fruit juice using a dot blot hybridization approach. This allows for instance the semi-high throughput screening for the presence of a miRNA in fruits when no tissue localization is required.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the National Mexican Science Council (CONACyT) for a PhD fellowship to FFRC (199450). This work in the de Folter laboratory was financed by the CONACyT grant 177739. We also thanks to CONACyT for grant 221522 and SIP for grant 20150449 that allow continue with this studies.

REFERENCES

[1] Voinnet, O. (2009). Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. Cell, 136(4), 669–87. doi:10.1016/j.cell.2009.01.046

[2] Chavez-Montes, R. A., Rosas-Cárdenas, F. de F., De Paoli, E., Accerbi, M., Meyers, B. C., Rymarquis, L. A., Mahalingam, G., et al. (2014). Sample sequencing of vascular plants demonstrates widespread conservation and divergence of microRNAs, Nature communications, 1–15

[3] van Rooij, E. (2011). The art of microRNA research. Circulation research, 108(2), 219–34.

[4] Pall, G. S., & Hamilton, A. J. (2008). Improved northern blot method for enhanced detection of small RNA. Nature protocols, 3(6), 1077–84.

[5] Yin, J. Q., Zhao, R. C., & Morris, K. V. (2008). Profiling microRNA expression with microarrays. Trends in biotechnology, 26(2), 70–6.

[6] Chen, C., Ridzon, D. a, Broomer, A. J., Zhou, Z., Lee, D. H., Nguyen, J. T., Barbisin, M., et al. (2005). Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. Nucleic acids research, 33(20), e179.

[7] Kidner, C., & Timmermans, M. (2006). In situ hybridization as a tool to study the role of microRNAs in plant development. Methods in molecular biology, 342(7), 159–79.

[8] Varner, J. E., & Ye, Z. (1994). Tissue printing. Journal of the federation of American Societies of experimental Biology, 8, 378 –384.

[9] Rosas-Cárdenas, F. D. F., Caballero-Pérez, J., Ramos, X. G., Cruz-Hernández, A., Marsch-Martínez, N., & de Folter, S. (2014). MiRNA expression during prickly pear cactus fruit development. Planta.

[10] Rosas-Cárdenas, F. D. F., Durán-Figueroa, N., Vielle-Calzada, J.-P., Cruz-Hernández, A., Marsch-Martínez, N., & de Folter, S. (2011). A simple and efficient method for isolating small RNAs from different plant species. Plant methods, 7(1), 4.

CLONING AND OVEREXPRESSION OF LOW ABUNDANCE MiRNAS IN *Arabidopsis*

(Clonación y sobreexpresión de miRNAs de baja abundancia en *Arabidopsis*)

Eduardo Catarino Téllez Valerio[a], Marco Antonio Sánchez Olaya[a], Eduardo Vázquez Portillo[a], Saraí López Maldonado[a], Silvia Luna Suárez[a], Flor de Fátima Rosas Cárdenas[a]*+

[a] Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Tlaxcala.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: frosasc@ipn.mx

Área del Conocimiento: Biología Molecular.

ABSTRACT
MiRNAs are small non-coding RNA sequences that play an essential role in several developmental processes of plants. Overexpression of miRNAs have allowed to know their function in plants; for example, miR156 overexpression in tomato, Arabidopsis, rice and maize, shown similar phenotypes such as dwarfism, a bushy structure, more abundant leaves and late flowering. Furthermore in switchgrass overexpression of this miRNA resulted in several morphological alterations and led to improvements in biomass production. These studies demonstrate that conservation and abundance of miRNAs play a key role in biological processes that take place in species where there may be general and species-specific functions. Conservation and divergence of miRNAs showed there are low abundance miRNAs in monocots such as rice, corn and wheat. We hypothesize that low abundance miRNAs have an important role in plant development. For this reason we propose overexpress two low abundance miRNAs (miR414 and miR444) in *Arabidopsis thaliana.* DNA fragments were inserted into vector pENTR™D-TOPO and then sub-cloned into the plant binary vector pB7WG2D of constitutive expression based on the GATEWAY™ system. The plants were transformed using the floral-dip protocol. The selection of resistant plants was made with herbicide BASTA. Constructions to overexpress miR414 and miR444 were validated, completed the *Arabidopsis thaliana* transformation and started the selection of transgenic lines.

Keywords: miRNAs, cloning and overexpression; low abundance miRNAs; Arabidopsis.

RESUMEN
Los miRNAs son RNAs pequeños no codificantes que tienen un papel clave en diversos procesos del desarrollo de plantas. La sobreexpresión de miRNAs ha permitido conocer su función en plantas; por ejemplo la sobreexpresión de miR156 en tomate, arabidopsis, arroz y maíz, muestra fenotipos similares como enanismo, estructuras arbustivas, hojas más abundantes y floración tardía. Además la sobreexpresión de este miRNA en el pasto varilla resulta en varias alteraciones morfológicas conduciendo a mejorar la producción de biomasa. Estos estudios demuestran que la conservación y abundancia de miRNAs juega un papel clave en los procesos biológicos que toman lugar en especies donde pueden tener funciones generales o específicas. La conservación y divergencia de miRNAs muestras que hay miRNAs de baja abundancia en monocotiledóneas como arroz, maíz y trigo. Nosotros hipotetizamos que los miRNAs de baja abundancia tienen un papel importante en el desarrollo de las

plantas. Por esta razón nosotros proponemos sobreexpresar dos miRNAs de baja abundancia (miR414 y miR444) en *Arabidopsis thaliana.* Fragmentos de DNA fueron insertados en el vector pENTR™D-TOPO y subclonados en el vector binario de plantas and pB7WG2D de expresión constitutiva basado en el sistema GATEWAY™. Las plantas fueron transformadas usando el protocolo floral dip. La selección de plantas resistentes se realizó con BASTA. Las construcciones para sobreexpresar miR414 y miR444 fueron validadas, la transformación de *Arabidopsis thaliana* fue completada y se ha iniciado la selección de líneas transgénicas.

Palabras Clave: miRNAs, clonación y sobreexpresión; miRNA de baja abundancia; Arabidopsis.

INTRODUCCIÓN

Los miRNAs son moléculas de RNA de 20-24 nucleótidos que juegan un papel esencial en la regulación de genes a nivel postranscripcional. Actualmente se ha realizado la identificación de miRNAs en varias especies de plantas distribuidas en todo el reino vegetal mostrando una descripción completa de las secuencias de miRNAs y su abundancia [1]. Trabajos de sobreexpresión de miRNAs han permitido conocer su función en plantas; por ejemplo, la sobreexpresión de miR156 en tomate [2], arabidopsis [3] arroz [4] y maíz [5]; ha mostrado fenotipos similares. Así mismo en el pasto varilla (*Panicum virgatum* L.) la sobreexpresión de este miRNA condujo al mejoramiento en la producción de biomasa [6]. Estos trabajos muestran que la conservación y la abundancia de los miRNAs juegan un papel clave en los procesos biológicos que se llevan a cabo en las especies, donde pueden existir funciones generales y especie-específicas. Un estudio de conservación y divergencia de miRNAs, mostró que existen miRNAs de baja abundancia específicos de monocotiledóneas como arroz, maíz y trigo [1]. Nosotros hipotetizamos que los miRNAs de baja abundancia tienen una función clave en el desarrollo de las plantas, por lo que en este trabajo nos proponemos realizar las construcciones para sobreexpresar dos miRNAs de baja abundancia (miR414 y miR444) en *Arabidopsis thaliana* con la finalidad de conocer su función y/o procesos en los que están involucrados.

METODOLOGÍA

Se realizó la búsqueda de miRNAs de baja abundancia candidatos para su sobreexpresión en plantas y se procedió a la búsqueda de sus precursores. Fragmentos de 761 y 499 pb que incluían los precursores de miR414 y miR444 respectivamente fueron clonados en el vector de entrada pENTR™/D-TOPO de acuerdo a las instrucciones del manual del kit pENTR™ Directional TOPO® Cloning (Invitrogen) en células quimiocompetentes de *E. coli* de la cepa DH5α. La inserción del fragmento fue corroborada por PCR, digestión enzimática y secuenciación. Se realizó la reacción de recombinación con el vector destino pB7WG2D [7] basado en el sistema GATEWAY™ (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se transformaron células quimiocompetentes de *E.coli* DH5α con la construcción y se verificó la transformación por PCR y digestión. Enseguida se realizó la transferencia de vector de sobreexpresión que contenía los precursores de miRNAs de interés a *Agrobacterium tumefaciens* y se corroboró la transformación por PCR y digestión enzimática. Posteriormente plantas de *Arabidopsis thaliana* Col-0 fueron transformadas por el método de “floral dip” [8], con la construcción de sobreexpresión que contenía el fragmento deseado para cada miRNA seleccionado. Después de la transformación de las plantas con *Agrabacterium*, las plantas terminaron su ciclo y se colectaron las semillas. Las semillas obtenidas de la

transformación con *Agrobacterium tumefaciencs* se germinaron y 2 semanas después de la germinación, se realizó la aspersión con una solución de 300 µM del herbicida BASTA (Glufosinato de Amonio) cada tercer día por dos semanas para la selección de las líneas resistentes.

RESULTADOS

En la búsqueda de miRNAs de baja abundancia se encontró un grupo de miRNAs candidatos para análisis de los cuales los miRNAs miR414 y miR444 fueron seleccionados para su sobreexpresión en plantas, seleccionados los miRNAs se procedió a la búsqueda de los genes de los que se hizo su modelamiento con el programa RNAfold que mostró su estructura tallo-asa (Figura1), dichas secuencias fueron utilizadas como base para el diseño de oligos y/o síntesis de secuencia.



Figura 1. Estructura secundaria de los fragmentos de los genes MIR414 y MIR444. Se realizó la predicción de la estructura secundaria de los fragmentos seleccionados utilizando el RNAfold webserver.

El fragmento completo del gen MIR414 se amplificó mediante PCR de *Arabidopsis thaliana*. Para el miRNA miR444 se solicitó la síntesis del gblock correspondiente a un fragmento de 500 pb del gen MIR444 (Figura 2).

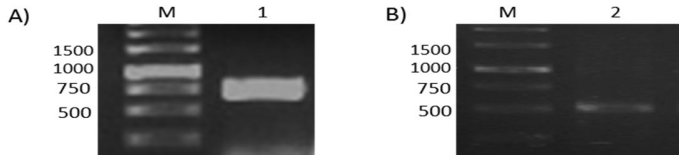


Figura 2. Fragmentos de miR414 and miR444 usados para la clonación. A) Fragmento de 761 nt que contenía el precursor de miR414 fue amplificado por PCR, B) Fragmento de 500pb fue utilizado para generar el gblock para miR444 sintetizado por IDT. El PM de los diferentes fragmentos fue verificado en geles de agarosa al 1%.

Se logró la clonación tanto en el vector de entrada como en el vector destino (Figura 3), lo que se corroboró por PCR y digestión enzimática (Figura 3). Además se logró la transformación de *Agrobacterium* con las construcciones de interés (Figura 3). El vector pB7WG2D contiene doble promotor 35S, lo que permitirá la expresión constitutiva de los miRNAs, generando con ello la sobreexpresión de los miRNAs en la planta.

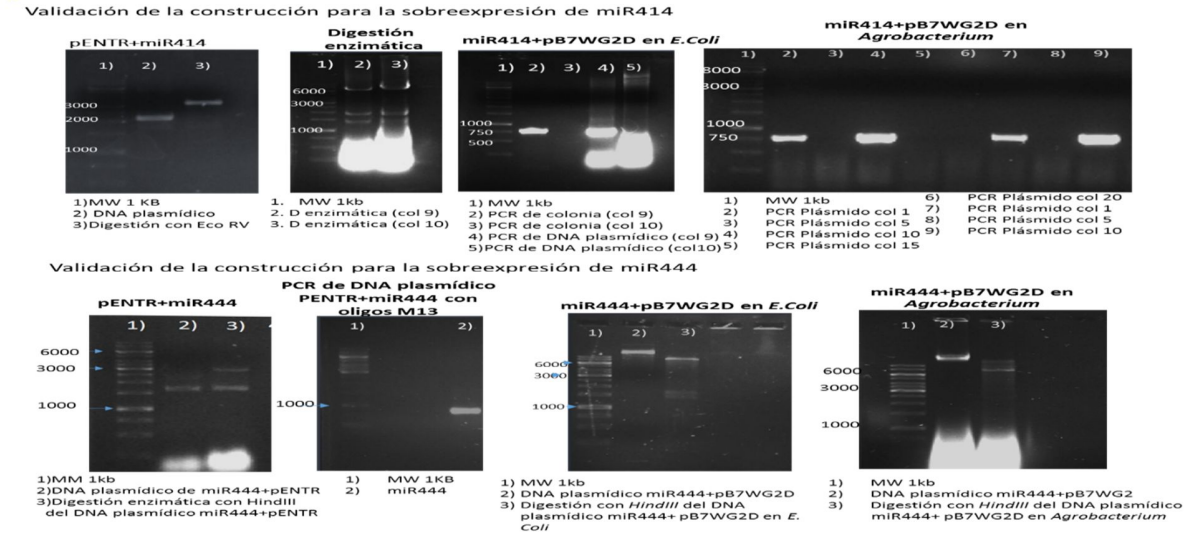


Figura 3. Validación de las construcciones para la sobreexpresión de miRNAs en plantas.

Al menos 12 plantas de Arabidopsis fueron utilizadas para la transformación con cada una de las construcciones, se dejaron crecer hasta obtener la inflorescencia principal la cual se cortó para generar más ramificaciones una vez crecidas las inflorescencias se eliminaron las flores y los botones fueron transformados con el método de floral dip, se dejaron crecer hasta terminar su ciclo de vida (Figura 4).

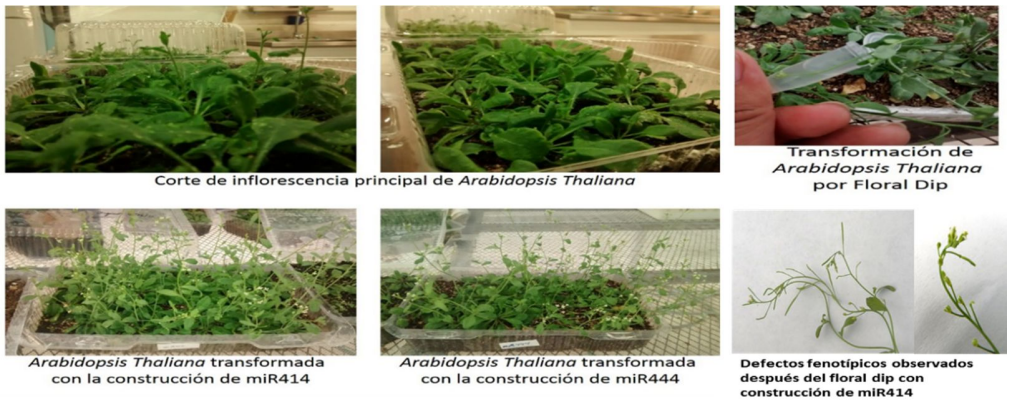


Figura 4. Crecimiento y transformación de *Arabidopsis thaliana* con las construcciones para sobreexpresión de miR414 y miR444.

Se colectó la semilla y se procedió a la germinación e iniciar el proceso de selección; sin embargo, se tuvieron problemas para su crecimiento, por lo que actualmente se ha logrado germinar nuevamente y estamos en el proceso de selección con BASTA.

DISCUSIÓN

Los miRNAs se seleccionaron por su baja abundancia y perfil de expresión en diversas librerías, miR444 específico de monocotiledóneas y miR414 de baja abundancia en Arabidopsis y otras dicotiledóneas, lo que podría estar asociado a las características particulares de estas plantas. Un fragmento del precursor de miR414 se logró amplificar de forma satisfactoria por PCR. La clonación tanto de fragmentos generados por PCR como por g-block fue satisfactoria, por lo que dependerá de las necesidades y del material (tejido para la amplificación) para optar por una opción u otra. Dadas las características del vector destino pB7WG2D el cual posee doble promotor 35S las construcciones realizadas permitirán la sobreexpresión de los miRNAs en toda la planta. Al hacer la transformación de Arabidopsis con las construcciones que contienen la construcción para miR414 observamos que había un defecto en las plantas posterior al floral dip por lo que se volvió a repetir la transformación encontrando el mismo defecto en botones (Figura 4), por lo que será necesario corroborar si el consecuencia del miR414 dado que en las plantas con la construcción para el miR444 este fenotipo no fue observado, o bien si es una consecuencia de estrés por manipulación de las plantas. Se ha logrado la transformación de arabidopsis por floral dip con cada uno de los miRNAs y estamos en proceso de selección de las líneas transgénicas para continuar con la caracterización de las mismas.

CONCLUSIONES

Se identificaron a miR414 y miR444 como miRNAs de baja abundancia candidatos para análisis funcionales. Las construcciones para la sobreexpresión de miRNAs pueden hacerse a partir de fragmentos amplificados por PCR o sintetizados por g-block. Las construcciones realizadas permitirán la expresión constitutiva de los miRNAs en toda la planta

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de licenciatura de ECTR (221522-1115) y MASO (221522-1114); la beca de maestría de SLME (577210) y REVP (577209). Este trabajo fue financiado por el proyecto SIP 20150449 y el proyecto Conacyt 221522.

REFERENCIAS

[1] Chavez Montes, R. A., Rosas-Cárdenas, F. F., De Paoli, E., Accerbi, M., Meyers, B. C., Rymarquis, L. A., et al. (2014). Sample sequencing of vascular plants demonstrates widespread conservation and divergence of microRNAs. Nat. Commun. 5, 3722.

[2] Zhang X, Zou Z, Zhang J, Zhang Y, Han Q, et al. 2011.Over-expression of sly-miR156a in tomato results in multiple vegetative and reproductive trait alterations and partial phenocopy of the sft mutant. FEBS letters. 585(2):435–39

[3] Wu G, Poethig RS. 2006. Temporal regulation of shoot development in Arabidopsis thaliana by miR156 and its target SPL3. Development. 133(18):3539–47

[4] Xie K, Wu C, Xiong L. 2006. Genomic organization, differential expression, and interaction of SQUAMOSA PROMOTER-BINDING-like transcription factors and microRNA156 in rice. Plant Physiology. 142(1):280–93

[5] Chuck G, Meeley R, Irish E, Sakai H, Hake S. 2007. The maize tasselseed4 microRNA controls sex determination and meristem cell fate by targeting Tasselseed6/ indeterminate spikelet1. Nature Genetics. 39 (12):1517-21

[6] Fu C, Sunkar R, Zhou C, Shen H, Zhang J-Y, et al. 2012. Overexpression of miR156 in switchgrass (Panicum virgatum l.) results in various morphological alterations and leads to improved biomass production. Plant Biotechnology Journal. 10(4):443–52

[7] Karimi M, Inzé D, Depicker A. 2002. GatewayTM vectors for agrobacterium-mediated plant transformation. Trends in Plant Science. 7(5):193–95.

[8] Clough SJ, Bent AF (1998). Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediate transformation of Arabidopsis thaliana. Plant J 16: 735-743

MOLECULAR IDENTIFICATION OF CYTOKINE PROFILE, IN BOVINE COLOSTRUM FROM: REACTORS AND NON-REACTORS, IN CATTLE NATURALLY EXPOSED TO *Mycobacterium bovis*

(Identificación molecular del perfil de citocinas en calostro de bovinos reactores y no reactores, naturalmente expuestos a *Mycobacterium bovis*)

Rosa Elena Ponce Ramos[a]*, Luis Gonzalo Higareda de Sales[b], Sara Elisa Herrera Rodríguez[a+]

[a] Unidad de Biotecnología Médica y Farmacéutica, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. (CIATEJ), * Pasante en Biología. ** Investigador Titular A
[b] Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, Maestría en Salud y Producción Animal Sustentable. Estudiante de Maestría

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: sherrera@ciatej.mx

Área del conocimiento: Biología molecular.

ABSTRACT
In ruminants, the epitheliochorial placenta not allow the immune passive transfer, (transplacentary) from maternally to the fetus during gestation. Therefore, in bovines, the transference of the Passive immunity (PI) has to be carried through colostrum. Colostrum is required since the newborn calves depends.completely on it for its survival, due, its contains of immune molecules, mainly immunoglobulins, proteins such as lactoferrin, vitamins, leukocytes, and cytokines. Colostrum is the first secretion produced by the mammary gland after birth, besides that it confers nutrients and immune molecules, at the same time, it can be a transmission pathway of some bacteria that cause diseases, like *Mycobacterium bovis*; responsible of bovine tuberculosis (bTB). At date, some cytokines had been identified at protein level in colostrum; however, the profile of these cytokines in animals naturally exposed to bTB has not been studied yet. The aim of the present study was to determine the level of cytokines: IL-1α, IL-2, IL- 4, IL-6, IL-10, TNF-α, IFN-γ, in cattle, from samples of reactors (n=4) and non-reactors (n=4) to tuberculin skin test (TST). Total RNAs were isolated from colostrum mononuclear cells (CMC), from reactors and non-reactors, then, cDNAs were generated. The cDNAs were used as template to perform semi quantitative PCR to assess the cytokines level, using the actin gene for normalize. Results shown, that, not all the cytokines in CMC were expressed, only IL-1-α, IL-6, IL- 10, TNF-α and IFN-γ. In the reactors IL-1-α, IL-6, IL- 10, TNF-α and IFN-γ were expressed, whereas, in the non-reactors IL-1α, IL-10, TNF-α and INF-γ were expressed. In reactors, IL-1α and IL-10 were higher expressed than non-reactors, while, the IFN-γ expression were higher in non-reactors. The lL-6 cytokine was expressed only in the reactor group. In conclusion, there is a distinct cytokine profile in reactor and non-reactor cattle, naturally exposed to bTB.

Keywords: bovine tuberculosis, colostrum, cytokines.

RESUMEN

En rumiantes, la placenta epiteliocorial no permite la transferencia de inmunidad pasiva (a través de la placenta) de la vaca al becerro, durante la gestación. Por lo cual, la transferencia de inmunidad pasiva, se da a través del calostro. El calostro es la primera secreción producida por la glándula mamaria después del nacimiento, los becerros recién nacidos dependen completamente de él para su supervivencia, por su contenido de moléculas inmunes, principalmente inmunoglobulinas, proteínas como lactoferrina, vitaminas, leucocitos y citocinas; además de que confiere nutrientes y moléculas inmunes, también, puede ser una vía de transmisión de algunas bacterias que causan enfermedades, como *Mycobacterium bovis*, responsable de la tuberculosis bovina (TBb). A la fecha, se han identificado en calostro algunas citocinas, sin embargo, el perfil de estas citocinas en calostro de animales naturalmente expuestos a TBb no se ha estudiado todavía. El objetivo del presente trabajo, fue determinar el nivel de las citocinas: IL-1α, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF-α, IFN-γ, usando muestras de bovinos reactores (n =4) y no-reactores (n = 4) a la prueba de la tuberculina. Se aisló RNA total a partir de células mononucleares de calostro (CMC), tanto de bovinos reactores como no-reactores a la prueba de la tuberculina. Se generaron los cDNAs y fueron utilizados como molde para realizar PCR semi-cuantitativa, con el propósito de evaluar el nivel de expresión (mRNA) de citocinas, el gen de actina se uso para normalizar. Los resultados mostraron que no todas las citocinas se expresan; en los bovinos reactores se expresaron; IL-1-α, IL-6, IL-10, TNF-α e IFN- γ, mientras, en los no-reactores las citocinas; IL-1α, IL-10, TNF-α e INF-γ. La expresión de IL-1α e IL-10 fue más alta en reactores, que en no-reactores, mientras, la expresión de IFN-γ fue mayor en no-reactores. La citocina IL-6 se expresó sólo en el grupo reactor. En conclusión, hay un perfil de citocinas diferente en bovinos reactores y no-reactores, naturalmente expuestos a TBb.

Palabras Clave: Tuberculosis bovina, Calostro, Citocinas.

INTRODUCCIÓN

El calostro es la primera secreción producida por la glándula mamaria después del parto, es especialmente rico en Inmunoglobulinas (Ig's), las que proveen al becerro de protección inmunológica durante sus primeras semanas de vida [1], debido a que la placenta de los bovinos no permite el paso de Ig´s de la vaca al becerro por vía placentaria, éstos, nacen con baja capacidad de protección contra las enfermedades. Por lo cual, dependen de la transferencia pasiva maternal a través del calostro. Así la adquisición de Ig's a través de la absorción intestinal los protege de las enfermedades, hasta que su sistema inmune sea completamente funcional [2]. El intestino delgado de los becerros recién nacidos posee la capacidad de absorber moléculas grandes intactas, como las Ig's y otras proteínas durante las primeras 24 horas de vida, después de ese tiempo sucede el cierre intestinal [3]. Por lo tanto, el consumo adecuado de calostro de buena calidad es un factor importante y determinante en la salud y sobrevivencia de los becerros.

El calostro, además, contiene más de un millón de células del sistema inmune maternas viables por mililitro incluyendo: linfocitos T y B, macrófagos, neutrófilos, factores de crecimiento y hormonas como la insulina y el cortisol [4]. Estos factores de crecimiento y hormonas juegan un papel importante en la estimulación del desarrollo del tracto gastrointestinal y otros sistemas en el becerro recién nacido [5].

Sin embargo, además del papel protector del calostro, también se pueden encontrar presentes en él agentes patógenos, provenientes de la glándula mamaria o de la contaminación en el manejo del

calostro y pueden ser transmitidos, como *Mycobacterium bovis*, agente causal de la Tuberculosis bovina (TBb), enfermedad que se caracteriza por la formación de granulomas, cuyos efectos patológicos se reflejan principalmente en el tracto respiratorio alto. El establecimiento de una respuesta inmune tipo Th1 caracterizada por la producción de la citocina interferon gama (INF-γ) es importante para la erradicación de la micobacteria por los macrófagos alveolares, por la activación de sus mecanismos microbicidas y la vía de producción de óxido nítrico (ON), sustancia toxica para la bacteria [6]. La TBb además de ser un problema de salud, es responsable de pérdidas económicas, debido al impacto sobre la eficiencia productiva en leche y reproductiva sobre el ganado. Además, representa un riesgo para la salud humana, debido a que es una zoonosis y puede ser transmitida del ganado al humano, a través productos lácteos no pasteurizados [7].

En México, se utiliza la prueba de la tuberculina (PPD) como método de diagnóstico de TBb de acuerdo a la NOM-031-ZOO-1995, la cual sugiere que deben sacrificarse los animales reactores a la prueba, desafortunadamente, se estima que hasta el 19% de los animales no reacciona a la prueba lo cual puede representar un riesgo de infección para los animales sanos [8].

En Jalisco la prevalencia promedio de TBb es de 7.19% [9], la cual se encuentra representada principalmente en 19 municipios, principalmente en las regiones de la Ciénega, Altos Norte y Altos Sur, en las regiones lecheras del Estado. La principal vía de infección de tuberculosis bovina es por vía aerógena (80-90%), donde el ganado es infectado por inhalación de partículas de Fluger cargadas de bacilos [10]. La importancia de la vía aérea en la transmisión se explica por la baja dosis infectiva que requiere *M. bovis* en el tejido pulmonar, con la posibilidad incluso de que una sola bacteria establezca una infección efectiva en el bovino a través de esta ruta [11,12]). Cabe mencionar que, la infección por vía entérica (digestiva) es la segunda más importante, donde el contagio puede suceder en becerros amamantados con calostro y leche que contiene bacilos tuberculosos [13]. Sin embargo, es a través de la vía digestiva que también se transfiere la inmunidad pasiva, mediante el consumo del calostro vaca-becerro recién nacido, como se mencionó anteriormente.

En estudios previos se ha demostrado la presencia de citocinas como IL-6, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), e interferón gama (INF- γ) en bovinos sanos [14]. Por lo que, el calostro no sólo actúa como una excelente fuente de nutrición, sino también como una fuente de moléculas como las citocinas que pueden ser responsables de un efecto inmunomodulador en el recién nacido [15]. En el presente estudio se analizó la expresión (RNAm) de las citocinas IL-1α, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF-α, INF-γ en células mononucleares de calostro (CMC) aisladas de bovinos reactores y no-reactores a la prueba de la tuberculina (PPD), para analizar el perfil de citocinas y saber si aquellos animales reactores y no reactores, transfieren las mismos niveles de citocinas en los dos grupos de estudio.

METODOLOGÍA

Las muestras de calostro bovino se obtuvieron de ranchos lecheros del Estado de Jalisco con alta prevalencia a Tuberculosis mayor al 10 %, del día 0 pos-parto, las muestras se transportaron al laboratorio a una temperatura de 4°C. El calostro se diluyo (1:1) un volumen de calostro más un volumen de PBS, los tubos se centrifugaron a 2500 rpm durante 20 minutos, luego de la centrifugación se retiró el sobrenadante y la pastilla de células totales fue lavada con PBS 3 veces, la pastilla de células totales fue resuspendida en medio RPMI el cual fue colocado encima de una fase de Ficoll. La separación

de CMC se realizó a través de gradiente de densidad por centrifugación, se recuperaron las células mononucleares de la interface y fueron lavadas 3 veces con PBS, se realizó la cuantificación celular usando azul tripano, las CMC recuperadas fueron resuspendidas en 500 µl de Trizol y guardadas a -20 °C. El RNA total de las CMC fue aislado siguiendo el protocolo del kit de Trizol (Invitrogen 15596026), posteriormente se realizó la cuantificación de RNA total y la retrotranscripción. La retrotranscripción se realizó a partir de 2 µg de RNA total de cada muestra, utilizando el kit Thermo Scientific, RevertAid H Minus First Strand cDNA Syntesis (K1632). La amplificación a través de PCR semicuantitativa se realizó para los genes de IL-1α (500 pb), IL-2 (400 pb), IL-4 (350 pb), IL-6 (550 pb), IL-10 (450 pb), TNF-α (300 pb), e INF-γ (250 pb) y actina (180 pb) como control. Primero se realizaron gradientes de temperatura, para determinar la temperatura optima de amplificación de cada una. Todas las reacciones se realizaron en un volumen final de 20 µl en las siguientes condiciones: 5 minutos a 95°C, 0.45 segundos a 95°C, 0.45 segundos en gradiente de temperatura de 53°C a 65°C, por 0.45 segundos a 72° C por 30 ciclos, los productos de PCR se separaron en geles de agarosa al 1.2%, durante 60 minutos a 85 V utilizando como intercalante SYBERsafe. Las imágenes de los geles se capturaron con el analizador de imágenes Gel Doc Ez Imaging (Biorad versión 5.1). Las imágenes se analizaron utilizando las herramientas de análisis del programa, para cuantificación relativa de forma manual se detectaron las líneas y bandas y se realizó la cuantificación relativa de la expresión de cada una de las citocinas en ambos grupos (reactores y no-reactores a la prueba de la tuberculina) tomando como gen de referencia la amplificación de actina en cada una de las muestras.

RESULTADOS

Se observó que no todas las citocinas (IL-1α, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF-α, INF-γ y Actina) se encuentran expresándose en CMC de bovinos. En CMC de bovinos reactores a la prueba de la tuberculina se observo la expresión de las citocinas; 1α, IL-6, IL-10, TNF-α, INF-γ, mientras que en las CMC de bovinos no-reactores a la prueba las citocinas que se expresaron fueron; 1α, IL-10, TNF-α, INF-γ, en donde la diferencia entre los grupos de estudio fue la expresión de IL-6 en CMC en bovinos reactores; en ninguna de todas las muestras de los grupos de estudio se observó la expresión de las citocinas IL-2 e IL-4, como se puede observar en la figura 1.

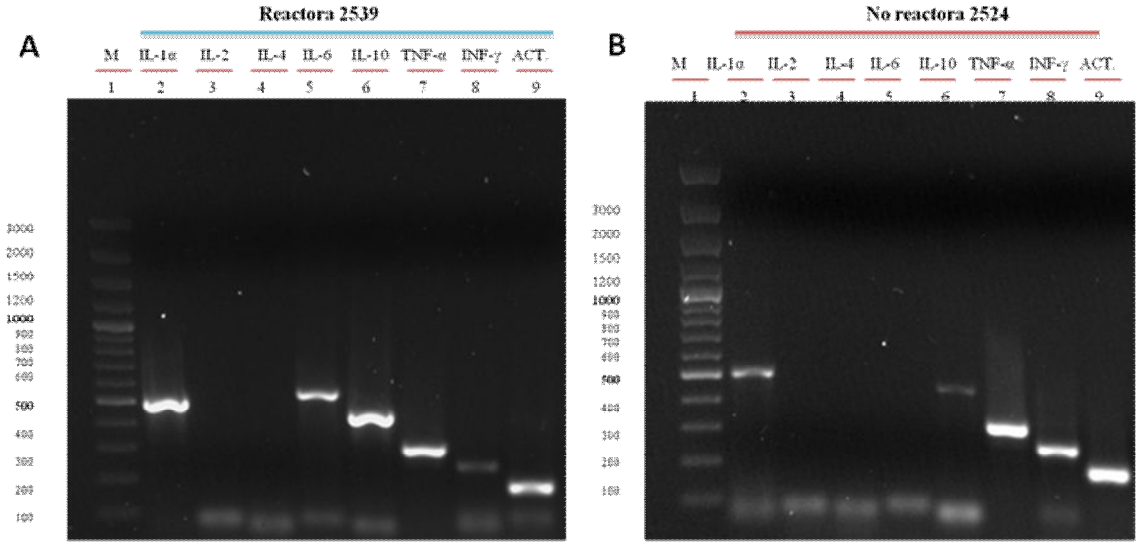


Figura 1. Separación de citocinas en geles de agarosa. **A**: Muestra de vaca reactora, carril 1: marcador de peso molecular 100 pb; carril 2: IL 1α (500 pb); carril 3: IL-2 (400 pb); carril 4: IL-4 (350 pb); IL-6 (550 pb); IL-10 (450 pb); TNF-α (300 pb); INF-γ (250 pb) y actina (180 pb) control. **B**: Muestra de vaca no-reactora; carril 1: marcador de peso molecular 100 pb; carril 2: IL 1α (500 pb); carril 3: IL-2 (400 pb); carril 4: IL-4 (350 pb); IL-6 (550 pb); IL-10 (450 pb); TNF-α (300 pb); INF-γ (250 pb) y Actina (180 pb) control.

Al realizar el análisis de expresión (RNAm) de cada citocina con su control (actina) para normalización, se observó diferencia en la expresión de las citocinas entre las muestras, la expresión de IL-1 α e IL-10 fue mayor en CMC de las muestras de vacas reactoras en comparación a las muestras de vacas no-reactoras, mientras que la expresión de INF- γ fue mayor en el grupo no-reactor. La expresión de TNF- α se mantiene similar en ambos grupos sin embargo se observó mayor expresión en el grupo de las muestras no-reactoras, como se puede observar en la figura 2.

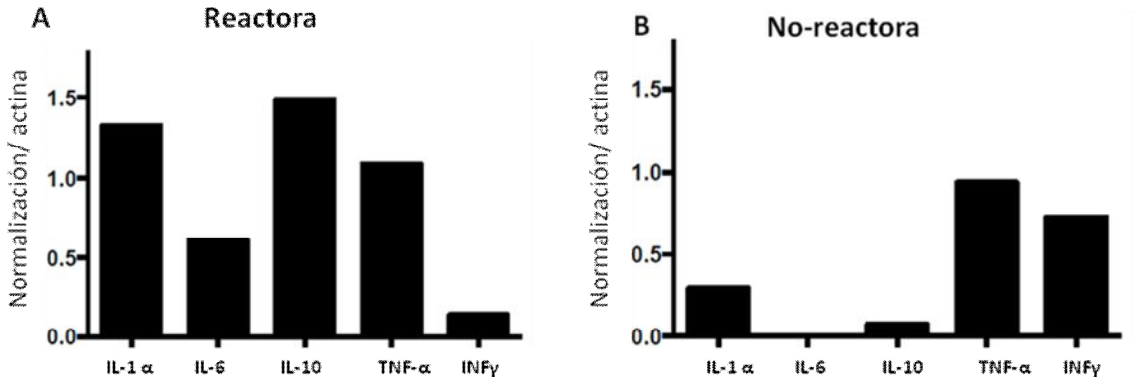


Figura 2. Niveles de expresión de las citocinas, normalizadas con actina. **A**: muestra reactora, **B**: muestra no-reactora

DISCUSIÓN

En este estudio se analizó la expresión de genes (RNAm) de las citocinas: IL-1α, IL-2, IL-4, IL-6, TNF-α, e INF-γ en CMC de bovinos reactores y no-reactores a la prueba de la tuberculina y naturalmente expuestos a TBb. El objetivo principal de este trabajo fue determinar si existe un perfil en la expresión de citocinas en cada uno de los grupos de estudio y analizar los niveles de expresión de cada citocina en las CMC de bovinos reactores y no-reactores utilizando RT-PCR, esto ayudaría a conocer si aquellos bovinos reactores y no-reactores transfieren las mismas citocinas a través del calostro y si los niveles de expresión de estas citocinas en la transferencia son iguales o diferentes .La respuesta inmune se puede clasificar en dos subgrupos de linfocitos atendiendo al patrón de citocinas que producen los cuales se denominan como T helper 1 (Th1) y T helper 2(Th2). En respuesta a la estimulación antigénica, los linfocitos Th1 producen interleucinas (IL) como interferón γ (IFN-γ) y estimulan la inmunidad mediada por las células. Los linfocitos Th2 segregan IL-4, IL-5 e IL-10, favorecen la inmunidad humoral, e inducen la producción de anticuerpos. En modelos murinos con tuberculosis se ha mostrado una respuesta protectora inicial de tipo Th1 seguida de una respuesta Th2, sirven para limitar la respuesta inflamatoria y reducir el daño del tejido en el sitio de infección lo cual podría explicar los resultados obtenidos en el presente estudio en donde se observa la expresión en CMC de citocinas de tipo Th1 como INF-γ y citocinas del perfil Th2 como IL-6 e IL-10, además de las citocinas pro-inflamatorias : IL-1 y TNF-α en CMC de bovinos naturalmente expuestos a TBb. Además se observaron diferencias en la

expresión de citocinas en los niveles de expresión entre bovinos reactores y no-reactores en las citocinas analizadas una vez que se realizo la normalización de cada una con su control actina. Estas diferencias podrían estar relacionadas en el resultado a la prueba de la tuberculina que identifica aquellos animales que han estado en contacto con *M.bovis* en alguna etapa de su vida por lo tanto se encuentran sensibilizados y resultan positivos a la prueba clasificándolos como reactores, mientras que aquellos animales que no han estado en contacto con la bacteria se determinan como no reactores sin embargo otra causa para resultar no reactores es que los bovinos se encuentren en estado de anergia en donde no hay una respuesta del sistema inmune por los que no reaccionan a la prueba. En CMC de bovinos reactores se observo mayor expresión de IL-10 y menor expresión de INF-γ, estos resultados podrían estar relacionados debido a que dentro de la actividad primaria de IL-10 esta la supresión de la inmunidad celular la cual da origen principalmente a la expresión de INF-γ por lo tanto a mayor expresión de IL-10 menor expresión de INF-γ como se observa en los reactores ,mientras en no reactores la expresión de IL-10 fue menor que la expresión de INF-γ. La respuesta inmune de citocinas en la exposición a *Mycobacterium* tiene relación con la carga bacteriana en los bovinos durante las distintas etapas de la infección. En un estudio realizado por Boddu-Jasmine en bovinos infectados con distintas dosis de *M. bovis* para analizar los niveles de expresión de IL-4, IL-10, TNF-α, e INF-γ en nódulos linfáticos, a través de RT-PCR, se observo que los niveles de expresión de IL-10 aumentan gradualmente en aquellos animales que fueron infectados con 1-1000 UFC [16], previos estudios demostraron que los niveles de mRNA fueron bajos a las 5 semanas de la infección con un aumento a las 26 semanas después de la infección [17] . La expresión de IL-4 fue observado en animales infectados con 1 UFC y 10 UFC con un aumento en los niveles de expresión en los ganglios linfáticos de los animales infectados con 100 UFC y 1,000 UFC. En la tuberculosis bovina la expresión de IL-4 se observa relativamente baja hasta 6-8 semanas después de la inoculación a partir de entonces alcanza su punto máximo manteniendo los niveles altos durante 2 semanas, seguido por un fuerte disminución [18]. El nivel de la expresión de TNF-α no fue significativamente diferente en los distintos grupos de dosificación, aunque hubo aumento en la expresión de esta citocina a partir de 1 UFC a 1000 UFC. La posible razón es que esta citocina está involucrada principalmente en las etapas iniciales de la inmunidad innata [19]. Generalmente TNF-α es una citocina multifactorial que juega un papel en la apoptosis, activación de las células y diferenciación [20]. El TNF-α durante la tuberculosis juega un papel antibacteriano y a la vez produce una respuesta inflamatoria. Estos resultados tienen relación a lo encontrado en el presente estudio por lo que se podría sugerir que las distintas citocinas que se producen durante la infección con *M. bovis* pueden ser transportadas al calostro y los niveles de expresión de las distintas citocinas encontrados en los grupos de estudio están relacionados con la carga bacteriana en los bovinos y en las etapas de infección, debido a que las muestras de calostro se tomaron de ranchos lecheros en donde existe una alta prevalencia a TBb lo cual significa una exposición constante a *M. bovis*.

CONCLUSIÓN

Se determinó la presencia de citocinas en CMC, las cuales son de tipo Th1 y Th2, en muestras de bovinos reactores y no-reactores a la prueba de la Tuberculina. De acuerdo a estos resultados se puede concluir que la transferencia pasiva de inmunidad en los niveles de citocinas es distinta entre bovinos reactores y no-reactores.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se desarrolló en el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. (CIATEJ en la Unidad de Biotecnología Médica y Farmacéutica, con el apoyo del recurso FOMIX-JALISCO clave 2009-05-123895.

REFERENCIAS

[1] Nousiainen, J., Korhonen, H., Syvaoja, L., Savolainen, S., Saloniemi, H., Halonen, H. (1994). The effect of colostral, immunoglobulin supplement on the passive immunity, growth and health of neonatal calves. Agric. Sci. Finly 3:421-428.

[2] Robinson, D., Stott, H.,Denise, K. (1988). Effects of passive immunity on growth and survival in the dairy heifer. J. Dairy Sci. 71:1283-1287

[3] Bush, J., Staley, T.E. (1980). Absorption of colostral immunoglobulins in newborn calves. J. Dairy Sci. 63:672-680.

[4] Le Jan, C. (1996). Cellular components of mammary secretions and neonatal immunity: a review. Vet. Res. 27: 403-417.

[5] Davis, L., Drackley, K. (1998). The development, nutrition, and management of the young calf. Iowa State University Press, Ames, Iowa.

[6] Romagnani S. (1999). Dermatologia Peruana. Volumen 9. Suplemento 1.

[7] O`Reilly, L.M., Dabort, C.J. (1995). The epidemiology of Mycobacterium bovis infections in animals and man: a review. Tuber lung Dis.. 76 Spll: 1:1-46.

[8] Neil, S.D., Cassidy J., Hanna J., Mackie, D.P., Pollock, J.M., Clements, A.(1994). Detection of Mycobacterium bovis, infection in skin test- negative cattle with an assay for bovine interferon-gamma. Vet. Rec. 135: 134:135.

[9] Unión ganadera regional de Jalisco (01 de 01 de 2012). www. ugrj.org.mx. http://www.ugrj.org.mx/index.php?option=com_content&task=view&id=138&Itemid=228

[10] Collins F. (1994).The immune response to mycobacterial infection development of new vaccine. Vet Microbiol; 40: 95-110

[11] Cousins, D.V. (2001). Mycobacterium bovis infection and control in domestic livestock. (E.J.B. Manning & M.T. Collins, edit). Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 71-85.

[12] Menzies, F., Neill, S. (2000). Cattle-to-cattle transmission of bovine tuberculosis. Vet. J. (160) 92-106

[13] Herrera, R. S., Gordiano, M., López, G., Bojorquez N., Padilla, F, Pereira, A., Flores, M., Estrada,C. (2013). Mycobacterium bovis DNA Detection in colostrum as a Potential indicator of vaccination effectiveness against Bovine Tuberculosis. Clin. Vaccine Immunol. 20 (4): 627.

[14] Hagiwara, K., Kataoka, S., Yamanaka, H., Kirisawa, R., Iwai, H. (2000). Detection of cytokines in bovine colostrum. Vet. Immunol. Immunopathol. (76) 183-190.

[15] Le Jan C. (1996). Cellular components of mammary secretions and neonatal immunity: a review. Vet. Res. (27) 403-417.

[16] Boddu-Jasmine,H., Witchell, J., Vordermeier, M., Wangoo, A., Goyal, M. (2008). Cytokine mRNA expression in cattle infected with different dosages of Mycobacterium bovis. Tuberculosis , (88) 610 – 615

[17] Welsh, M., Cunningham, R, Corbett, D., Girvin, R., McNair, J., Skuce, R. (2005). Influence of pathological progression on the balance between cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. Immunology; 114(1):101-11.

[18] Rhodes, S., Palmer, N., Graham, S., Bianco, A., Hewinson, R., Vordermeier, HM. (2000) Distinct response kinetics of gamma interferon and interleukin-4 in bovine tuberculosis. Infect Immun; 68(9): 539-400.

[19] Pratt, R.J., Grange, J.M., Williams, V.G. (2005). "Tuberculosis: a foundation for nursing and health practice", London Hodder Education; chapter 2.

[20] Ehlers S. Role of tumour necrosis factor (TNF) in host defence against tuberculosis: implications for immunotherapies targeting TNF. Ann Rheum Dis 2003;62: 37.

DESIGN OF PRIMERS FOR AMPLIFICATION OF GENES ASSOCIATED WITH THE BIOSYNTHESIS OF SIDEROPHORE PSEUDOMONINE

(Diseño de iniciadores para la amplificación de genes asociados a la biosíntesis del sideróforo pseudomonina).

Ana Laura Arenas-Navarro[a]*; Ramón Ignacio Arteaga-Garibay[b+]; Marcos Daniel Martínez-Peña[b]; Jorge David Cadena- Zamudio[b]; Porfirio Gutiérrez-Martínez[a].

[a] Laboratorio de Biotecnología, Instituto Tecnológico de Tepic, Tepic, Nayarit.
[b] Laboratorio de Recursos Genéticos Microbianos, Centro Nacional de Recursos Genéticos-INIFAP, Tepatitlán de Morelos, Jalisco

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: arteaga.ramon@inifap.gob.mx

Área del Conocimiento: Biología Molecular

ABSTRACT
Microbial siderophores are secreted metabolites that function as chelating iron to capture their environment in response to the restriction of this element in the atmosphere agents. The study of genes involved in the biosynthetic pathway of siderophores allow biotechnological applications in the production of these molecules for biological control. In this paper the design of primers for detecting associated pseudomonina biosynthesis genes was performed. Was investigated in literature genes associated with this siderophore biosynthesis and 7 genes were selected, a search was made of the nucleotide sequences in GenBank and KEGG databases. The design is performed with the NCBI-BLAST platform first seven reference sequences available in GenBank were taken. The designed primers were analyzed in OligoEvaluator ™ primerQuest® platforms and to assess the formation of secondary structure, Tm, % (C + G), length and molecular weight. A restriction map was made in the V2.0 NEBcutter platform for choosing restriction enzymes that allow obtaining sized fragments of the 7 genes previously selected, in order to be subsequently used in the generation of genomic libraries of this. As a result 10 pairs of primers (forward and reverse) for each of the pmsA, pmsB, pmsC, pmsD, pmsE, pmsF and pmsG genes, of which 14 were selected were obtained, were considered for selection those in which the sequence the primer is found before the start codon and after the stop codon of the gene, in addition to meeting all requirements to be used, as is, (do not form stable secondary structures and values similar Tm); based on their characteristics and thermodynamic values determined that the primers designed *in sillico* could be used in a PCR reaction for amplifying genes.

Keywords: Primers, Siderophores, PCR, Pseudomonine.

RESUMEN

Los sideróforos microbianos son metabolitos secretados que funcionan como agentes quelantes al capturar el hierro de su entorno en respuesta a la restricción de este elemento en el ambiente. El estudio de los genes involucrados en la ruta biosintética de sideróforos permitirá usos biotecnológicos de estos para control biológico. En este trabajo se diseñaron iniciadores para la detección de genes asociados a la biosíntesis de pseudomonina. Se investigó en la literatura los genes asociados a la biosíntesis de pseudomonina y se seleccionaron 7 genes, se buscaron las secuencias de nucleótidos en las bases KEGG y GenBank. El diseño se realizó con la plataforma primer-BLAST del NCBI y se tomaron siete secuencias de referencia disponibles en el GenBank. Los iniciadores diseñados se analizaron en las plataformas OligoEvaluator ™ y primerQuest® para evaluar la formación de estructuras secundarias, Tm, % (C+G), longitud y peso molecular. Se hizo un mapa de restricción en la plataforma NEBcutter V2.0 para la elección de enzimas de restricción que permitirán la obtención de fragmentos del tamaño de los 7 genes antes seleccionados, con el propósito de ser utilizados posteriormente en la generación de bibliotecas de estos. Como resultado Se obtuvieron 10 pares de iniciadores (forward y reverse) para cada uno de los genes pmsA, pmsB, pmsC, pmsD, pmsE, pmsF y pmsG, de los cuales se seleccionaron 14, se consideraron para la selección aquellos en que la secuencia del iniciador se encontrara antes del codón de inicio y después del codón de terminación del gen, además de cumplir con todos los requerimientos para poder ser utilizados (no formar estructuras secundarias estables y valores de Tm similares); con base a sus características y valores termodinámicos se determinó que los cebadores diseñados in sillico podrían ser utilizados en una reacción de PCR para la amplificación de los genes.

Palabras Clave: Iniciadores, Sideróforos, PCR, Pseudomonina.

INTRODUCCIÓN

El hierro es un elemento esencial para el crecimiento de casi todos los organismos, es vital para llevar a cabo muchos procesos celulares como: catalizador de procesos enzimáticos, transferencia en la cadena de transporte de electrones y la síntesis de DNA y RNA [1]. Sin embargo, debido a la presencia de oxígeno en la atmosfera del planeta hace a este elemento escasamente disponible debido a la rápida oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} y la subsecuente formación de hidróxidos insolubles [2]. A causa de la baja biodisponibilidad del Fe en el medio ambiente, los microorganismos han desarrollado estrategias específicas de captación de hierro, como la producción de sideróforos [3].

Los sideróforos microbianos son metabolitos de bajo peso molecular (<10 KD), que actúan como agentes quelantes al captar el hierro en su entorno [4], además de su papel en el transporte activo de hierro pueden actuar como antagonistas de crecimiento al secuestrar el hierro del medio ambiente, lo que restringe el crecimiento de organismos patógenos. En respuesta a la restricción de hierro en el ambiente los genes involucrados en la producción y captura de sideróforos, son expresados, lo que conlleva a un aumento en la producción de estas moléculas [5], Loper H y Gross J. [6], reportaron que los genes pmsA, pmsB, pmsD, pmsF y pmsG, forman parte de la ruta biosintetica de la Pseudomonina sideróforo producido por las bacterias del genero *Pseudonomas fluorescens AH2* y *P. fluorescens* WCS374.

Los sideróforos se han propuesto como una alternativa al uso plaguicidas sintéticos y peligrosos ya que se ha encontrado que las diferentes especies de *Pseudomonas* pueden mejorar el crecimiento de las plantas mediante la producción de sideróforos por que los protege contra agentes patógenos [7].

METODOLOGIA

Búsqueda de minería de genes

Se realizó una investigación bibliográfica de sideróforos que biosintetiza el género bacteriano *Pseudomonas* spp, se eligió la pseudomonina, que está asociada a la ruta metabólica del corismato y presenta una estructura química sencilla en comparación con otros sideróforos. Se hizo una búsqueda de las secuencias de nucleótidos en la plataforma KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) para los genes pmsA, pmsB, pmsC, PmsD, PmsE y PmsF, y descargaron en formato fasta.

Se llevó a cabo una búsqueda de secuencias homologas en la plataforma nucleotide BLAST del NCBI, se seleccionaron aquellas secuencias que pertenecieran al género *Pseudomonas* spp, se descargaron en formato fasta, se consideraron 200 nucleótidos rio arriba del codón de inicio de la secuencia del gen y 200 nucleótidos rio debajo del codón de terminación.

Diseño de iniciadores

Se realizó el diseño de los iniciadores para la obtención del gen de interés en la plataforma Primer BLAST del NCBI. Los iniciadores resultantes fueron analizados mediante las herramientas bioinformáticas OligoEvaluator™ de SIGMA-ALDRICH y primerQuest®, para verificar el contenido de (C+G), formación de hetero y homo-dímeros, formación de horquillas y la determinación de su Tm, con el fin de obtener unos iniciadores óptimos.

Se hizo un mapa de restricción en la plataforma NEBcutter V2.0 para la elección de enzimas de restricción que permitirán la obtención de fragmentos del tamaño de los 7 genes antes seleccionados, con el propósito de ser utilizados posteriormente en la generación de bibliotecas de estos genes.

RESULTADOS

Al realizar la búsqueda de secuencias homologas reportadas en el GenBank para los genes pmsA, pmsB, pmsC, pmsD, pmsE, pmsF y pmsG se obtuvieron 3 secuencias pertenecientes al género *Pseudomonas fluorescens,* que contó con la secuencia completa de los diferentes genes (Tabla 1). Se seleccionó la secuencia perteneciente a *Pseudomonas fluorescens* A506 para todos los genes, que mostró un porcentaje de cobertura entre el 88% y 100%, y un porcentaje de identificación entre el 80% y 100%.

Tabla 1.- Microorganismos reportados en el GenBanck con secuencia completa de los genes que expresan para la producción de pseudomonina.

Microorganismo	Numero de referencia
Pseudomonas fluorescens A506	CP003041.1
Pseudomonas fluorescens pmsC, pmsE, pmsA, pmsB	Y09356.1
Pseudomonas fluorescens WCS374	EF484930.1

En el resultado del primer Blast se obtuvieron 10 pares de indicadores para cada unos de los genes, de los cuales solo se seleccionó un par para cada gen, quedaron un total de 14 iniciadores, 7 forward y 7 reverse (Tabla 2), para la selección de los iniciadores se consideraron aquellos en que la secuencia del iniciador se encontrara antes del codón de inicio y después del codón de terminación del gen de interés.

Tabla 2.- Iniciadores diseñados para amplificar los genes pmsA, pmsB, pmsC, pmsD, pmsF y pmsG.

Gen	Iniciador	Secuencia 5´ a 3´	Producto
pmsA	Forward	CAGATAGCCGCCTGACCGGG	Histidina descarboxilasa
	Reverse	GCCACAAGCCTGCGAGAACC	
pmsB	Forward	TGCAGCATGATCGACGCCTT	Síntesis de Ácido salicílico
	Reverse	GATTCACGCGGGCTGTCCTT	
pmsC	Forward	TCTTTTTATCCCTAGGCCAC	Isocorismato sintasa
	Reverse	GAATTTAACCACTGGCCTCT	
pmsD	Forward	TCCGTTACACGCTCAGGAAC	Péptido sintetasa
	Reverse	TTCCCCCAAATGAGAACGGG	
pmsE	Forward	ACACGTGAATACTATGACTA	(2,3-dihidroxibenzoil) Adenilato sintasa
	Reverse	CATCAGTATTTCAACATTGG	
pmsF	Forward	TTACTTACCGTTCGGACCGC	Histamina N-hidroxilasa
	Reverse	TCAACGTCTTGTGCATTGCG	
pmsG	Forward	CTGAGCGTTGCAGCAGACCG	Péptido sintetasa
	Reverse	AGTCCGGCGAACCAACACCA	

Los análisis realizados mediante las herramientas bioinformáticas OligoEvaluator™ y primerQuest® mostraron resultados similares (Tabla3). Najafov A. M. [8], reportó que los parámetros recomendados

para el diseño de indicadores deben considerar una longitud de 18 a 30 nucleótidos, un %(C+G) del 50% y una Tm de 50-80 °C. Con base a lo reportado por este autor y el análisis *in silico* realizado a los 14 iniciadores diseñados, se determinó que estos podrían ser utilizados en una reacción de PCR para la amplificación de los genes de interés, ya que los iniciadores presentaron parámetros aceptables con una Tm promedio de 64.3 °C, % (C+G) de 50.71%, una longitud de 20 nucleótidos y la formación de estructuras secundarias que no afectan a la PCR.

Tabla 3.- Valores termodinámicos del análisis *in silico* realizado a los indiciadores diseñados

Pro-grama	Pará-metro	pmsA		pmsB		pmsC		pmsD		pmsE		pmsF		pmsG	
		F	R	F	R	F	R	F	R	F	R	F	R	F	R
1	Tm °C	62.6	61.7	59.8	60.4	51.7	52.5	57.1	57.5	47.6	46.7	57.1	56.6	61.4	61.9
2		73.0	71.5	71.4	70.7	59.6	59.6	65.2	70	49.2	55.4	65.9	68.4	71.8	72.2
1	% (C+G)	70	65	55	60	45	45	55	55	35	35	55	50	65	60
2		70	65	55	60	45	45	55	55	35	35	55	50	65	60
1	Ta	62.8	61.6	60.6	60.5	50.65	51.05	56.15	58.75	48.4	46.05	56.5	57.5	61.6	62.05
1	Longitud (pb)	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
2		20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
1	Estruc. Secundaria	1	3	3	2	4	1	3	3	3	2	1	6	2	3
2		Si	0	0	0	0	0	Si	Si	0	0	0	0	Si	0

1= primerQuest, 2= OligoEvaluator™ de SIGMA-ALDRICH®, Tm= Temperatura media, % (C+G)= porcentaje de Citosina-Guanina, (pb)= pares de bases, Ta= temperatura de alineamiento, F=Forward, R=Reverse

El mapa de restricción realizado en plataforma NEBcutter V2.0, permitió la selección de 14 enzimas de restricción, un par para cada uno de los 7 genes seleccionados (Tabla 4).

Tabla 4.- Enzimas de restricción seleccionadas para los genes pmsA, pmsB, pmsC, pmsD, pmsE, PmsF y pmsG

Gen	Enzima de restricción	Tamaño del fragmento (pb)
pmsA	DraI	1199
	BaeI	48
pmsB	BcoDI	371
	BtsCI	138
pmsC	BglI	1197
	XmnI	47
pmsD	BbvC	4361
	AleI	113
pmsE	ApoI	1835
	BmrI	110
pmsF	SfcI	1488
	AvrII	127
pmsG	ApoI	2234
	NsiI	119

CONCLUSIONES

- Los iniciadores diseñados se alinean a la región de interés de los genes pmsA, pmsB, pmsC, pmsD, pmsE, pmsF y pmsG.
- Los iniciadores presentaron los requerimientos *in silico* para ser útiles en una PCR.
- Las enzimas seleccionadas con el mapa de restricción permitirán la obtención de fragmentos del tamaño de los genes pmsA, pmsB, pmsC, pmsD, pmsF y pmsG.
- Se detectaron sitios de restricción para generar sitios cohesivos útiles para clonación.

BIBLIOGRAFIA

[1] E. Ahmed, Holmström S. J. M. (2014), "Siderophores in environmental research: roles and applications", Microbial Biotechnology, 7(3): 196–208

[2] Aguado-Santacruz, G. A., Moreno-Gómez, B., Jiménez-Francisco, B., García-Moya, E., y Preciado-Ortiz, R. E. (2012), "Impacto de los sideróforos microbianos y fitosidéforos en la asimilación de hierro por las plantas: una síntesis", Revista fitotecnia mexicana, 35(1): 9-21.

[3] Saha, R., Saha, N., Donofrio, R. S., y Bestervelt, L. L. (2013), "Microbial siderophores: a mini review", Journal of basic microbiology, 53(4): 303-317.

[4] Syed Sajeed Ali, Vidhale, N.N. (2013), "Bacterial Siderophore and their Application: A review", International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 2(12): 303-312.

[5] Aguado-Santacruz, G. A., Moreno-Gómez, B., Jiménez-Francisco, B., García-Moya, E., & Preciado-Ortiz, R. E. (2012), "Impacto de los sideróforos microbianos y fitosidéforos en la asimilación de hierro por las plantas: una síntesis", Revista fitotecnia mexicana, 35(1): 9-21.

[6] Gross, H., & Loper, J. E. (2009), "Genomics of secondary metabolite production by Pseudomonas spp.", Natural product reports, 26(11): 1408-1446.

[7] Alarcón, A., & Cerrato, R. F. (2012), "Biofertilizantes: Importancia y utilización en la agricultura", Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 26(2): 191-203.

[10] Najafov, A. (2006). *PCR guru*. A laboratory guide for beginners and experts. [Fecha de consulta; Mayo 2015], [Libro en línea] Disponible en :< www.pcrguru.com>.

(Expresión genética de una quitinasa en callos de *Agave tequilana* Weber variedad azul en respuesta a *Fusarium* spp.)

María del Carmen Espitia Carlos [a*+], Fernando Santacruz Ruvalcaba [a], José Pedro Castruita Domínguez [a], Juan Florencio Gómez Leyva[b], Carla Vanessa Sánchez Hernández [a], Gil Virgen Calleros [a], Lucila Méndez Morán [a]

[a] Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara / Camino Ramón Padilla Sánchez No. 2100 Nextipac, Zapopan, Jalisco.
[b] Instituto Tecnológico de Tlajomulco / Km 10 carretera San Miguel Cuyutlán, C.P. 45640 Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: espitia_10@hotmail.com

Área del Conocimiento: Biología Molecular

RESUMEN
El *Agave tequilana* Weber var. Azul es la materia prima para la elaboración del tequila. Una de las principales afectaciones fitosanitarias del cultivo de agave es la pudrición seca de cogollo (PSC) causada por *Fusarium* spp.. En el presente trabajo, se evaluó la expresión de una quitinasa en células indiferenciadas o callos de *A. tequilana in vitro* en respuesta a extractos de *Fusarium* spp. Un genotipo de *A. tequilana* se micro propagó por proliferación de yemas axilares en medio MS con 5 mg L^{-1} de BA y callo en medio MS adicionado con 2mg L^{-1} de 2,4-D y 0.3 mg L^{-1} de BA durante 40 días. Se utilizó el aislamiento FC13 de *Fusarium* spp. (PSC) y una cepa control no patógena FM1 (*Fusarium oxysporum* f.sp. melonis). Los hongos se crecieron 15 días en MM líquido de Foster. Los extractos se obtuvieron a partir del filtrado del medio de crecimiento de FC13 (FILC), y el micelio inactivo por choque térmico de FC13 (FC) y FM1 (FM) respectivamente. A cada callo por triplicado se colocó 10 mg mL^{-1} de cada extracto y se tomaron muestras en cuatro diferentes tiempos (3, 24, 48 y 96 hpi). Para la expresión de la quitinasa, se diseñaron oligonucleótidos usando el alineamiento de secuencias (cDNA) de quitinasas de varias especies de plantas monocotiledóneas. La expresión de la quitinasa se realizó mediante RT-qPCR. En general, la expresión de la quitinasa se incrementó por efecto del filtrado del hongo patogénico en comparación con los callos no inducidos (Exp=1), siendo significativa la acumulación de transcritos en las primeras 24 hpi con FM (Exp=6.96) y FC (Exp=3.87), y un incremento a las 3 hpi con el FILC (Exp=2.24). La expresión de la quitinasa se presentó como una respuesta en etapas tempranas y es inducida por compuestos hidrófilicos secretados por el hongo.

Palabras Clave: *Agave tequilana*; *Fusarium*; Quitinasa; RT-qPCR cuantitativo

MOLECULAR IDENTIFICATION OF BOVINE FIBROPAPILLOMATOSIS IN CATTLE OF SAN LUIS POTOSÍ

(Identificación molecular de fibropapilomatosis bovina en ganado de San Luis Potosí)

Isaura Méndez-Rodríguez[a], Socorro Hernández-Arteaga[a*+], Milagros González-Hernández[a], Fernando Muñoz-Tenería[a].

[a] Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: lesha1080@gmail.com

Área del Conocimiento: Biología Molecular

ABSTRACT
The presentation of bovine fibropapillomatosis affects parameters production such as delayed development and decreased weight gain, causing economic losses and even predispose the presentation of secondary infections or malignancies for or that is important to characterize the virus and the factors associated with the disease, to develop preventive strategies for a more efficient control of the disease. The purpose of the work is molecularly characterize bovine fibropapillomatosis combined aspects of management factors associated with it and relating to the state of health or disease in cattle farms. Driving conditions and general condition are evaluated through interviews and surveys of producers; molecular identification the DNeasy Blood & Tissue Kit of Qiagen is used, to the PCR primers for BPV FAP59 (forward;5'-TAACWGTIGGICAYCCWTATT-3') and FAP64 (reverse; 5'-CCWATATCWVHCATITCICCATC-3') amplify a fragment of 480pb BPV 1.2 to 6 and 8, while the amplification of E7 region is to BPV-3. The PCR mixture used initially ± 20 mM Tris HCl (pH 8.3), 2 mM MgCl2, 200 mM of each dNTP, 10 pmol of each primer, and 2.5 U of Taq DNA polymerase for the PCR conditions should be evaluated and optimized. Positive samples will be sent to sequencing. Results revealed the preimenares quality genetic material to carry out the PCR and the presence of fibropapilomavirus currently being done to standardize the definition, this is the first study that identifies molecularly Fibropapillomas in cattle in the region.

Keywords: bovine fibropapillomatosis.

IMMUNO DIAGNOSTICS OF *Vibrio harveyi* BASED ON CHICKEN ANTIBODY FRAGMENT

(Inmunodiagnóstico de *Vibrio harveyi* basado en fragmentos de anticuerpo de gallina)

Galdy Hernández-Zárate[a+], Tanya Amanda Camacho-Villegas[b*], Jorge Zamora-Castro[a], Jorge Jaime Juárez-Lucero[a], Pavel Hayl Lugo-Fabres[c], Liliana M Alzate-Gaviria[d], Carlos Lezama-Cervantes[e]

[a]Ingeniería en Biotecnología, Universidad Politécnica Metropolitana de Puebla.
[b]Cátedra CONACYT. Unidad de Biotecnología Médica Farmacéutica, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco.
[c]UNIMA Soluciones Naturales, SAPI de CV.
[d]Unidad de Energía Renovable, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C.
[e] Facultad de Ciencias Marinas, Universidad de Colima.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: galdyhz@gmail.com

Área del Conocimiento: Biología Molecular

ABSTRACT
Vibrio harveyi, a bioluminescent bacterium, is not only ubiquitous in the marine environment but is also considered one of the principal bacterial species that form part of the normal flora of healthy organisms in aquaculture systems. However, over the last years, strains of these species have been recognized as a significant pathogenic agent and cause of high rates of mortality in shrimp culture worldwide. In Latin America, Mexico included, *V. harveyi* drastically affects the production and profits of marine organisms in coastal areas. There are several reports related to vibriosis caused by *V. harveyi* in crustacean. The pathogenicity mechanism of these bacteria is not well known. Likewise, the phenotypic and metabolic plasticity characteristics of the *Vibrio* genus have rendered the traditional methods for *V. harveyi* identification and detection, imprecise and uncertain. The objective of this work was to generate a single-chain variable fragment (scFv) for the specific identification of *V. harveyi* strains using an ELISA assay. Phage-displayed recombinant antibody libraries derived from spleen mRNA of chickens immunized with a *Vibrio harveyi* strain were constructed as scFv by overlap extension polymerase chain reaction (PCR) of the heavy (VH) and light (VL) variable gene segments of immunoglobulin (IgG). Two clones expressing specific scFv were identified after panning the library against the bacteria. ELISA assays showed that one scFv antibody was able to discriminate specifically *V. harveyi* between other species such as *V. alginolyticus, V. parahaemolyticus* and *V. campbellii*. This work shows that the generation of chicken recombinant antibodies has a considerable potential for the development of diagnostic tests that can be more specific, sensitive, economical and easy to interpret in the aquacultural field.

Keywords: *Vibrio harveyi*; aquaculture; immunological methods for bacterial detection; scFv.

RESUMEN
Vibrio harveyi, una bacteria bioluminiscente, es ubicua no solamente en ambientes marinos, sino que también es considerada como una de las principales especies bacterianas que forman parte de la flora normal de organismos saludables en sistemas acuaculturales. Sin embargo, durante los últimos años, diferentes cepas de *V. harveyi* han sido reconocidas como un agente patogénico significativo y causante de altas tasas de mortalidad en cultivos de camarón en todo el mundo. En Latinoamérica, incluyendo México, *V. harveyi* afecta drásticamente la producción de organismos marinos en áreas costeras. Aun cuando existen diversos estudios relacionados con vibriosis causadas por *V. harveyi* en crustáceos, el mecanismo de patogenicidad de esta bacteria es desconocido. Asimismo, la plasticidad fenotípica y metabólica que caracteriza al género *Vibrio* ha ocasionado que los métodos tradicionales utilizados para la identificación y detección de *V. harveyi* resulten imprecisos y poco confiables. El objetivo de este trabajo fue generar un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) para la identificación específica de cepas de *V. harveyi* usando un ensayo ELISA. Se construyó una biblioteca de anticuerpos recombinantes desplegados en fagos a partir del RNAm del bazo de una gallina inmunizada con *V. harveyi*. Para ello, se realizó una extensión y traslape mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de los segmentos génicos de la región variable de la cadena ligera (VL) y de la cadena pesada (VH) de la inmunoglobulina (IgG). Se identificaron dos clonas que expresaron un scFv específico después del tamizado de la biblioteca contra la bacteria. Los ensayos ELISA mostraron que un anticuerpo scFv fue capaz de discriminar específicamente a *V. haveyi* entre otras especies tales como *V. alginolyticus, V. parahaemolyticus* and *V. campbellii*. Este trabajo muestra que la generación de anticuerpos recombinantes de gallina representa un potencial considerable para el desarrollo de pruebas diagnósticas que puedan ser más específicas, sensitivas, económica y de fácil interpretación en el campo acuícola.

Palabras Clave: *Vibrio harveyi*; acuacultura; métodos inmunológicos para la detección bacteriana; scFv.

INTRODUCCIÓN

La Acuicultura continúa siendo una de las industrias alimenticias de mayor crecimiento en la actualidad, debido al incremento constante en la demanda a nivel mundial. Para el periodo 2002 a 2012, la tasa promedio de crecimiento fue del 6.1%. Esta producción de organismos acuáticos (plantas y animales) ha venido siendo mejorada y sistematizada por el aporte de conocimientos científicos en las últimas décadas [1]. En nuestro país al igual que en el resto del mundo, aun cuando la acuicultura es una actividad económica de gran potencial y rentabilidad, las enfermedades constituyen uno de los principales factores limitantes para su desarrollo, ocasionando pérdidas económicas y retrasos en los tiempos estimados de cosecha, afectando así a la producción y el comercio de esta industria [2,3]. La acuacultura debe generar recursos económicos para la empresa o ser capaz de suplir las necesidades básicas de subsistencia para el grupo familiar que la desarrolle, esto debe estar basado en una estrategia de sanidad adecuada para evitar pérdidas económicas y que por el contrario, los ingresos superen o al menos igualen la inversión realizada.

A nivel mundial, las bacterias constituyen uno de los principales agentes causantes de enfermedades en organismos cultivados, particularmente aquellas que pertenecen al género *Vibrio* [4,5]. Lo anterior es debido a que un manejo inadecuado de las condiciones de cultivo (calidad del agua, densidad poblacional, nutrición, manipulación de los organismos, entre otras) puede conducir a situaciones de estrés en los organismos, favoreciendo el desarrollo de enfermedades bacterianas, ya que éstos

microorganismos se caracterizan por ser patógenos oportunistas que forman parte de la microflora natural del medio de cultivo y proliferan una vez que el organismo es debilitado debido a cambios en el ambiente [6]. En México, las vibriosis son las enfermedades bacterianas de mayor impacto en la acuicultura, debido a su ubicuidad, prevalencia, alta frecuencia de aparición y patogenicidad [7]. Entre las especies del género *Vibrio* consideradas de importancia sanitaria en la acuicultura se puede mencionar, entre otros, a: *V. alginolyticus, V. campbellii, V. fluvialis, V. ordalii, V. orientalis, V. parahaemolyticus, V. penaeicida, V. salmonida, V. splendidus, V. vulnificus y V. harveyi*. La especie de *V. harveyi* es reconocida en diversos países asiáticos y en Latinoamérica, como el principal agente patógeno de tipo bacteriano [8]. Esta especie causa la muerte en larvas, juveniles o adultos de organismos cultivados [9].

Es una especie que habita comúnmente el medio marino y también se encuentra presente en los organismos que pueblan este tipo de ambiente, constituyendo un integrante de la flora normal de organismos acuáticos, capaz de provocar epizootias en poblaciones bajo cultivo y en poblaciones silvestres sometidas a confinamiento [10]. A partir de la década de los noventa, se reconoció su potencial virulento y desde entonces, afecta a un número cada vez mayor de animales cultivados, los cuales pueden ser susceptibles a la infección por este patógeno a lo largo de un ciclo de cultivo.

Una meta trascendental involucrada con la sanidad acuícola, es el diseño de pruebas diagnósticas que aporten una mayor confiabilidad y rapidez en la identificación de las bacterias patógenas. En este proyecto, se obtuvieron anticuerpos de dominio sencillo tipo scFv de gallina que fue inmunizada con *V. harveyi*, demostrando su capacidad de reconocimiento. Estos anticuerpos tienen un gran potencial para el desarrollo de una prueba de diagnóstico que sea específica, sensible, económica y que pueda ser empleada en las granjas acuículas.

METODOLOGÍA

Inmunógeno. Se inmunizó una gallina *White Leghorn* de 2 kg aproximadamente, con *Vibrio harveyi* y adyuvante completo/incompleto de Freund, siguiendo el procedimiento sugerido por [11]. Transcurridas dos semanas posteriores a la última inmunización, la gallina fue sacrificada para extraer el bazo. Todas las reacciones de amplificación, clonación, construcción de biblioteca y ensayos tipo ELISA se basaron en protocolos establecidos previamente en la literatura [12].

Extracción de ADN, RT-PCR, síntesis y traslape de la cadena ligera (V_L) y pesada (V_H) del anticuerpo. Se realizó la extracción y purificación del ARN total a partir del bazo, utilizando el *kit* comercial *ARN_T:RNA STAT-60™* (*AsmBio*) siguiendo las especificaciones del proveedor. A partir de éste ARN, se sintetizó el ADN complementario (ADN_c) que codifica para las regiones variables de V_L y V_H del anticuerpo (secuencias correspondientes a la región de reconocimiento al antígeno de la inmunoglobulina G), utilizando el *kit SUPERSCRIPT™ II* para RT-PCR (*Invitrogen*). Posteriormente, en reacciones independientes se sintetizaron las regiones variables de V_L (~350 pb) y V_H (~400 pb), con la finalidad de generar los scFv´s (fragmentos variables de cadena sencilla), mediante una tercera reacción de PCR que sirvió para vincular y extender las cadenas V_L y V_H (~800 pb) por traslape de secuencias complementarias introducidas por oligonucleótidos.

Construcción de la biblioteca de fragmentos de anticuerpos del tipo scFv en fásmidos. Para la construcción de la biblioteca y las rondas de selección se utilizó el procedimiento indicado en Barbas et al., [12]. La biblioteca de los scFv se clonó en el vector pComb3X utilizando la enzima de restricción *Sfi*I (*Roche Molecular Biochemicals*) y la enzima T4 DNA Ligasa (*GIBCO-BRL*). Para la transformación fue utilizada la cepa *E. coli* XL1-Blue y un electroporador (25 mF y 200Ω, *MicroPulser™*, *BioRad*). Las células

transformadas fueron amplificadas, incubándolas en medio SB con carbencilina (100 µg/ml) y tetraciclina (5 µg/ml) por 1 h a 37 °C y 250 *x g*. Posteriormente, al cultivo se agregó el fago ayudador VCSM13, carbencilina (100 µg/ml), kanamicina (50 µg/ml) y tetraciclina (5 µg/ml), incubando por 2 h a 37 °C y 300 rpm.

Rondas de selección fasmídica. La biblioteca fasmídica fue sometida a tres rondas de selección (R1, R2 y R3), infectando en cada ronda células de *E. coli* XL1-Blue con los fásmidos seleccionados. En cada ronda se utilizaron células de *V. harveyi* inmovilizadas en pozo de placa de ELISA y previamente fueron bloqueadas con albúmina de suero bovino (BSA 3%).

ELISA fasmídico. Los fásmidos de cada una de las tres rondas de selección, fueron analizados mediante ensayos tipo ELISA. Como control negativo se utilizaron pozos con BSA 1% en lugar de las células. Las placas se incubaron durante 2 h a 37 °C. Posteriormente, los pozos fueron bloqueados con 150 µl de BSA 3%, incubando 12 h 4 °C, y se colocaron 50 µl de las rondas de selección correspondiente. Las placas se incubaron nuevamente (2 h, 37 °C). Se agregó Anti-M13 conjugado con peroxidasa (*Amersham Pharmacy Biotech*) y se incubó 1 h a 37 °C. Se agregaron 50 µl del sustrato enzimático ABTS (*Roche Molecular Biochemicals*) y se incubó en la oscuridad a 37 °C hasta que se desarrolló color. La reacción se cuantificó en un lector de ELISA (*Microplate Reader*, Bio-Rad) a 405 nm y fue graficada utilizando el programa Excel (Microsoft®Office Excel, 2013).

Infección de *E. coli* con fásmidos de la R3. Se infectaron células de *E. coli* Top 10F', con los fásmidos obtenidos en la ronda R3; las células se sembraron en agar LB (carbencilina 100 µg/ml) y se incubaron a 37 °C por 12 h. Del cultivo se seleccionaron clonas específicas para *V. harveyi*, y se incubaron bajo las mismas condiciones. Posteriormente, se agregó IPTG (2 mM) y se incubó a 300 rpm y 37 °C por 15 h. Con los sobrenadantes de los cultivos, se realizaron ensayos de ELISA para detectar la especificidad contra *V. harveyi* en cada una de las veinte clonas seleccionadas. Las lecturas fueron graficadas y se seleccionaron las clonas que mostraron una reacción positiva. La reacción fue considerada como positiva cuando su valor fue de tres veces el valor observado en el control negativo. Las clonas que expresaron un scFv fueron confirmadas mediante un ELISA de expresión por tetraplicado.

ELISA de especificidad de scFv hacia *V. harveyi*. Para determinar la especificidad de los scFv hacia *V. harveyi*, se realizó un ELISA de especificidad de forma similar al ELISA de expresión con la única diferencia de que además de *V. harveyi*, se incluyeron en el análisis, las cepas Z_2 y Z_3, así como otras especies del género *Vibrio* (*V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* y *V. cambelli*) y dos géneros bacterianos (*E. coli* y *B. subtilis*).

RESULTADOS

Amplificación de las cadenas del anticuerpo. Las cadenas V_L y V_H amplificadas partir del ADNc, mostraron el tamaño esperado de aproximadamente 350 y 400 pb respectivamente, al igual que el producto de la reacción de traslape de ambas cadenas de 800pb (Figura 1).

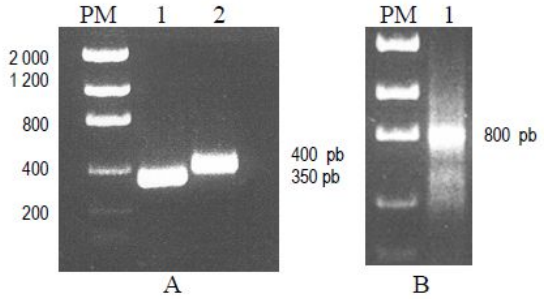


Figura 1. Amplificación por PCR de las cadenas V_H y V_L. **A.** Escalera de ADN (PM), Carril 1: V_L; Carril 2: V_H. **B.** Escalera de ADN (PM); Carril 1: scFv generado por el traslape de ambas cadenas.

Rondas de selección fasmídica. Una vez construida y amplificada la biblioteca de fragmentos de anticuerpos, se realizaron las rondas de selección (R0-R3) contra *V. harveyi*. Las rondas de selección fueron analizadas para evaluar la relación entre fásmidos específicos e inespecíficos contra *V. harveyi* que fueron seleccionados y enriquecidos en cada ronda. En general, se observó un aumento en el título de fásmidos específicos contra *V. harveyi* con relación a los anticuerpos inespecíficos, con una mayor señal en la R3. La Figura 2 muestra esta relación, donde se observa que en la R1 disminuyeron aproximadamente a la mitad los fásmidos específicos, con relación a la R0. En la R2 se observó el mismo comportamiento, esto se debe a los incrementos en la astringencia que se aplicaron entre cada ronda de selección. Sin embargo, en la R3 se observó un incremento en los fásmidos específicos contra *V. harveyi* de aproximadamente tres veces y media del presentado en la R1. La presencia de scFv inespecíficos que se unen a BSA fue baja.

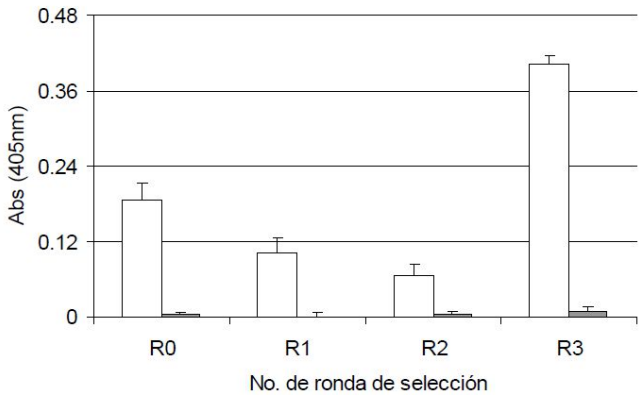


Figura 2. Rondas de selección de fásmidos mediante ensayo ELISA con Anti-M13. Las rondas se denominaron **R0**, ronda 0; **R1**, ronda 1; **R2**, ronda 2; **R3**, ronda 3, (n=3). Fásmidos específicos utilizando *V. harveyi* como antígeno (□); fásmidos inespecíficos utilizando BSA (1%) como antígeno (▨). Las barras indican la desviación estándar (⊤).

Selección de clonas, expresión y recuperación de los scFv anti-*V. harveyi*. Diferentes ensayos tipo ELISA fueron utilizados para detectar la expresión de los scFv biológicamente activos. El ELISA de tamizado de las clonas (Figura 3) reveló que de veinte clonas, únicamente dos de ellas expresaron un scFv que

reconoce a *V. harveyi* (las clonas fueron denominadas $scFv_8$ y $scFv_{18}$). La expresión tuvo los títulos observados en unidades de absorbancia entre 2.4 y 2.6 respectivamente. En el inmunoensayo se observó un ruido de fondo en ambos controles utilizados (0.2).

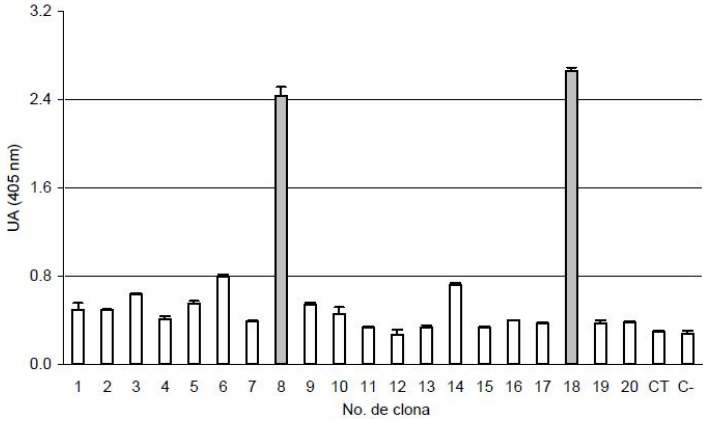


Figura 3. Ensayo de ELISA de clonas que expresan scFv´s específicos para *V. harveyi*. Las clonas de enumeraron del 1-20. Fueron seleccionadas al azar de un cultivo de *E. coli* Top10F´ infectado con fagos correspondientes a la R3. **CT**, *E. coli* Top10F´ virgen como control; **C-**, control negativo, (n=3). Se indica la desviación estándar con barras (⊤).

La efectividad de las dos clonas positivas fue corroborada mediante un ELISA confirmatorio de expresión, realizado por tetraplicado (Figura 4). Se registraron valores de unidades de absorbancia similares a los obtenidos en la primera inducción para cada clona (2.5 y 2.7). Se observó nuevamente el ruido de fondo con valores de 0.3 y 0.4 para cada control utilizado. En ambos ensayos la clona 8 (2.4 y 2.5) presentó títulos superiores a los de la clona 18 (2.6 y 2.7).

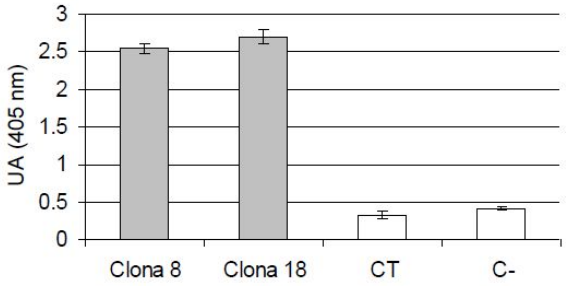


Figura 4. ELISA confirmatorio de expresión de clonas específicas para *V. harveyi* (clonas 8 y 18). **CT,** control *E. coli* Top10F´virgen; **C-**, control negativo, (n=4). La desviación estándar se indica con barras (⊤).

La especificidad de los scFv generados hacia *V. harveyi*, fue evaluada con otras cepas, especies y géneros bacterianos. Se observó que solamente las cepas de *V. harveyi* (Z_3, Z_2 y la cepa control ATCC 14126) mostraron títulos elevados (entre 1.3 y 1.7 de absorbancia) al ser incubadas con los scFv de las clonas 8 y 18. El scFv de la clona 18, presentó títulos bajos (0.38) con la cepa control de *V. harveyi* (Figura 5).

Además, se observó una reducción en los títulos obtenidos ya que en la cepa *V. harveyi* Z_3, éstos disminuyeron en un 43.2% para el caso de la clona 8 y un 44.4% para la clona 18. El ruido de fondo fue persistente y se incrementó en algunas cepas. En todos los inmunoensayos la clona 8 presentó títulos mayores. Se observaron ligeras reacciones cruzadas con las otras especies de *Vibrio* analizadas (0.2), las cuales fueron semejantes a las observadas en *E. coli* e incluso en la única cepa Gram positiva utilizada (*B. subtilis*) pero no son estadisticamente significativas.

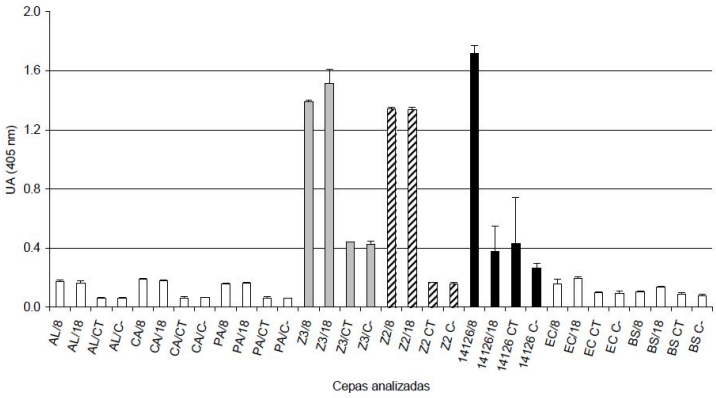


Figura 5. Ensayo de ELISA de reconocimiento de scFv´s de las clonas 8 y 18. Se probaron los anticuerpos con diferentes especies y cepas de *Vibrio*, además de otros géneros bacterianos. **AL**, *V. alginolyticus*; **CA**, *V. campbellii*; PA, *V. parahaemolyticus*; **Z3** y **Z2**, cepas de *V. harveyi*; **14126**, cepa control de *V. harveyi* de la ATCC; **EC**, *E. coli*; **BS**, *B. subtilis*; **CT**, control *E. coli* Top 10F´virgen; **C-**, control negativo, (n=4). Se indica la desviación estándar con barras (⊤).

DISCUSIÓN

El objetivo de este ensayo fue generar anticuerpos monoclonales de gallina dirigidos hacia *V. harveyi*, con la finalidad de obtener fagos que desplegaran un scFv específico que permitirán la identificación de *V. harveyi*. Las dos clonas seleccionadas a partir de la biblioteca inmune de gallina, mostraron producir scFv´s específicos para la identificación de *V. harveyi* y con niveles de expresión altos. En los inmunoensayos únicamente se observaron señales fuertes al utilizar *V. harveyi* como antígeno, por lo que los scFv generados permitieron una rápida, fácil y clara diferenciación con respecto de las otras especies de *Vibrio* analizadas, las cuales mostraron títulos débiles. Así los fragmentos de anticuerpos generados discriminaron claramente entre *V. harveyi* y las especies *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* y *V. campbellii*, las cuales están estrechamente relacionadas [13].

Por otra parte, observamos que el nivel de expresión de las clonas en ensayos inmunoenzimáticos disminuyó después de que la proteína fue almacenada durante 1-2 meses a -70 °C, por lo tanto es necesario realizar estudios de estabilidad de los scFv´s. La disminución del nivel de expresión es un hecho frecuentemente indicado en trabajos realizados con proteínas recombinantes, debido a que la producción de las mismas posiblemente afecta la fisiología propia de la célula productora. El anticuerpo expresado nos permitió determinar que no hay reacción cruzada con otros géneros y especies, incluyendo a *V. campbellii*, con la cual *V. harveyi* está estrechamente relacionado, compartiendo de un 61-74% de similitud en hibridaciones ADN-ADN [14].

En 1998, Robertson y colaboradores produjeron anticuerpos policlonales a partir de conejos, los cuales demostraron identificar diferentes aislados de *V. harveyi* provenientes de granjas de camarón. No

obstante, estos anticuerpos también mostraron afinidad hacia *V. campbelli*, en *Western blot* mostraron que los anticuerpos producidos reconocieron proteínas de membrana externa (OMP). Asimismo, Phianphak y colaboradores [15] obtuvieron anticuerpos monoclonales para la detección de *V. harveyi* a partir de ratones, sin embargo estos investigadores también encontraron reacciones cruzadas contra *Aeromonas hydrophila*. Con relación a esto, ha sido indicado que las aves por ser un grupo filogenéticamente más distante de los humanos que otros mamíferos de laboratorio, pueden presentar ventajas en términos de producción de anticuerpos ya que a mayor distancia filogenética entre el animal inmunizado y el animal del que proviene el antígeno, se da una mayor respuesta inmune. Además, el sistema inmune de las gallinas puede reconocer y detectar epítopos que difieren de los detectados por mamíferos, como los ratones y los conejos [16].

Por otro lado, debido a que durante las inmunizaciones se utilizaron células completas de *V. harveyi*, se requiere de diferentes estudios para poder identificar hacia qué tipo de molécula de la célula fueron generados los anticuerpos específicamente (lípido, carbohidrato o proteína). Además, es necesario contar con las secuencias de las clonas para poder analizarlas mediante paquetes informáticos y dilucidar entre las diferencias de especificidad o afinidad, las cuales según estudios realizados por Czerwinski y colaboradores [17], radican en las cadenas V_H y V_L respectivamente.

CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo muestran que las bibliotecas de fagos representan una fuente rica de clonas específicas para la identificación de *V. harveyi*, disponibles para el desarrollo de sistemas de diagnóstico rápidos, sencillos y sensitivos para su uso rutinario en el campo de la acuicultura.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Dr. M. Leonardo Lizárraga Partida por la donación de las cepas bacterianas Z_2 y Z_3.

REFERENCIAS

[1] FAO. (2014). The State of World Fisheries and Aquaculture. Opportunities and challenges. Roma. 223.

[2] WB/NACA/WWF/FAO. (2001). "Thematic review on management strategies for major diseases in shrimp aquaculture", in Proceedings of a Workshop. (Subasinghe R., Arthur R., Phillips M.J., Reantaso M. Eds). The World Bank (WB), Network of Aquaculture Centers in Asia-Pacific (NACA), World Wildlife Fund (WWF) and Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) Consortium Program on Shrimp Farming and the Environment. Filipinas, 28-30.

[3] deWalt, B.R., Ramírez Zavala J. R., Noriega L., González R.E. (2002). Shrimp aquaculture, the people and the environment in coastal Mexico. Report prepared under the World Bank, NACA, WWF and FAO Consortium Program on Shrimp Farming and the Environment. 73.

[4] Gill, T.A. (2000). Waste from processing aquatic animals and animal products: implications on aquatic animal pathogen transfer. Roma: FAO Fisheries Circular No. 956, 26.

[5] FAO (2003). Health management and biosecurity maintenance in white shrimp (*Penaeus vannamei*) hatcheries in Latin America. Roma: FAO Fisheries Technical Paper No. 450, 62.

[6] Brock J. A., Main K. L. (1994). A guide to the common problems and diseases of cultured *Penaeus vannamei*. Baton Rouge: World Aquaculture Society, 242.

[7] PROY-NOM-059-PESC-2004. (2004). Proyecto de Norma Oficial Mexicana, que regula el uso de antimicrobianos en el cultivo de crustáceos en la República Mexicana.

[8] Vandenberghe J., Verdonck L., Robles Arozarena R., Rivera G., Bolland A., Balladares M., Gómez Gil B., Calderon J., Sorgeloos P., Swings J. (1999). "Vibrios associated with *Litopenaeus vannamei* larvae, postlarvae, broodstock, and hatchery probionts". Appl. Environm. Microbiol. 65: 2592-2597.

[9] Aguirre Guzmán, G., Vázquez Juárez R., Ascencio F. (2001). "Differences in the susceptibility of American white shrimp larvae substages (*Litopenaeus vannamei*) to four vibrio species". J. Invert. Pathol. 78: 215-219.

[10] Lightner, D.V. (1996). "A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp". World Aquaculture Society, Baton Rouge: 138.

[11] Hampton R., Ball E., De Boer S. (1990) Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens. A laboratory manual. USA: APS Press, 389.

[12] Barbas III C. F., Burton D. R., Scott J. K., Silverman G. J. (2001). Phage Display. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York: Cold Spring Harbor, 23-32.

[13] Dorsch M., Lane D., Stackerbrandt E. (1992). "Towards a phylogeny of the genus *Vibrio* based on 16S rRNA sequences". Int. J. Syst. Bact. 42: 58-63.

[14] Thompson F. L., Iida T., Swings J. (2004). "Biodiversity of *Vibrios*. Microbiol". Mol. Biol. Rev. 68: 403-431.

[15] Phianphak W., Rengpipat S., Rukpratanporn S., Longyant S., Chaivisuthangkura P., Sithigorngul W., Sithigorngul P. (2005). "Production of monoclonal antibodies for detection of *Vibrio harveyi"*. Dis Aquat Organ. 63(2-3):161-8.

[16] Svendsen L., Crowley A., Ostergaard L. H., Stodulski G., Hau J. (1995). "Development and comparison of purification strategies for chicken antibodies from egg yolk". Lab. Anim. Sci. 45(1): 89-93.

[17] Czerwinnski, M., Siemszko, D., Siegel, D. L., Spitalnik, S. L. (1998). "Only selected light chains combine with a given heavy chain to confer specificity for a model glycopeptide antigen". J. Immunol. 160: 4406.

ROLE OF DNA POL-I AND DNA POL-III IN ALTERNATIVE EXCISION REPAIR (AER) OF DEAMINATED DNA BASES IN *Bacillus subtilis*

(Papel de DNA Pol-I y DNA Pol-III en la remoción de bases desaminadas mediante la ruta de reparación por escisión alternativa (AER) de *Bacillus subtilis*)

Pedro Luis Vargas-Arias [a]*, Victor Manuel Ayala-García [a], Mario Pedraza-Reyes [a].

[a]Departamento de Biología. División de Ciencias Naturales y Exactas. Universidad de Guanajuato

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: pedrama@ugto.mx

Área del Conocimiento: Biología Molecular

ABSTRACT
Deamination of cytosine, adenine, and guanine, a reaction that can occur in a spontaneous manner and at a physiologically significant rate, generates the analogue bases uracil, hypoxanthine and xanthine, respectively. These base analogs, have pairing specificities different from the original ones, therefore, if left unrepaired, these lesions are not only mutagenic but also potentially lethal. To avoid these noxious effects, cells possess excision repair pathways that are highly conserved in all three domains of life. Recent results from our laboratory revealed that YwqL from *B. subtilis*, an orthologous protein of *E. coli* endonuclease V (Nfi), was able to catalyze an incision event in the second phosphodiester to the 3´ end of a deaminated base. The downstream steps involved in this alternative repair pathway (AER) are currently unknown; therefore, the present work is aimed to investigate whether DNA Pol-I and/or DNA Pol-III, encoded by *pol*A and *pol*C genes, are involved in this repair mechanism. To this end, we have generated gene constructs to overexpress *polA* and *polC* from *B. subtilis* in *E. coli*. The recombinant enzymes purified by metal affinity chromatography will allow us to confirm or rule out the participation of in the alternative excision repair event initiated by YwqL.

Keywords: *Bacillus subtilis*, Base deamination, DNA repair

RESUMEN
La desaminación de citosina, adenina y guanina, una reacción que puede ocurrir de manera espontánea a una tasa fisiologicamente considerable, genera las bases análogas uracilo, xantina e hipoxantina, respectivamente. Éstas bases análogas tienen apareamiento específico diferente a las originales; por lo tanto sin son dejadas sin reparar, estas lesiones no sólo son mutagénicas sino también potencialmente letales. Las células poseen mecanismos, altamente conservados en los tres dominios de la vida, para eliminar estos análogos mutagénicos. Resultados recientes de nuestro laboratorio revelaron que YwqL de *Bacillus subtilis*, una proteína ortóloga a la endonucleasa V (Nfi) de *E. coli*, mostró capacidad de catalizar un evento de inscisión en el segundo enlace fosfodiéster en el extremo 3’ de una base desaminada. Los eventos posteriores a este evento incisión son actualmente desconocidos, por lo que en el presente trabajo se analizará si la DNA Pol-I y/o DNA Pol-III, codificados por los genes *pol*A y *pol*C, están involucradas en este mecanismo de reparación. Para tal fin, hemos generado construcciones

genéticas para sobreexpresar a *pol*A y *pol*C de *B. subtilis* en *E. coli*. Las enzimas recombinantes, purificadas por cromatografía de afinidad metálica, nos permitirán confirmar o descartar su participación en el evento de reparación por escisión alternativa iniciada por YwqL.

Palabras Clave: *Bacillus subtilis*, desaminación de bases, reparación de DNA

INTRODUCCIÓN

El mantenimiento de la estabilidad genética requiere no sólo un mecanismo extremadamente fiel para la replicación del DNA, sino también de mecanismos para la reparación de las lesiones espontáneas que se producen continuamente en el DNA. La mayoría de estos cambios en el DNA son temporales porque se corrigen inmediatamente por un conjunto de procesos que se conocen colectivamente como la reparación del DNA [1].

Las células pueden reparar el daño y restaurar el genoma a su estado normal físico y funcional, además pueden tolerar lesiones de tal manera que puedan reducir sus efectos letales. Una de las principales funciones de la reparación del DNA es la prevención de las mutaciones, las cuales pueden tener consecuencias fenotípicas significativas [2].

Gran parte de la totalidad de los daños al DNA afectan la estructura primaria de la doble hélice, es decir, se ve afectado a nivel químico, lo que ocasiona modificación en de las bases o la incorporación de aductos voluminosos. La desaminación de bases ocurre de manera espontánea, generando lesiones altamente mutagénicas tales como uracilo, xantina e hipoxantina. Los altos niveles celulares de éstas lesiones son incrementadas cuando las células son expuestas a agentes como radiación ionizante, reactivos oxido-reductores, ácido nitroso, entre otros [3]. Estas lesiones, generalmente, son procesadas por el sistema de reparación por escisión de bases o BER, sin embargo, en estudios recientes realizados en *E. coli* se identificaron rutas alternativas de escisión, en las que se ve involucrado un único corte aledaño a la base dañada o alterada en el DNA. Específicamente se identificó a una endonucleasa del tipo V, codificada por el gen *nfi*, capaz de procesar no solo las distintas bases desaminadas, sino también otros sustratos tales como bases mal apareadas, estructuras flap, residuos de urea, desoxi-xantina y sitios AP [4, 5].

Recientemente en nuestro laboratorio se demostró que la interrupción de *ung*, el gen codificante de la única uracil-DNA-glicosilasa en *Bacillus subtilis*, incrementó discretamente la frecuencia de mutación a rifampicina, sugiriendo que rutas de reparación adicionales contrarrestan los efectos mutagénicos del uracilo en este microorganismo. La pérdida de YwqL (un homologo a Nfi de *E. coli*) incrementó la frecuencia de mutación de la mutante nula en *ung*, sugiriendo que Ung y YwqL reducen los efectos mutagénicos de la desaminación de bases [6].

Se demostró además que en *E. coli*, Endo V es capaz de catalizar la ruptura del segundo enlace fosfodiéster de la base dañada, generando los extremos 3'-OH y 5'-fosfato terminal. Para *E.* coli fue propuesto previamente que la actividad de la exonucleasa III ó Xth y la subsecuente acción de la DNA-polimerasa I y la DNA-ligasa podrían estar involucradas [7].

La DNA polimerasa I (PolA) es un componente esencial de los sistemas de reparación de DNA en muchos organismos. En *E. coli* se ha demostrado que PolI posee actividad editora 3'-5' exonucleasa, indispensable para la correcta adición de nucleótidos [8]. En *B. subtilis*, la DNA-polimerasa III (Pol C), codificado por el gen *pol*C, al tratarse de la polimerasa replicativa de todo el genoma, es quien está dotada de esta actividad editora [9]. Por otro lado, la DNA polimerasa I, codificada por al gen *pol*A en *B. subtilis* se le ha atribuido un papel en la síntesis de translesión mediada por otras proteínas de la familia de las Y- DNA Polimerasas [10].

La endonucleasa V, en *E. coli*, no remueve la lesión únicamente inicia la reparación y es semejante al mecanismo de iniciación al descrito para la ruta de reparación de bases erróneamente apareadas (MMR), en el cual se demostró que la actividad de 3'-5' exonucleasa, DNA-polimerasa y DNA-ligasa para son necesarias para completar la reparación [3]. Esta homología en el mecanismo puede conservarse en *Bacillus subtilis*. Se ha demostrado que YwqL inicia la reparación; sin embargo, los factores que completan esta ruta de reparación alternativa son todavía desconocidos. Se ha propuesto que una actividad de "flap" endonucleasa o una 3'-5' exonucleasa, seguidas de una DNA-Polimerasa y DNA-ligasa [6] pueden participar en esta reacción. En el presente trabajo se investigará si las DNA polimerasas PolA y PolC de *B. subtilis* pueden participar en este mecanismo.

METODOLOGÍA

Diseño y construcción de plásmidos para sobreexpresar a polA y polC - El marco de lectura abierto del gen *pol*A (2643 pb) fue amplificado mediante PCR empleando los primers 5'-GCGGATCCACGGAACGAAAAAAATTA-3' (directo) y 5'-GCGGTACCTTTCGCATCGTACCAAGA-3' (reverso) (sitios de restricción para *Bam*HI y *Kpn*I subrayados); para el gen *pol*C (4314 pb) se emplearon los primers 5'-GCCATATGGAACAGTTATCAGTAAAC-3' (directo) y 5'-GCCTCGAGTTAGAACAGTGACAATTG-3' (reverso) (sitios de restricción para *Nde*I y *Xho*I). Dichas reacciones se realizaron empleando Vent® (New England Biolabs) DNA polimerasa y DNA genómico de *Bacillus subtilis* 168.

Los productos de PCR fueron ligados en el vector de mantenimiento pJET1.2/Blunt, para ambos casos, y propagados en células de *E. coli* DH5α crecidas en placas de medio LB suplementado con ampicilina (50 µg/mL). Se designó a la cepa con la construcción pJET1.2/blunt-*pol*A como PERM1337. La verificación de la construcción se realizó por restricción con las enzimas apropiadas. El fragmento que abarca el marco de lectura abierto de *pol*A fue cortado con las enzimas *Bam*HI y *Kpn*I**,** purificado y posteriormente clonado en el vector de expresión pQE30 en los mismos sitios. Con esta construcción, que añade una etiqueta de 6 His, se transformaron células competentes de *E. coli* XL10-gold seleccionadas por resistencia en placas de medio LB suplementado con ampicilina (100 µg/mL) y kanamicina (50 µg/mL). La corroboración de la construcción se hizo por restricción, obteniendo la cepa *E. coli* PERM1367.

Inducción de la síntesis de la proteína recombinante PolA - Con la finalidad de sobreexpresar *pol*A y evaluar la producción de la proteína recombinante His_6-PolA (~99 kDa), se dispuso de 4 cultivos independientes a los que se les añadió IPTG como inductor empleando concentraciones de 0.10, 0.25 0.50 y 1.00 mM y un cultivo control sin inducir, fueron incubados por 2 horas a 37 °C. Las células fueron colectadas por centrifugación y resuspendidas en buffer de lisis (Tris-HCl 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM, 0.03 % de tween 20 y 5 mM de DTT, pH 7.5). Las células se rompieron por sonicación y se recuperó el extracto libre de células y la pastilla con los restos celulares, respectivamente,

resuspendiendo ésta última en buffer de lisis. Se analizaron ambas fracciones (soluble e insoluble) por SDS-PAGE al 8%.

Purificación de la proteína recombinante PolA – Una colonia de la cepa PERM1367 fue crecida en 50 mL de medio LB suplementado con los respectivos antibióticos e incubado a 37ºC hasta densidad óptica de 0.5, una vez alcanzada dicha densidad, se adicionó IPTG a una concentración final de 0.5 mM, incubando nuevamente por 2 horas para inducir la expresión de *polA*. El cultivo fue tratado como se indica lineas arriba y recuperado el sobrenadante. Una columna cargada con resina Ni-agarosa, previamente equilibrada con buffer de lisis fue el soporte para la purificación de PolA, la cual fue lavada con 500 mL de buffer de lavado (Tris-HCl 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 50 mM, 0.03 % de tween 20 y 5 mM de DTT, pH 7.5). Se colectaron fracciones del volumen no unido a la columna, del lavado y de las eluciones realizadas con buffer de elución (Tris-HCl 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 300 mM, 0.03 % de tween 20 y 5 mM de DTT, pH 7.5), además de una fracción de la fase insoluble. Las fracciones fueron analizadas por SDS-PAGE al 8 %.

Verificación de la actividad polimérica de la DNA-polimerasa I (PolA) – El ensayo de extensión se realizó empleando los primers 5'-CGCAGCCCACCTGCCCACCTAACT-3' (cebador) y 5'-CCTTGGCACTAGCGCAGGGCCAGTTAGGTGGGCAGGTGGGCTGCG-3' (templado). El oligonucleótido cebador fue marcado en el extremo 5' con [γ-^{32}P]ATP usando polinucleótido cinasa (PNK). El primer marcado radiactivo se hibridó con el templado respectivo calentando a 95 ^{o}C durante 5 minutos, disminuyendo gradualmente la temperatura hasta 25^{o}C.

Se prepararon mezclas de reacción de 20 µL conteniendo 2 µL del ds-DNA marcado previamente, 2 µL de buffer de reacción 10X, 0.2 µL de BSA 100X, 0.5 µL de dNTP's 1mM [10] con volúmenes variables independientes de la proteína purificada His$_6$-PolA (1, 3 y 5 µL), empleando agua libre nucleasas cbp 20 µL. Como control negativo se preparó una mezcla de reacción carente de His$_6$-Pol. Las mezclas se incubaron a 37ºC por 30 minutos. Una reacción adicional control positivo fue preparada empleando Pfu DNA-polimerasa 1 U, la cual se incubó a 72ºC por 30 minutos. Transcurrido este tiempo se añadió a cada mezcla de reacción 20 µL de buffer de paro (EDTA 50mM, 95% formamida, 0.01% de azul de bromofenol y 0.01% de xilencianol). Las mezclas se calentaron 5 minutos a 95ºC y se analizaron por electroforesis desnaturalizante en un gel de secuenciación al 8%. Los productos radiactivos separados en el gel se analizaron en un procesador de imágenes.

Remoción de bases desaminadas - Se emplearon los primers con la secuencia 5'-GCACCGGACUGAGGCGACG -3' (cebador) y 5'- CGTCGCCTCAGTCCGGTGC -3' (templado). Se preparó una mezcla de reacción además de controles positivo y negativo empleando el "primer" cebador que contiene la lesión uracilo el la posición 10; el "primer" fue marcado radiactivamente en el extremo 5' con [γ-^{32}P]ATP e hibridado con el templado calentando a 95°C. El ds-DNA obtenido fue empleado como sustrato en un ensayo de remoción de bases desaminadas iniciado por la proteína His$_6$-YwqL [10]. Terminada la reacción, los fragmentos fueron purificados y precipitados. Estos fragmentos fueron posteriormente utilizados como sustrato y mezclados en reacciones de 20 µL (como se describió anteriormente) con ~0.5 µg de His$_6$-PolA purificada. Las mezclas de reacción fueron analizadas por electroforesis desnaturalizante en un gel de secuenciación al 8% y posteriormente analizado en un procesador de imágenes moleculares.

RESULTADOS

Obtención de construcciones para expresar a polA y polC.

Mediante PCR se amplificaron los marcos de lectura abiertos de *pol*A (2643 pb) y *pol*C (4314 pb) (Fig. 1). Luego de purificarlos en geles de agarosa de bajo punto de fusión, ambos fragmentos se clonaron en el vector pJET1.2 y las construcciones se replicaron en la cepa *E. coli* DH5α. A partir de este punto, el trabajo se centró en *polA*, cuyo marco de lectura abierto se liberó de la construcción pJET1.2-*polA* y se subclonó en el vector de expresión pQE30 entre los sitios *Bam*HI y *Kpn*I generando la construcción pQE30-*polA*, la cual se introdujo por transformación a células competentes de *E. coli* XL-10 gold, generando la cepa PERM1367. La obtención de la construcción correcta se corroboró mediante análisis de restricción de minipreparaciones de DNA.

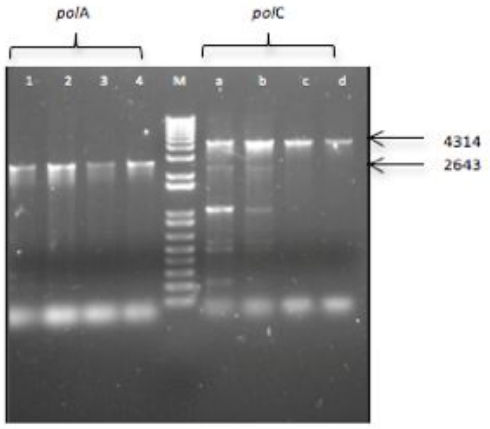


Figura 1.- Amplificación por PCR de los fragmentos polA (1, 2, 3, 4) y polC (a, b, c, d) por gradiente de temperatura, empleando Vent DNA polimerasa (New England Biolabs) a 55 °C (1, a), 60 °C (2, b), 65 °C (3, c), 70 °C (4, d)

***Sobreexpresión, purificación* y actividad de His_6-PolA.**

El análisis de la inducción de la expresión de *polA* en la cepa *E. coli* PERM1367 reveló que la adición de concentraciones crecientes de IPTG (0.1 a 1 mM) promovió la síntesis diferencial de una proteína con una masa molecular cercana a 99 kDa, que corresponde con el peso molecular predicho para PolA. En esté análisis también se observó que la proteína recombinante se mantiene principalmente en la fracción soluble. A continuación la proteína His_6-PolA se sujetó a purificación mediante cromatografía de afinidad metálica. Como se muestra en la Figura 2, se obtuvieron fracciones de la enzima con un alto nivel de pureza las cuales se mezclaron con glicerol (50%; V/V) y se almacenaron a -20°C.

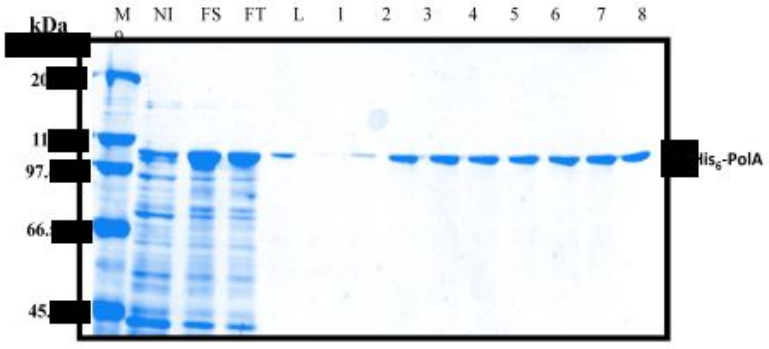


Figura 2.- Análisis electroforético de la purificación dde His6-PolA. La fracción libre de células (FS) de la cepa de E. coli 1367, inducida con IPTG, se aplicó a una columna de Ni-Agarosa. La columna se lavó con 500 mL de buffer de lavado y la proteína unida a la resina se eluyó con imidazol (300 mM), colectándose distintas fraciones (1-9) las cuales se analizaron en un gel de poliacrilamida al 8%. M, marcadores de PM; NI, control no inducido; FS, control fracción soluble; FT, fracción no unida a la columna; 1-9, fracciones purificadas.

Los ensayos de polimerización de DNA realizados mostraron que las fracciones de la enzima His_6-PolA purificadas en la columna de Ni-Agarosa fueron capaces de extender el primer radiactivo, adicionando nucleótidos hasta el final de la cadena templado. Esta capacidad de extensión también se observó con control positivo realizado con la enzima Pfu, la cual no generó subproductos aparentes (Fig. 3).

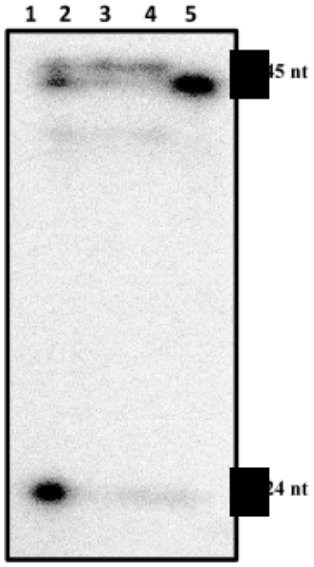


Figura 3.- Capacidad de polimerización de His6-PolA. La fracción 7 purificada fue empleada en cantidades variables de 1, 3 y 5 µL (carriles 2, 3 y 4, respectivamente). Los productos de extensión se separaron en un gel de secuenciación desnaturalizante y se analizaron en un procesador de imágenes digital. Carril 1, control sin enzima; carril 5, control positivo empleando la enzima Pfu en lugar de His6-PolA.

Participación de PolA *en la reacción de reparación iniciada por* YwqL

En un ensayo preliminar, el DNA radiactivo conteniendo un uracilo en la posición 10, fue incubado con His_6-YwqL y el producto de la incisión generado por la enzima de reparación se ofreció como substrato a la proteína His_6-PolA para analizar la capacidad de polimerizar dicho producto. En una mezcla de reacción, se omitió a la DNA polimerasa y la reacción problema se realizó por duplicado. El análisis de los productos generados por His_6-PolA mostraron un aumento en el tamaño del primer radiactivo de 9 a 19 nt; lo cual no se observó en el control negativo ya que la

marca permaneció en la posición correspondiente al tamaño del primer (Resultados no mostrados).

DISCUSIÓN

DNA-Pol I en *E.coli* juega un papel importante en la remoción de bases desaminadas mediante el sistema de reparación por escisión alternativa (AER) pues está dotada de actividad editora 3'- 5' exonucleasa, en *Bacillus subtilis*, DNA-Pol III es quien realiza esta función, sin embargo, el complejo encargado de la reparación puede estar integrado, además, por DNA-PolA.

Estudios recientes en nuestro laboratorio [12, 13] confirmaron la actividad catalítica de YwqL, la cual inicia la reparación al realizar un corte en nucleótidos aledaños a la base desaminada. Se ha propuesto la participación de una actividad de una "Flap" endonucleasa o una 3'-5' exonucleasa para remover los nucleótidos cortados así como la participación subsecuente de la DNA-polimerasa y una DNA-ligasa [12, 13].

La obtención de una cepa recombinante que genera cantidades abundantes de His_6-PolA, la cual, purificada a homogeneidad mantuvo su capacidad de síntesis de DNA, nos permitió, en un ensayo preliminar, mostrar su capacidad de procesar los productos intermedios de la reparación de bases desaminadas iniciada por YwqL. En estudios futuros se deberán repetir estos experimentos para corroborar su reproducibilidad y poder proponer a la DNA-PolA como una enzima involucrada en la incorporación de nucleótidos en la ruta de reparación alternativa medida por YwqL.

CONCLUSIONES

Se obtuvo una cepa de *E. coli* capaz de sobreexpresar y exacerbar la síntesis de la proteína recombinante His_6-PolA de *B. subtilis*. Se diseñó un protocolo para purificar a homogeneidad la enzima His_6-PolA, la cual mostró actividad de DNA polimerasa *in vitro*. Estudios preliminares sugieren que His_6-PolA es capaz de procesar los intermediarios de la reparación iniciada por YwqL.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por el CONACyT (Subsidios 205744 and 221231) y la Universidad de Guanajuato (subsidios DAIP-324-2013 y 602-2015). Pedro L. Vargas agradece la beca de licenciatura otorgada por la Universidad de Guanajuato y al equipo de trabajo del Laboratorio de Mutagénesis Reparación de ADN del Departamento de Biología en la Universidad de Guanajuato, a cargo del Dr. Mario Pedraza Reyes.

REFERENCIAS

[1] Alberts B, Johnson A, Lewis J. (2002). "Molecular Biology of the Cell". 4th edition. New York: Garland Science.

[2] Friedberg E. C. (2006). "DNA Excision Repair Pathways". DNA repair and mutagenesis, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, DC. 249-250.

[3] Yoke W Kow. (2002). "Repair of deaminated bases in DNA". Free Radical Biology & Medicine, Vol. 33, No. 7, 886-893.

[4] Demple, B., and S. Linn. (1982). "On the recognition and cleavage mechanism of *Escherichia coli* endodeoxyribonuclease V, a possible DNA repair enzyme". J. Biol. Chem. 257: 2848–2855.

[5] Guo, G., Y. Ding, and B. Weiss. (1997). "*nfi*, the gene for endonuclease V in *Escherichia coli* K-

12". J. Bacteriol. 179:310–316.
[6] López-Olmos Karina. (2012). "Roles of Endonuclease V, Uracil-DNA Glycosylase, and Mismatch Repair in *Bacillus subtilis* DNA Base-Deamination-Induced Mutagenesis". J. Bacteriol. 194:243-252.
[7] Friedberg E. C. (2006). "Alternative excision repair". DNA repair and mutagenesis, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, DC. 379-388.

[8] Michael J. Moser, William R. Holley, Aloke Chatterjee and I. Saira Mian. [1997]. "The proofreading domain of *Escherichia coli* DNA polymerase I and other DNA and/or RNA exonuclease domains". Nucl. Acids Res. (1997) 25 (24):5110-5118.
[9] Akashi M. And Yoshikawa H. (2013). "Relevance of GC content to the conservation of DNA polymerase III/mismatch repair system in Gram-positive bacteria". Front. Microbiol. 4:266.
[10] Le Chatelier, E., Bécherel, O. J., d'Alençon, E., Canceill, D., Ehrlich, S. D., Fuchs, R. P. P. (2004). "Involvement of DnaE, the second replicative DNA polymerase from *Bacillus subtilis*, in DNA mutagenesis". J. Biol.Chem. 279, 1757–1767.
[11] Sawami Kobayashi, Michael R. Valentine, Phuong Pham, Mike O'Donnell and Myron F. Goodman. (2002). "Fidelity of *Escherichia coli* DNA Polymerase IV". J. Biol. Chem, 277, 34198-34207.
[12] Ayala-García Victor Manuel. (2015). "Caracterización bioquímica y fisiológica de la ruta de reparación por escisión alternativa dependiente de la enzima YwqL de *Bacillus subtilis".* (Tesis doctoral. Departamento de Biología, Universidad de Guanajuato).
[13] Ayala-García Victor Manuel. (2012). "Expresión heteróloga y papel de endonucleasa V (YwqL) en la resistencia de esporas de *Bacillus subtilis* al daño del ADN inducido por la desaminación (Tesis de maestría. Departamento de Biología, Universidad de Guanajuato).

CLONING AND HETEROLOGOUS EXPRESSION OF A NOVEL AND DIVERSE PROTEIN FROM THE RICKETTSIA *Anaplasma marginale*

(Clonación y expresión heteróloga de una proteína nueva y diversa de la rickettsia *Anaplasma marginale)*

María Fernanda Guerrero Benítez[b], Concepción Sosa García[b], Itzel Amaro Estrada[a*+], Rosa Estela Quiroz Castañeda[a], Sergio D. Rodríguez Camarillo[a]

[a] CENID Parasitología Veterinaria, INIFAP, Carretera Federal Cuernavaca - Cuautla No 8534, Col. Progreso, Jiutepec, Morelos, 62550, México.
[b] Estudiante de Ingeniería en Biotecnología, UPEMOR, Boulevard Cuauhnáhuac #566, Col. Lomas del Texcal, Jiutepec, Morelos, 62550, México.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: amaro.itzel@inifap.gob.mx

Área del Conocimiento: Biología molecular.

ABSTRACT
Anaplasma marginale is an obligate intracellular pathogen of cattle. This rickettsia is the causal agent of bovine anaplasmosis a disease distributed worldwide. In Mexico, molecular and serologic studies have shown high prevalence of anaplasmosis along the Gulf and Pacific States. Anaplasmosis outbreaks can lead to the death of susceptible cattle; additionally, it is the cause of weight gain losses, abortions, loss of milk production and treatment costs. A number of *A. marginale* strains have been isolated from cattle of different geographical regions, several of which have genetic variations that complicate disease control programs. In Mexico there are no commercial vaccines available against *A. marginale* infection; furthermore this pathogen makes use of several mechanisms of immune evasion some of which remain unclear. Efforts have been made to elucidate relevant molecules either for vaccine design or in host-pathogen interactions. *am955* is a gene reported in the *A. marginale* genome encoding for a serine/threonine-rich protein that includes highly immunogenic B-cell epitopes as determined by bioinformatics analysis. Blood samples from field-infected cattle from different geographical regions of Mexico were used to extract genomic DNA. *am955* was amplified from gDNA by PCR using specific primers. Two isoforms of *am955* of different lengths were identified. In this work we describe the cloning and expression of the short-length isoform of *am955*. Primers were designed such that restriction enzyme sites were included into the *am955* product, amplicons were digested and ligated in pET22b(+) plasmid. IPTG-inducible expression was carried out in *E. coli* BL21(DE3). The recombinant protein consists of 91 amino acid residues plus a C-terminal 6xHis tag for purification. Overexpressed protein Am955 was identified by immunodetection.

Keywords: Bovine anaplasmosis; *Anaplasma marginale*; Recombinant protein; Rickettsia.

RESUMEN
Anaplasma marginale es una bacteria intracelular obligada, patógena para el ganado bovino. Esta rickettsia es el agente causal de la anaplasmosis bovina, una enfermedad distribuida en varias regiones

del mundo. En México, estudios moleculares y serológicos revelan altas prevalencias de la enfermedad en los estados costeros del país. Brotes de anaplasmosis pueden ocasionar la muerte del ganado susceptible; además, es la causa de pérdida de peso, baja producción de leche y genera gastos adicionales por los costos del tratamiento. En varias regiones geográficas se han identificado cepas de *Anaplasma marginale,* las cuales tienen variaciones genéticas entre sí y cuya diversidad limita el uso de vacunas como estrategia de control de la enfermedad*;* en México, no existen vacunas comerciales contra la infección por *Anaplasma marginale*. Además, mediante mecanismos aun no descritos, este patógeno evade el sistema inmune del hospedero. Se han realizado esfuerzos para identificar moléculas relevantes en la interacción patógeno-hospedero, así como en el diseño de vacunas, sin embargo, aún es necesario realizar estudios adicionales. El gen *am955* ha sido identificado en el genoma de *Anaplasma marginale* cepa St. Maries, codifica para una proteína hipotética rica en serinas y treoninas e incluye epítopos B predichos por análisis bioinformáticos. Muestras de sangre de bovinos infectados naturalmente de diferentes regiones geográficas del país fueron utilizadas para aislar ADN genómico y realizar la amplificación del gen por PCR. Se identificaron dos isoformas de *am955* de diferente longitud. En este trabajo se reporta la clonación y expresión de la versión corta del gen. Se diseñaron oligonucleótidos para agregar sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción y poder ligar los fragmentos en el plásmido pET-22b(+). Se llevó a cabo la expresión de la proteína, induciendo con IPTG en células *E. coli* BL21(DE3). La proteína recombinante esperada consiste de 91 residuos más una etiqueta de 6 histidinas en el carboxilo terminal. La sobreexpresión de Am955 fue monitoreada por inmunodetección.

Palabras Clave: Anaplasmosis bovina; *Anaplasma marginale*; Proteínas recombinantes; Rickettsias

INTRODUCCIÓN

México tiene una población aproximada de 32 millones de cabezas de ganado, de las cuales aproximadamente 29 millones corresponden a ganado de carne; sin embargo, estas cifras no son suficientes para cubrir la necesidades de consumo, y es necesaria la importación de carne. Las enfermedades que afectan al ganado bovino son la principal razón de este déficit, siendo la anaplasmosis bovina una de las enfermedades de importancia en el sector ganadero. Esta enfermedad es causada por *Anaplasma marginale,* una bacteria Gram-negativa, intraeritrocítica obligada que se aloja en el borde interno de los eritrocitos y cuando infecta a un animal susceptible causa fiebre, pérdida de apetito y eventualmente la muerte del bovino [1].

El uso de vacunas contra *Anaplasma* se encuentra en etapa de evaluación experimental [2], sin embargo, su desarrollo es una tarea difícil porque este microorganismo tiene un alto grado de variabilidad y diversidad genética, lo que ha dificultado su control. La variación antigénica podría ser una estrategia de evasión del sistema inmune de los patógenos, lo que les permite escapar de la inmunidad inicial de los hospederos contra los antígenos dominantes y así continuar con una nueva infección hasta que se genere una nueva respuesta frente a las variantes recién generadas. Se ha propuesto la formulación de vacunas recombinantes basadas en proteínas de la rickettsia [3, 4], sin que hasta ahora se tengan resultados satisfactorios, por lo que se buscan nuevas alternativas.

El gen *am955*, identificado en el genoma reportado de la cepa St. Maries [5] codifica para una proteína no estudiada de 132 aminoácidos, rica en serinas y treoninas, lo que sugiere una posible función de adhesión hacia moléculas del hospedador. Al amplificar el gen *am955* a partir de ADN genómico,

aislados mexicanos de diferentes zonas geográficas, se observó que existe diversidad en el tamaño del amplicón, a la secuenciación de los productos además de la diferencia en el tamaño se identificaron mutaciones silenciosas y una serie de cambios que se reflejan en la secuencia de aminoácidos. Se identificaron 24 mutaciones no sinónimas entre las cepas analizadas y se observaron deleciones de hasta 56 pb, que al cambiar el marco de lectura provocan la generación de un codón de paro prematuro, dando lugar a una proteína más corta. Derivado de este acortamiento, estos aislados no presentan repeticiones en tándem contenidos en el resto de la secuencia. Es importante determinar si la diversidad genética de *am955* es un ejemplo de evolución reductiva en la rickettsia o bien una estrategia de variación antigénica como mecanismo de evasión del sistema inmune desarrollado por el patógeno. Además de evaluar la utilidad de esta proteína como inmunógeno.

Para ello, en este trabajo se realizó la clonación y expresión de la variante corta de Am955 en un sistema de expresión bacteriano.

METODOLOGÍA

Obtención de ADN

A partir de una muestra de sangre del Banco de Germoplasma de la unidad de Anaplasmosis del Centro Nacional de investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria (CENID-PAVET) infectada con la cepa Aguascalientes Mex-01-001-01 de *Anaplasma marginale*, se aisló ADN genómico mediante el kit comercial Ultra Clean DNA Blood Spin Kit (MO BIO Laboratories, Inc.) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para comprobar la presencia e integridad del DNA genómico obtenido, la muestra se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1% a 100 V por 45 minutos.

Amplificación por PCR del gen am955

Tomando como templado el ADN genómico obtenido, se realizó la amplificación del gen por PCR usando oligonucleótidos específicos para *am955*, diseñados a partir del genoma de *Anaplasma marginale* cepa St. Maries ya reportado en el GenBank. Las condiciones de la reacción fueron: un primer paso de desnaturalización a 95°C por 5 minutos seguido de una segunda desnaturalización a la misma temperatura por 40 segundos, temperaturas de alineamiento de 54 °C por 40 s., para dar paso a la extensión de 72°C por 30 s., por 35 ciclos, y finalmente una extensión de 72°C por 5 minutos. El producto de PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1% a 100 V por 45 min., el tamaño de cada fragmento se comparó con un marcador comercial de peso molecular de 100 pb (Gene Ruler™, Thermo Scientific). El gel se visualizó en el fotodocumentador Gel Logic 1500 con el programa Kodak MI.

Clonación del gen am955

El producto de obtenido en el paso anterior fue utilizado como templado para una segunda reacción de PCR, utilizando oligonucleótidos que incluían los sitios de restricción Nco-I y Xho-I. Los amplicones fueron visualizados en un gel de 1% agarosa y purificados por el paquete comercial Wizard ®SV Gel and PCR Clean-up System (Promega). La concentración de la muestra fue determinada con un equipo Nanodrop 1000 Thermo Scientific Spectrophotometer. El fragmento purificado y el plásmido pET-22b(+) (NOVAGEN) fueron digeridos con las enzimas de restricción Nco-I HF™ y Xho-I (New England Biolabs) durante 4 horas a 37°C. Las muestras fueron purificadas y utilizadas para llevar a cabo la reacción de ligación a 22°C utilizando una relación molecular 1:5 (plásmido:inserto). La ligación se utilizó para transformar células quimiocompetentes de la cepa One Shot® Mach1™ (Invitrogen™) de *E. coli,* las

células tranformadas se seleccionaron plaqueando las bacterias en medio LB-agar adicionado con ampicilina (100 µg/ml). Se eligieron colonias al azar para realizar PCR y verificar el tamaño de los insertos, aquellas que tuvieron el tamaño esperado fueron seleccionadas para producir plásmido y purificarlo por el kit GeneJet plasmid miniprep (Thermo Scientific). Los plásmidos obtenidos fueron utilizados en ciclos de secuenciación de Sanger para determinación de la composición nucleotídica del fragmento.

Expresión de proteína

La construcción verificada por secuenciación fue transformada por choque térmico en células quimiocompetentes *E. coli* One Shot® BL21(DE3) (Invitrogen™). Se analizaron diez colonias aisladas de cada construcción para realizar PCR de colonia utilizando los oligonucleótidos para amplificar *am955*. Se eligió una colonia positiva, a partir de la cual se cultivó un pre inóculo, al día siguiente se inocularon 10 ml de medio LB+Ampicilina (100 µg/ml) con los cultivos del día anterior y se crecieron a 37 °C, 200 rpm hasta alcanzar una OD_{600}=0.5, a este tiempo, se agregó IPTG a una concentración final de 1 mM IPTG. Los cultivos se mantuvieron a 37°C y agitación de 200 rpm durante 6 horas.

Inmunodetección

Los cultivos fueron centrifugados y los pellets se resuspendieron en 0.05 M Tris-HCl pH 8 y se agregó lisozima (1 mg/ml) incubando a 37°C durante 20 minutos, la fracción se clarificó por centrifugación y los sobrenadantes se utilizaron para realizar ensayos de Dot Blot. Sobre una membrana de nitrocelulosa se agregaron 5 µl de los extractos obtenidos, la membrana fue bloqueada con una solución TBS + 3% BSA durante 1 hora, después de este tiempo se agregó el anticuerpo primario anti-6His y un anticuerpo secundario conejo anti-ratón acoplado a fosfatasa alcalina ambos en dilución 1:2000. Después de 5 lavados con TBS-Tween 0.5%, la reacción colorimétrica se llevó a cabo exponiendo la membrana al substrato BCIP®/NBT (Sigma-Aldrich).

RESULTADOS

Se aisló ADN genómico de *Anaplasma marginale* de la cepa mexicana Aguascalientes, Aguascalientes Mex-01-001-01 para amplificar la versión corta del gen putativo *am955* de *Anaplasma marginale*. El análisis bioinformático de la secuencia con el programa TMHMM Server v.2.0 predice que no tiene hélices transmembranales y carece de péptido señal (SignalP).

A

Rango	Secuencia	Posición de inicio	Puntuación
1	QVSGVAQTSGRKRLTI	22	0.90
2	AVGWLHSRGFRTELIC	40	0.84
3	QKFSCDLNIPGCRQTN	70	0.83

B

Posición	Epítope	Puntuación
19	ASQQVSGVAQTSGRKR	0.775

Figura 1.- Predicción de epítopos B lineales. Panel A: Se muestran los resultados más significativos del análisis con ABCpred prediction. **Panel B**: BCPREDS B-cell epitope prediction server.

Así mismo, se analizó *in silico* la presencia de epítopos B lineales mediante los programas ABCpred prediction y BCPREDS con la herramienta B-cell epitope prediction server (Figura 1). El programa Psipred predijo que contiene 3 regiones alfa-hélices posicionadas en los aminoácidos 9-10, 42-45 y 50-64; 3 regiones beta plegada en las posiciones 26-28, 33-38 y 71-74.

Con los oligonucleótidos utilizados se obtuvo un amplicón de un tamaño aproximado de 350 pares de bases que corresponden a los 343 nucleótidos esperados. El producto de PCR fue utilizado como templado para realizar una reamplificación y agregar los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción (figura 2).

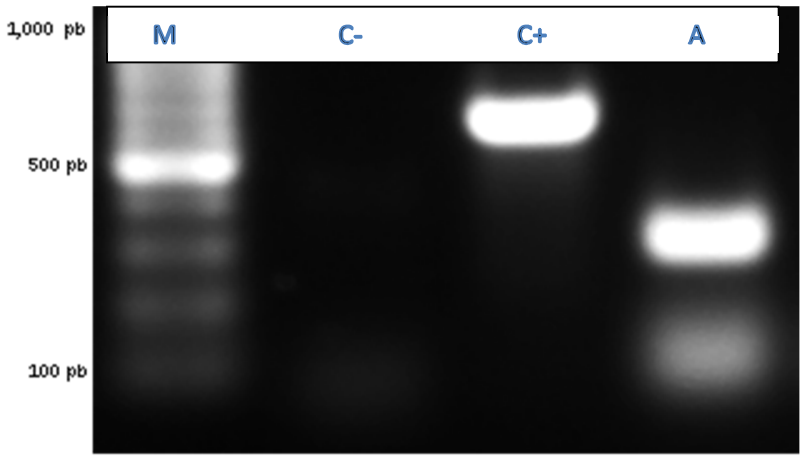


Figura 2.- Amplificación del gen *am955*. Productos de PCR obtenidos al utilizar oligonucléotidos para agregar sitios de restricción de las enzimas NcoI y NotI. **M**: DNA ladder 100 bp**, (C-):** Control Negativo, **(C+):** Control Positivo, **(A):** *am955* de la cepa Aguascalientes, Aguascalientes Mex-01-001-01.

Después de la inducción con IPTG, los cultivos se crecieron a 37°C con agitación de 200 rpm, la sobreexpresión de la proteína se observó por inmunodetección a partir de las 6 horas (figura 3), en este ensayo se utilizó un anticuerpo primario anti-6His y un anticuerpo secundario conejo anti-ratón acoplado a fosfatasa alcalina. Sin embargo, en análisis por SDS-PAGE no ha sido posible observar claramente la sobreexpresión de una proteína de tamaño correspondiente a Am955.

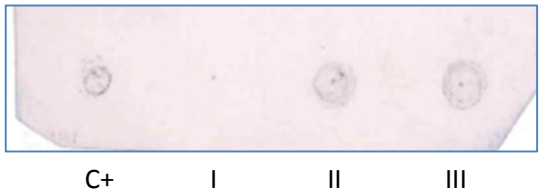


Figura 3.- **Inmunodetección de proteína sobreexpresada**. Dot Blot de extractos bacterianos de la cepa BL21 con la construcción. La inducción con IPTG se realizó cuando los cultivos alcanzaron una OD_{600}=0.5.**C+:** Proteína VirB3-6His, **I**: BL21+pET22b(+)+*am592* Cultivo no inducido, **II:**

BL21+pET22b(+)+*am592* Cultivo 6 horas post-inducción, **II:** BL21+pET22b(+)+*am592* Cultivo 8 horas post-inducción.

DISCUSIONES

El gen *am955*, presente en el genoma de *Anaplasma marginale* cepa St. Maries ha sido identificado en aislados mexicanos recolectados en brotes de anaplasmosis en varias regiones del país. Después de la amplificación y secuenciación del gen, se observó que existen dos isoformas con diferente longitud. Los análisis bioinformáticos predicen que la proteína codificada es una molécula expuesta en la superficie, sin regiones transmembranales y con regiones de relevancia antigénica. Sin embargo, no se tiene evidencia experimental de su funcionalidad en la bacteria y de la relevancia del dimorfismo en su ciclo de vida o en la interacción con el sistema inmune del hospedero. Derivado de esto, surge el interés por tener la proteína recombinante que permita llevar a cabo estudios posteriores para evaluar su importancia en la bacteria, determinar su localización y dilucidar la razón de su diversidad. En el sistema de expresión elegido se ha logrado la detección de una proteína con etiqueta de histidinas después dela inducción. Sin embargo, aún no ha sido posible identificarla en análisis por SDS-PAGE para determinar en cual fracción celular se encuentra, esto posiblemente se deba al bajo peso molecular que presenta (aproximadamente 10 kDa), por lo que es necesario explorar otras opciones de visualización, así como la optimización de las condiciones de expresión.

CONCLUSIONES

Se realizó el análisis bioinformático del gen *am955* de *Anaplasma marginale* y la proteína para la cual codifica. Se llevó a cabo la clonación de la variante corta del gen am955 en un plásmido de expresión. Se llevó a cabo la expresión heteróloga del gen *am955* en la cepa BL21(DE3) de *E. coli*.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado a través del proyecto SEP-CONACYT 168167 y del proyecto INIFAP, No. de SIGI: 1320382022.

REFERENCIAS

[1] M. Ristic and W. I. M. McIntyre, Eds., *Diseases of Cattle in the Tropics: Economic and Zoonotic Relevance*. Dordrecht: Springer Netherlands, 1981.

[2] S. D. Rodríguez Camarillo, M. A. García Ortiz, E. E. Rojas Ramírez, G. J. Cantó Alarcón, J. F. Preciado de la Torre, R. Rosario Cruz, J. A. Ramos Aragón, and R. Aboytes Torres, "*Anaplasma marginale* Yucatan (Mexico) Strain. Assessment of low virulence and potential use as a live vaccine.," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1149, pp. 98–102, Dec. 2008.

[3] P. S. Santos, A. A. S. Sena, R. Nascimento, T. G. Araújo, M. M. Mendes, J. R. S. Martins, T. W. P. Mineo, J. R. Mineo, and L. R. Goulart, "Epitope-based vaccines with the *Anaplasma marginale* MSP1a functional motif induce a balanced humoral and cellular immune response in mice.," *PLoS One*, vol. 8, no. 4, p. e60311, Jan. 2013.

[4] J. E. Lopez, G. H. Palmer, K. A. Brayton, M. J. Dark, S. E. Leach, and W. C. Brown, "Immunogenicity of *Anaplasma marginale* type IV secretion system proteins in a protective outer membrane vaccine.," *Infect. Immun.*, vol. 75, no. 5, pp. 2333–42, May 2007.

[5] K. A. Brayton, L. S. Kappmeyer, D. R. Herndon, M. J. Dark, D. L. Tibbals, G. H. Palmer, T. C. McGuire, and D. P. Knowles, “Complete genome sequencing of *Anaplasma marginale* reveals that the surface is skewed to two superfamilies of outer membrane proteins.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 3, pp. 844–9, Jan. 2005.

TRANSIENT EXPRESSION OF *GUS* REPORTER GENE IN GREEN MICROALGAE *Dunaliella tertiolecta* MEDIATED BY *Agrobacterium tumefaciens*

(Expresión transitoria del gen reportero *GUS* en la microalga verde *Dunaliella tertiolecta* mediada por *Agrobacterium tumefaciens*)

Claudia Desireé Norzagaray-Valenzuela[b*], Karla Denisse Luna-Avelar[a], Jorge Milán-Carillo[a,b], Cuauhtémoc Reyes-Moreno[a,b], Angel Valdez-Ortiz[a,b], Lourdes Janeth Germán-Báez[b+].

[a] Posgrado en Ciencia y Tecnología de Alimentos, FCQB, Universidad Autónoma de Sinaloa. Ciudad Universitaria, CP. 80300. Culiacán, Sinaloa, México.
[b] Programa Regional de Posgrado en Biotecnología, FCQB, Universidad Autónoma de Sinaloa. Ciudad Universitaria, CP. 80300. Culiacán, Sinaloa, México.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: ljgerman@uas.edu.mx

Área del conocimiento: Biología molecular.

ABSTRACT

Nowadays, there is an increasing interest in the use of microalgae for biotechnological applications. Since microalgae has the feasibility to be genetically modified and express heterologous genes opens up the possibility of enhancing the productivity of traditional algal compounds (lipids, pigments) and producing new bioactive products mainly recombinant proteins for industrial and pharmaceutical applications through genetic engineering tools. In this regard, *Agrobacterium tumefaciens*-mediated method represents a profitable way to introduce genes of interest using the T-DNA region. Additionally, the *gus* reporter gene is an instrumental tool for the development of co-cultures protocols for new species because of the high sensitivity of histochemical assay. Therefore, in the presented study we evaluated the transient *gus* gene expression in *D. tertiolecta* before setting a stable expression system of recombinant proteins. Microalgae cells were cultured on F/2 medium at 24°C in light (50 $m^{-2} \cdot s^{-2}$). Cell viability was measured using tripan blue dye exclusion method and genetic transformation was carried out using *A. tumefaciens* EHA105::pCAMBIA1304 strain. In order to determinate the best transformation protocol, the infection was done in both, liquid and solid medium. The co-culture was made at 25±1 °C for 48 h in dark. Transformation was verified measuring Gus activity by histochemical analysis and the efficiency was determined by the ratio between transformed cells and total cells. Results showed that the highest cell viability (86%) was reached at day 4 of culture. Transformation efficiency showed that the solid infection exhibited higher efficiency (68%) in comparison to liquid method (49%). Results corroborate that *gus* represents an useful reporter gene for heterologous expression system. Furthermore, solid infection method showed better transformation efficiency. Overall, results show the initial steps for the development of an efficient transformation protocol of *D. tertiolecta* using *A. tumefaciens*-mediated method.

Keywords: *Dunaliella tertiolecta*; transient expression; *gus* gen; *Agrobacterium tumefaciens.*

RESUMEN

Hoy en día, existe un gran interés en el uso de las microalgas para aplicaciones biotecnológicas. Desde que éstas presentan la capacidad de ser modificadas genéticamente y de expresar genes heterólogos, abrieron la posibilidad de mejorar la productividad de compuestos tradicionales en las microalgas (lípidos, pigmentos) y producir nuevos compuestos bioactivos, principalmente proteínas recombinantes, para sus aplicaciones industriales y farmacéuticas, a través de herramientas de ingeniería genética. En este sentido, el método que emplea *Agrobacterium tumefaciens* representa una forma viable para introducir genes de interés utilizando la región de ADN-T. Adicionalmente, el gen reportero *gus* es una herramienta fundamental para el desarrollo de protocolos de co-cultivos de nuevas especies, debido a la alta sensibilidad del ensayo histoquímico. En el presente estudio se evaluó la expresión transitoria del gen *gus* en *D. tertiolecta* previo al establecimiento de un sistema de expresión estable de proteínas recombinantes. Las microalgas fueron cultivadas en medio F/2 a 24 °C, con luz (50 $m^{-2} \cdot s^{-2}$). La viabilidad celular se determinó utilizando el método de exclusión con el colorante azul de tripán y la transformación genética se realizó utilizando la cepa EHA105::pCAMBIA1304 de *A. Tumefaciens*. Con el fin de determinar el mejor protocolo de transformación, se llevó a cabo el proceso de infección tanto en medio sólido como en líquido. El co-cultivo se llevó a cabo a 25 ± 1 °C durante 48 h en oscuridad. La transformación se verificó midiendo la actividad de GUS a través de un análisis histoquímico y la eficiencia fue determinada a través de la relación entre las células transformadas y las células totales. Los resultados mostraron que la viabilidad celular más alta (86%) se alcanzó al 4to día de cultivo. La eficiencia de transformación mostró que la infección en sólido presentó un valor más alto (68%) en comparación con el método líquido (49%). Los resultados corroboraron que el gen *gus* representa una herramienta útil para el desarrollo de sistemas de expresión heteróloga. Además, el método de infección en sólido mostró una mejor eficiencia de transformación. En general, los resultados muestran el paso inicial para el desarrollo de un eficiente protocolo de transformación estable de *D. tertiolecta* mediado por *A. tumefaciens*.

Palabras Clave: *Dunaliella tertiolecta*; Expresión transitoria; gen *gus*; *Agrobacterium tumefaciens.*

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha suscitado un enorme interés en las microalgas como un sistema de biorreactor para la obtención de compuestos de alto valor como proteínas, pigmentos, ácidos grasos y polisacáridos, que tienen un amplio rango de aplicaciones biotecnológicas. Debido a estas características, ha surgido la demanda por obtener cepas mejoradas que permitan mayores tasas de crecimiento y un mayor rendimiento de estos compuestos. Una alternativa para hacer esto posible es a través del uso de herramientas de ingeniería genética y de una nueva área conocida como biotecnología de microalgas [1,2].

Por otro lado, existe una gran demanda a nivel mundial de proteínas recombinantes para una variedad de aplicaciones como industrial, de diagnóstico y terapéuticas. Por lo que, las microalgas, en especial las verdes, ofrecen un sistema atractivo para la expresión de proteínas, ya que presentan ventajas como: fácil cultivo, bajos costos de producción, grandes rendimientos de biomasa, baja contaminación, alta bioseguridad y poseen la maquinaria necesaria para realizar modificaciones pos-traduccionales [3,4].

Una microalga verde de gran importancia es *Dunaliella tertiolecta*, la cual, ha sido fuertemente estudiada para su producción de biomasa. Además, presenta características como altas cantidades de proteína en su composición y carece de pared celular, lo que podría facilitar la inserción de ADN exógeno en el proceso de transformación genética mediado por *Agrobacterium tumefaciens,* haciéndola un excelente sistema para la expresión de proteínas recombinantes [5, 6].

A la fecha, no se ha desarrollado un sistema de transformación estable para *D. tertiolecta*, mediado por esta bacteria. La dificultad para desarrollar un sistema de transformación radica en la transferencia del ADN dentro de la célula, en encontrar un gen marcador para ser expresado, en que el ADN sea capaz de replicarse y en que las células transformadas se recuperen y proliferen. Usando un ensayo de expresión transitoria, puede optimizarse el primer paso para la transformación [7]. Para ello, el gen reportero *gus*, herramienta ampliamente usada en la ingeniería genética, podría ser utilizado para su expresión transitoria en esta microalga.

La expresión del gen *gus* mediada por *A. tumefaciens*, permite discriminar entre la expresión de *gus* en la bacteria y en la célula transformada. Esto, usando una versión del gen *gus* que carece de un sitio de enlace ribosomal para la bacteria e impide la expresión en *Agrobacterium* [8]. La transferencia del ADN es expresada transitoriamente a alta frecuencia después del co-cultivo de la microalga con la bacteria; posteriormente esta expresión disminuye y es remplazada por la expresión estable. Por lo anterior, se considera al gen *gus* como una herramienta útil para el desarrollo de protocolos de transformación para nuevas especies de microalgas [9]. En el presente estudio se evaluó la expresión transitoria del gen reportero *gus* en *D. tertiolecta,* como un paso previo al establecimiento de un sistema de expresión estable de proteínas recombinantes.

METODOLOGÍA

Las microalgas se cultivaron en medio F/2 a 24°C en luz (50 $m^{-2} \cdot s^{-2}$) de acuerdo a la metodología de Guillard y Ryther, 1962 [10]. La viabilidad celular fue determinada usando el método de colorante de exclusión con azul de tripán, éste método es utilizado frecuentemente para cuantificar el número de células muertas en el cultivo, se basa en el empleo de colorantes como el azul de tripán, el cual es capaz de penetrar en la célula un vez que su membrana ha sido dañada [11]. La transformación genética fue mediada por *A. Tumefaciens* utilizando la cepa EHA105::pCAMBIA1304. Los ensayos de transformación consistieron en realizar la infección en dos condiciones distintas: infección en medio líquido y en medio sólido, empleando el medio de cultivo TAP 0.2 M. Posteriormente, el co-cultivo se mantuvo bajo oscuridad a 25±1 °C por 48 h [12]. Para evaluar la integración del transgén, se midió la actividad de la β-Glucoronidasa a través de un ensayo bioquímico, éste consistió en incubar las células de *D. tertiolecta* después del tiempo de co-cultivo con el sustrato X-Gluc [13]. El fundamento de este ensayo se basa en que las células que hayan sido transformadas y que expresen el gen *gus*, al estar en contacto con el sustrato (x-gluc), lo hidrolizarán y se teñirán de un color azul intenso. Las células teñidas fueron cuantificadas con ayuda de un microscopio óptico y una cámara de Neubauer, para posteriormente calcular la eficiencia de transformación. Ésta se determinó mediante la relación entre el número de células trasformadas y el número de células totales.

RESULTADOS

En la figura 1, se observa la curva de crecimiento (expresado en número de cel/mL) y la viabilidad celular de *D. tertiolecta* a través del tiempo. La densidad celular máxima del cultivo se obtuvo al día 14, alcanzando 2.3 x 10^6 cel/mL. Esta densidad celular encontrada, está por debajo a la reportada por Aguilar [14] en cultivo de *Dunaliella salina* (3.0 x10^6 cel/mL), al mismo día de cultivo. Asimismo, los resultados de densidad celular se encuentran cercanos a lo reportado por Calderón [15], en cultivo de *Dunaliella tertiolecta* (2.5 x 10^5 cel/mL) al día 10**.** Las diferencias en los resultados encontrados en el presente trabajo con otros autores podría deberse a las diferencias en condiciones a las que fueron cultivadas como luz y temperatura, asimismo, al medio de cultivo empleado.

La mayor viabilidad del cultivo se alcanzó al cuarto día con un 86%, obteniendo a ese tiempo una densidad celular de 1.0 x 10^6 cel/mL. La determinación de la viabilidad celular y la valoración del estado fisiológico del cultivo de microalgas son esenciales para el desarrollo de tecnologías de preservación y para otras tareas biotecnológicas [16]. En base a los resultados de viabilidad celular, se tomó el día cuatro de cultivo para realizar los ensayos de transformación genética de *D. tertiolecta*, asegurando un número de células considerables, viables y aptas para someterse a dicho proceso.

Con respecto a la expresión transitoria del gen *gus*, el protocolo de transformación que utilizó infección en medio sólido presentó una mayor eficiencia de transformación con 68% comparado con la infección en medio líquido con 49% (figura 2).

Agrobacterium, es una bacteria que naturalmente transfiere parte de su información genética (ADN-T) al núcleo de la célula huésped durante el proceso de infección. Este evento de transformación está dirigido por proteínas codificadas por el "regulon *vir*", un grupo de genes que responden a señales de tipo fenólicas [17], la acetosiringona (AS) es un ejemplo de ellos. En la comparación realizada en el presente estudio, los porcentajes de transformación obtenidos (sólido 68% y íquido 49%), resultaron ser altos para ambos métodos de infección, empleando AS en el medio de inducción. Sin embargo, usando medio sólido para la infección se observaron mejores resultados. Cha [18] realizaron una optimización para la transformación genética de *Chlorella vulgaris*, en donde encontraron un incremento en la eficiencia de transformación del 25% al precultivar las células en medio sólido para la transformación. Por otra parte, Kumar [19] reportó eficiencias de transformación de la microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii* del 11%, sin embargo en este protocolo omitían el paso de la inducción de los genes *vir* en *A. Tumefaciens.* Asimismo, Pratheesh [20], tomaron el protocolo de transformación de Kumar [19] agregando una etapa de inducción de *A. Tumefaciens*, así como una etapa de infección , logrando un incremento en la eficiencia de transformación (40%). Estos resultados muestran la importancia de cada etapa en el proceso de transformación, ya que al realizar de inducción con compuestos fenólicos como AS, se facilita el insersión del ADN-T dentro de la célula hospedera.

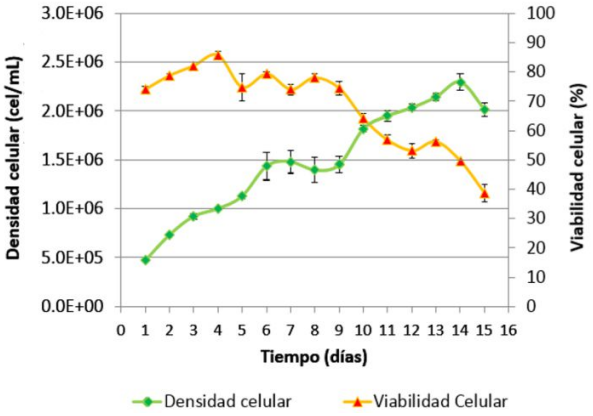


Figura 1.- Curva de crecimiento y viabilidad celular del cultivo de *D. tertiolecta.* Los valores representan el promedio de tres réplicas y su desviación estándar.

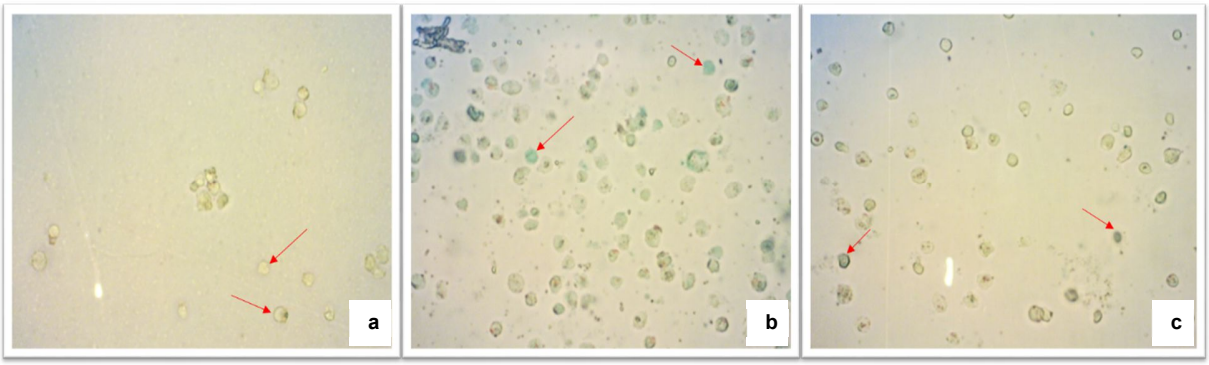


Figura 2.- Análisis bioquímico de GUS. Vista con microscopio óptico 40X: **a** Control *D. tertiolecta* sin transformar. **b** *D. tertiolecta* mostrando la expresión de la β-glucoronidasa, método de infección en sólido. **c** *D. tertiolecta* mostrando la expresión de la β-glucoronidasa, método de infección en líquido.

CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos, se corroboró que el gen reportero *gus* representa una herramienta de ingeniería genética capaz de ser utilizada en sistemas de expresión para la fácil detección de organismos genéticamente modificados. Además, el método de infección en sólido mostró una mejor eficiencia de transformación, con respecto al método en líquido. Este estudio representa el paso inicial para el establecimiento de un eficiente sistema de transformación de *D. tertiolecta* mediado por *A. tumefaciens*, esto con la finalidad de expresar proteínas recombinantes, aprovechando las características de esta microalga. Asimismo, como trabajo a futuro, se recomiendan pasos posteriores como realizar la selección con antibiótico de las células transformadas, así como llevar a cabo técnicas de PCR y electroforesis para corroborar la inserción de ADN mediado por *A. tumefaciens*.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen especialmente a CONACyT y a la Universidad Autónoma de Sinaloa, por el apoyo económico otorgado para la realización de este proyecto.

REFERENCIAS

[1] Pulz, O., Gross, W. (2004), "Valuable products from biotechnology of microalgae", Applied Microbiology and Biotechnology, 65: 635–648.

[2] Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A. (2006), "Commercial Applications of Microalgae", Journal of Bioscience and Bioengineering, 101: 87-96

[3] Pulz, O. (2001), "Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms", Applied Microbiology and Biotechnology, 57: 287–293.

[4] Walker TL. 2003. The development of microalgae as a bioreactor system for the production of recombinant proteins. Tesis Doctoral. Queensland University of Technology. Brisbane, Queensland, Australia.

[5] Guedes, A., Amaro, H., Sousa-Pinto, I., Malcata, X. (2014), "Applications of spent Biomass", Biofuels from Algae, 10: 205-224.

[6] Borowitzka, M., Siva, C. (2007), "The taxonomy of the genus *Dunaliella* (Chlorophyta, Dunaliellales) with emphasis on the marine and halophilic species", Journal of Applied Phycology, 19: 567–590.

[7] Jarvis, E., Brown, L. (1991), "Transient expression of firefly luciferase in protoplast of the green alga *Chlorella ellipsoidea*", Current Genetics, 19: 317-321.

[8] Shine, J., Dalgarno, L. (1974), "The 3'-Terminal Sequence of *Escherichia coli* 16S Ribosomal RNA: Complementarity to Nonsense Triplets and Ribosome Binding Sites", National Academy of Sciences of the United States of America, 71: 1342-1346.

[9] Janssen, B., Gardner, R. (1989), "Localized transient expression of GUS in leaf discs following co-cultivation with *Agrobacterium"*, Plant Molecular Biology, 14: 61-72.

[10] Guillard, R., Ryther, H. (1962), "Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana Hustedt* and *Detonula confervacea Cleve*", Canadian Journal of Microbiology, 8: 229-239.

[11] Richardson, A., Fedoroff, S. (2001), "Quantification of cells in culture. In Protocols for Neural Cell Culture". (3ra ed.) Totowa, New Jersey. Humana press Inc., 333-339.

[12] Anila N, Chandrashekar A, Ravishankar GA, Sarada R. 2011. Establishment of Agrobacterium tumefaciens-mediated genetic transformation in *Dunaliella bardawil.* European Journal of Phycology 46(1): 36-44.

[13] Jefferson, A., Kavanagh, T., Bevan M. (1987), "GUS fusions: B-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants", The EMBO Journal, 6 (13): 3901 -3907.

[14] Aguilar, C. (1995), Crecimiento y ciclo de vida de la microlga *Dunaliella Salina* Teodoresco de las Salinas de los Chimus y las Salinas de Chilca. (Tesis de licenciatura, Universidad Ricardo Palma), Lima, Peru.

[15] Calderon, A., Serpa, R. (2003), "Efectos del paraquat sobre el crecimiento y la morfología de la microalga *Dunaliella tertiolecta*", Ecología Aplicada, 2 (1) 99-102.

[16] Markelova, A. (2000), "A comparison of cytochemical methods for the rapid evaluation of microalgal viability", Russian Journal of Plant Physiology, 47 (6): 924-929.

[17] Wang, K. (2006), "Agrobacterium protocols" (2da ed.), Totowa, New Jersey, USA: Humana Press, vol 1, 77–84.

[18] Cha, T., Yee W., Aziz, A. (2012), "Assessment of factors affecting Agrobacterium-mediated genetic transformation of the unicellular green alga, *Chlorella vulgaris*", World Journal of Microbiology and Biotechnology, 28: 1771–1779.

[19] Kumar, S., Misquittab, R., Reddyc, V., Raob, B., Rajama, M. (2004), "Genetic transformation of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* by *Agrobacterium tumefaciens*", Plant Science, 166: 731–738.

[20] Pratheesh, P. (2014), "An Efficient Protocol for the Agrobacterium-mediated Genetic Transformation of Microalga *Chlamydomonas reinhardtii*", Molecular Biotechnology, 56: 507–515.

GEOSPATIAL STUDY USING A MODEL FOR ANALYSIS OF DRUG RESISTANCE PATTERNS OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* STRAINS IN JALISCO STATE MEXICO

(Estudio geoespacial usando un modelo para el análisis de patrones de resistencia a drogas en cepas de M*ycobacterium tuberculosis* del estado de Jalisco; México)

Ma Guadalupe González-Palomar[a]*, Gustavo Mora-Aguilera[b], Gladys López-Avalos[a], Martin López-Rodríguez[c], Manuel Sandoval-Díaz[c], Juan Carlos Villanueva-Arias[c], Ikuri Álvarez-Maya[a+].

[a] Unidad de Biotecnología Medica y Farmacéutica, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ), Av. Normalistas No. 800, Col. Colinas de la Normal, C.P. 44270 Guadalajara, Jalisco.
[b] Laboratorio Nacional de Referencia Epidemiológica Fitosanitaria DGSV-CNRF LANREF.
[c] Laboratorio Estatal de Salud Pública, [4]Secretaria de Salud Jalisco.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: ialvarez@ciatej.net.mx

Área del Conocimiento: Biología Molecular.

ABSTRACT
Tuberculosis is an infectious disease responsible for high rates of morbidity and mortality worldwide. The World Health Organization (WHO) established therapy that includes antibiotics such as isoniazid, rifampicin, pyrazinamide, streptomycin and ethambutol. Unfortunately the therapeutic option is not open to patients infected with Multi Drug Resistant Tuberculosis (MDR-TB) defined by resistance to at least isoniazid and rifampicin. Most MDR-TB strains exhibit alterations in genes encoding antibiotic targets. The aim of this study is to evaluate the frequency of mutations in the *rpoB, katG* and *inhA* genes of drug-resistant strains and analyze their spatial and temporal distribution geographically using a geographic information system (GIS). The GIS could be integrated into a routine population diagnostic system. To identify mutations related to drug resistance the above genes were amplified by polymerase chain reaction (PCR) from 71 *Mycobacterium tuberculosis* strains from the State Health Laboratory of Jalisco and the PCR products were sequenced. From the sequencing analysis we observed 12 strains with mutations in *katG*, 3 strains with mutations in *inhA* and 3 strains with mutation in *rpoB*. A map of mutant strains in Jalisco, using the ArcGIS software, was generated. The distribution of TB cases were concentrated in 18 municipalities in the state of Jalisco, mainly in Puerto Vallarta and Guadalajara. The distribution of drug resistant strains was concentrated in Puerto Vallarta, Tlajomulco de Zuñiga, Zapopan, Guadalajara and Tlaquepaque. The study showed that the locations with the highest incidence of TB also had the highest pattern of drug resistance in the state. We conclude that geospatial analysis is an important public health tool that can aid in the design of new public health programs.

Keywords: Mutations, Mycobacterium tuberculosis, drug resistance and georeferencig.

RESUMEN
La tuberculosis es una enfermedad infecciosa responsable de las altas tasas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, es considerada como un problema de salud pública en el mundo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció la terapia que incluye antibióticos como la isoniacida, rifampicina, pirazinamida, estreptomicina y etambutol. Para los pacientes infectados con cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a múltiples drogas (MDR-TB) definidas como resistentes a isoniacida y rifampicina, no es opción terapéutica, afectado la eficiencia de programas destinados al control de la enfermedad. La resistencia a drogas en *Mycobacterium tuberculosis* se debe a alteraciones en genes que codifican para blancos de antibióticos. El objetivo del trabajo es evaluar la frecuencia de mutaciones en los genes *rpoB, katG* e *inhA*, en cepas MDR-TB y analizar su distribución geográfica, utilizando un sistema de información geográfica (SIG). La herramienta SIG ayudará a determinar patrones geográficos de mutaciones que confieren resistencia a drogas. Se analizaron mutaciones en los genes *rpoB, katG* e *inhA* en 71 aislados de *Mycobacterium Tuberculosis,* procedentes del Laboratorio Estatal de Salud Pública, utilizando la técnica de secuenciación genómica, por PCR. Los resultados fueron georreferenciados utilizando el software ArcGIS. La frecuencia de mutaciones fue: 12 cepas con mutación en el gen *katG*, 3 con mutación en el gen *inhA* y 3 con mutación en el gen *rpoB*. La distribución de los casos de tuberculosis se concentró en 18 municipios del estado de Jalisco, los municipios de mayor incidencia de TB fueron: Puerto Vallarta y Guadalajara. La distribución de cepas resistentes a drogas, se concentró en Puerto Vallarta, Tlajomulco de Zúñiga, Zapopan, Guadalajara y Tlaquepaque. Este es el primer estudio que analiza mutaciones en aislados pertenecientes al estado de Jalisco. Se puede concluir que el análisis geoespacial es una herramienta importante en el área de salud pública.

Palabras Clave: Mutaciones, *Mycobacterium tuberculosis*, resistencia a drogas y georeferenciación.

INTRODUCCIÓN
La TB es una enfermedad reemergente causada por bacterias de género *Mycobacterium tuberculosis.* Según estimaciones de la organización mundial de la salud (OMS), en el año 2012 hubo 1.3 millones de muertes por esta enfermedad y una incidencia de 8.6 millones de casos nuevos de tuberculosis en todo el mundo. En México en el año 2011 se notificaron 19,445 casos de TB en todas sus formas (pulmonar, meníngea, ganglionar y otras formas), y 15,843 (81.5%) de forma pulmonar, lo que representa una tasa de TB en todas sus formas de 17.8 por cada 100 mil habitantes y una tasa de 14.5 para TB pulmonar [1].
Uno de los factores que dificultan el manejo y control clínico de la TB a nivel mundial es la resistencia a drogas, la OMS estima que el 20% de los casos de TB son resistentes a un fármaco (TB-DR) y el 5,3% son resistentes a isoniazida y rifampicina (TB-MDR) [2]. Para estos casos de resistencia la terapia de corta duración (DOTS) recomendada por la OMS, la cual incluye los antibióticos isoniazida (INH), rifampicina (RIF), pirazinamida, estreptomicina y etambutol, deja de ser la opción terapéutica. Lo que establece un problema mayor en los programas de salud pública encaminados al control de la TB [3]. La resistencia a drogas en *Mycobacterium tuberculosis* se debe predominantemente a alteraciones en genes que codifican blancos de antibióticos. Con el análisis genético de estas cepas se ha logrado conocer distintos mecanismos de resistencia [4]. Por otro lado la OMS establece que la TB tiene grandes variaciones en la incidencia las cuales ocurren no sólo entre países sino también entre regiones dentro de un país determinado. Se sabe que estas diferencias son atribuibles a factores epidemiológicos y sociales, así como a la migración de personas entre países o a la incidencia de enfermedades como sida o Diabetes Mellitus II entre otras. En 1993 la OMS propuso la utilización de Sistemas de Información Geográfica (SIG) para producir pronósticos de diversas patologías con fuerte carga ambiental [2]. En los últimos años ha habido un creciente interés dentro del campo de la investigación centrada en la salud por los

SIG como herramienta que facilite el análisis, gerencia, monitoreo y decisiones en estos temas de salud pública, debido a las capacidades de los SIG para manejar la dimensión de espacio geográfico, la integración de los datos relacionados con la salud a partir de diferentes fuentes, para ayudar a describir y visualizar nuevos patrones y relaciones geográficas entre los datos, que de otro modo serían difíciles de identificar, y representar en forma gráfica en mapas, que son los medios más expresivos y visuales [5,6]. Por lo que el objetivo de este trabajo fue analizar la frecuencia de mutaciones en los genes *rpoB, katG, inhA*, en cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a drogas y la utilización de un SIG para identificar la distribución espacial y temporal de esta frecuencia de mutaciones. Este estudio es el primero en describir las mutaciones asociadas a la resistencia a drogas en cepas del estado de Jalisco de *Mycobacterium tuberculosis* así como su distribución geográfica.

METODOLOGÍA

Diseño del estudio. Es un diseño de corte transversal, descriptivo y de georeferenciación de todos los casos de TB con resistencia a drogas, reportados durante el período del mes de Enero del 2014 a, el estudio se llevó a cabo en el estado de Jalisco, México.

Cepas. Los aislados clínicos fueron obtenidos del Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Jalisco (LESP). Todas las cepas fueron identificadas como *Mycobacterium tuberculosis*, por pruebas de identificación fenotípicas y se clasificaron como resistentes o sensibles a isoniazida y/o rifampicina. Extracción de ADN. A partir del cultivo en medio Lowenstein Jensen, se tomó una porción de bacteria con una asa y se resuspendió en 400 ul de TE (10 Mm Tris pH 8,0, 1 Mm EDTA). La suspensión fue inactivada por calentamiento a 80°C por 10 minutos. Este procedimiento se llevó a cabo en el Laboratorio Estatal de salud Pública del Estado de Jalisco. Después en el laboratorio de bioseguridad nivel 2 del Centro de investigación y asistencia en tecnología y diseño del estado de Jalisco (CIATEJ) el ADN fue extraído siguiendo el método fenol-cloformo-alcohol isoamílico para *Mycobacterium* en agar. Procedimiento de amplificación por PCR. Se llevó a cabo la amplificación de ADN de las regiones que determinan resistencia en los genes *katG, inhA y rpoB*, mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), un producto de amplificación de 350pb del gen *rpoB*, de 351pb del gen *katG*, y de 231pb del gen *inhA*, fue obtenido utilizando oligonucleótidos y condiciones de PCR. Después de la PCR se realizó la purificación de las bandas de DNA a partir de gel de agarosa utilizando el kit comercial QIAquick (Gel extracción kit-QIAGEN), siguiendo las instrucciones del protocolo del kit. Secuenciación. La secuenciación de los productos de PCR purificado fue realizada por la empresa Macrogen Corp USA, el envío del DNA se realizó siguiendo las especificaciones para el transporte de muestras por parte de la empresa. Las secuencias nucleotídicas fueron analizadas mediante el programa CodonCode Aligner para realizar el alineamiento de las secuencias y su análisis mutacional. Georeferenciación. En este estudio se utiliza como área de investigación el Estado de Jalisco, que se encuentra en el oeste de México a 20º41' latitud norte y 103º 21' de longitud Oeste, ocupa un área de 80 228 km2, se divide en 125 municipios, con una población de 7 350 682 habitantes hasta el año 2015.Población de estudio. Los datos analizados corresponden a los casos de TB (todas sus formas), de pacientes referidos al Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Jalisco (LESP). Se obtuvieron a partir de la página del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), basándose en el nombre y registro de cada paciente, el proyecto cuenta con la aprobación del comité de ética del Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Jalisco. Análisis espacio temporal. El total de los casos reportados fueron georreferenciados con la asignación de coordenadas geográficas correspondientes al municipio de residencia de cada caso, los datos georeferenciados fueron procesados y analizados utilizando el software ArcGIS de ESRI (Enviromental Systems Research Institute, Redlands, CA, EE.UU.).

RESULTADOS

Se analizaron un total de 71 aislados clínicos procedentes de pacientes residentes de diferentes municipios del estado de Jalisco. Del total, 34 aislados fueron caracterizados fenotípicamente como resistentes a drogas y 37 fueron caracterizados fenotípicamente como sensibles a drogas. El porcentaje de los aislados clínicos con resistencia a drogas fue el siguiente 69% presentaron resistencia a isoniacida, 15% presentaron resistencia a rifampicina y 16% fueron resistentes a ambas drogas (TB-MDR). De los 34 casos con resistencia a drogas, se encontró una frecuencia de 35.29% de casos tratados previamente y una frecuencia de 64.7% en casos considerados como nuevos porque los pacientes no tenían ningún tratamiento previo al diagnóstico de la enfermedad. El análisis de las mutaciones en los genes *KatG, rpoB e inhA*, mediante secuenciación genética, mostró, una frecuencia de 27.2% de mutaciones encontradas en la región 315 AGC→ACC (S315T) del gen *KatG* así como una frecuencia de 9.09% de mutaciones encontradas en la región promotora -15 C→T y -17 G→T del gen *inhA*, en aislados con resistencia a sólo a isociacida (n=22). Es importante mencionar que en una frecuencia del 63% de estos aislados no se encontraron mutaciones en los genes implicados en este estudio. Para los aislados con resistencia sólo a rifampicina (n=5) no se encontraron mutaciones en el gen *rpoB*. Para los aislados resistentes a ambas drogas (isociacida- rifampicina) (n=7), se encontró una frecuencia del 40% de mutaciones en el gen *rpoB*, en la región 531; TCG→TTG Ser→Leu, una frecuencia del 100% de mutaciones en la región 315 AGC→ACC del gen *katG* así como una frecuencia del 20% en mutaciones en la región -15 C→T del gen *inhA*. Del total de los aislados con resistencia (34), se encontrón mutación solo en el 44.1%. En una cepa caracterizada como sensible, se identificaron 2 mutaciones, en las regiones 531; TCG→TTG (S531L) en el gen *rpoB* y en la región 315; AGC→ACC (S315T) en el gen *katG*. La mutación más común correspondió al codón 315 del gen *katG*.

La Distribución de los casos de TB en todas sus formas se concentró en 18 de los 125 municipios del estado de Jalisco, Zapopan con una tasa de 0.2, Tlajomulco de Zúñiga con una tasa de 0.4, Tonalá con una tasa de 0.6, El Salto con una tasa de 0.7, Tepatitlán de Morelos, San Juan de los Lagos, Guadalajara, Tonalá, Autlán de Navarro y la Barca con una tasa de 1 a 2, Tomatlán, Tala y Cocula con una tasa de 3-4, Cihuatlán, Magdalena y Colotlán con una tasa de 4-6 casos por cada 100 mil habitantes, . El grullo con una tasa de 8,3 y Puerto Vallarta con una tasa de 12 (Fig.1). Los municipios que presentaron casos con resistencia a drogas fueron Cihuatlán, Tonalá, Zapopan, Tepatitlán de Morelos y San Juan de los Lagos con una frecuencia de 2.94%, San Pedro Tlaquepaque y Tlajomulco de Zúñiga con una frecuencia de 5.88%, Guadalajara con una frecuencia de 11.76% y Puerto Vallarta con una frecuencia de 61.76%. (Fig.2). Las cepas que presentaron mutaciones en los genes de interés, se localizan en los municipios de Puerto Vallarta, Tlajomulco de Zúñiga, Zapopan, Guadalajara y San Pedro Tlaquepaque.

Fig.1

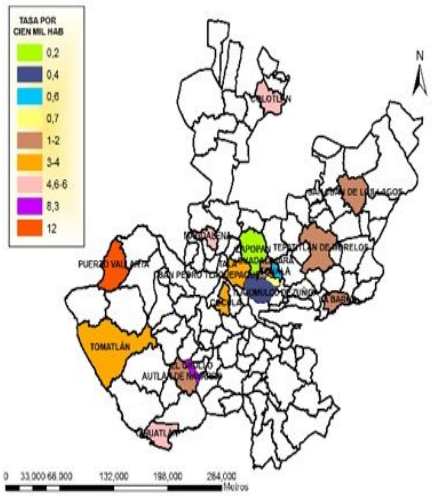


Fig.1 Mapa de Jalisco que muestra los municipios y su tasa de incidencia de Tuberculosis por cien mil habitantes.

Fig.2

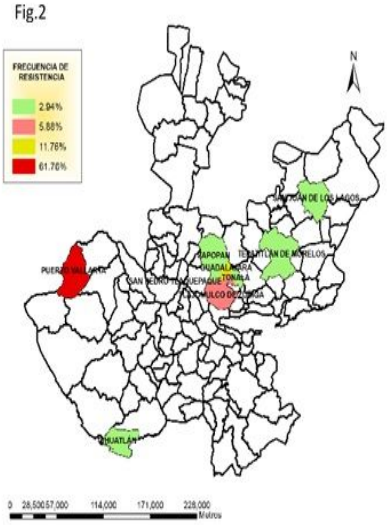


Fig.2 Mapa de Jalisco que muestra los municipios y la frecuencia de resistencia a drogas.

Fig.3

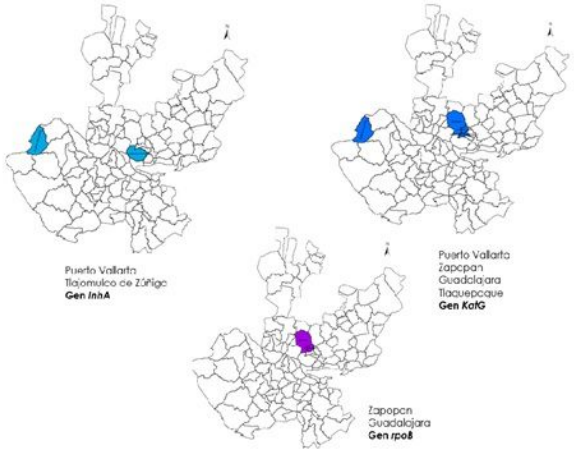


Fig. 3 Mapa de Jalisco, mostrando municipios en donde se observaron cepas de *Mycobacterium tuberculosis* que presentaron mutaciones en los genes de interés.

DISCUSIÓN

En las cepas resistentes a RIF que no se detectaron mutaciones, pudiera indicar que la resistencia a RIF en estas cepas, podría estar relacionado con mutaciones en alguna otra región del gen *rpoB* o que otro mecanismo diferente pudiera ser el responsable de la resistencia. Ya que en los últimos años se han observado algunos aislados resistentes cuya mutación no se localiza en la región de 81pb, por lo cual se propone la existencia de mecanismos adicionales generadores de resistencia. Aunque finalmente, el

diagnostico de resistencia a rifampicina es especialmente importante debido a su fuerte asociación con la resistencia a isoniacida, considerándose como un marcador importante de TB-MDR [5], esto concuerda con nuestros resultados ya que en las cepas en donde se observó mutación en el gen *rpoB*, se observó también mutación en el gen *katG.* En las cepas resistentes a INH, se observaron mutaciones principalmente en el codón 315 del gen *katG*, como se ha reportado anteriormente [5]. Se sabe que las mutaciones en la región promotora del gen *inhA* pueden presentarse por sí solas o en combinación con las mutaciones en el gen *katG*, lo cual fue observado en 2 de las cepas, 1 caracterizadas fenotípicamente como TB-MDR y otra como sensible a drogas. Las cepas resistentes a INH en las cuales no se observaron mutaciones en el gen *katG* o en *inhA*, probablemente la resistencia pudiera estar asociada a otro gen o a otro mecanismo de resistencia [5], en este sentido Zhang y cols. 2005 [7], observaron que un 15% de cepas resistentes a isoniacida presentaron mutaciones en el lokus *kasA*, lo cual implica que otro posible objetivo de isoniazida es la proteína *kasA.* En cuanto a la distribución espacial 18 son los municipios que concentran la enfermedad, sin embargo se observó una mayor tasa principalmente en los municipios de la región centro del estado y en dos municipios de importancia turística importante, lo último concuerda con otros autores que destacan la alta incidencia de la enfermedad en zonas con un alto nivel de migración [8]. Las mutaciones de estas cepas se encontraron principalmente en el municipio de Puerto Vallarta para los genes *inhA* y *katG*, y en los municipios de la zona centro se encontraron cepas con mutaciones en los tres genes de interés. A diferencia de otros autores, se encontró una alta frecuencia de resistencia a drogas en casos no tratados (64.7%) versus casos tratados previamente (35.29%) [8].Esto pudiera indicar el mal manejo de las personas infectadas con cepas resistentes, debido a que están en continuo contacto con otras personas y pueden estar transmitiendo la enfermedad, lo que sugiere un programa de vigilancia más eficaz para tener éxito en la reducción de TB en el estado de Jalisco.

CONCLUSIONES

Este estudio geoespacial mostró la zona de municipios con mayor incidencia de TB, la cual se encuentra principalmente en municipios de la región centro del estado de Jalisco. También se evidencio el patrón de casos de resistencia a drogas y mutaciones encontradas en cepas de *Mycobacterium tuberculosis* en los diferentes municipios del estado. Se probó también la importancia de la combinación de clínica y geoespacial para el estudio de TB resistente a drogas en el estado de Jalisco, demostrando así la utilidad de esta herramienta en el área de salud.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a CONACYT por el apoyo para el desarrollo del estudio a través del proyecto SALUD-2012-01-180574.

REFERENCIAS

[1] Zenteno-Cuevas, R., Cuevas-Cordoba, B., Enciso, A., Enciso, L., Cuellar, A., 2012. “Assessing the utility of three TaqMan probes for the diagnosis of tuberculosis and resistance to rifampin and isoniazid in Veracruz, Mexico”. Can. J. Microbiol. 58, 318–325.

[2] Anti-tuberculosis Drug Resistance in the world. Fourth Global Report. WHO 2008. Ejecutive Sumary. Result. Survey coverage and population-weightedm means. pp 15. Disponible en: http://www.who.int/entity/tb/publications/ 2008/drs_report4_26feb08.pdf

[3] Francis J. Curry National Tuberculosis Center and California Department of Public Health, 2008: Drug-Resistant Tuberculosis: A Survival Guide for Clinicians, Second Edition [pp. 15].

[4] Wada T, Maeda S, Tamaru A, Imai S, Hase A, Kobayashi K. "Dual-Probe Assay for Rapid Detection of Drug-Resistant Mycobacterium tuberculosis by Real-Time PCR". Journal Clinical Microbiology. 2004;42:5277–85.

[5]Quirós-Roldán E, Airoldi M, Moretti F, Carosi G. "Bases moleculares de resistencia de *M. tuberculosis*". Rev Diagn Biol. 2001;50:200–3

[6] Said S, Becerril P, Molina G, Barrios H. "Tuberculosis causada por cepas de *M. tuberculosis* drogorresistentes". Enf Emerg. 2005;7:13–9.

[7] Zhang M, Yue J, Yang Y, Zhang H, Lei J, Jin R, et al. "Detection of Mutations Associated with Isoniazid Resistance in Mycobacterium tuberculosis Isolates from China". Clin Microbiol. 2005;43:5477–82

[8] Silva R, Suffysb P, Barrosoc E, Sansigolo L, Duartee C, Carioca M, Salani R, Cunha C. "Genotyping and drug resistance patterns of *Mycobacterium tuberculosis* strains observed in a tuberculosis high-burden municipality in Northeast, Brazil" braz j infect dis. 2013;17(3):338–345.

GENETIC IDENTIFICATION OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM ADOBERA CHEESE

(Identificación genética de bacterias ácido lácticas aisladas de queso adobera)

Marcos Daniel Martínez-Peña[*a+], Ramón Ignacio Arteaga-Garibay[a], Alba Margarita Hernández-Ibáñez[c], Yolanda Salinas-Moreno[b], Samuel Gaytán-Ramírez[c], María Dolores Méndez-Robles[d].

[a] Laboratorio de Recursos Genéticos Microbianos, Centro Nacional de Recursos Genético, INIFAP. Tepatitlán de Morelos, Jalisco.
[b] Laboratorio de Calidad de Cultivos para Uso Humano y Pecuario. Campo Experimental de Los Altos, INIFAP. Tepatitlán de Morelos, Jalisco.
[c] Ingeniería en Industrias Alimentarias. Instituto Tecnológico Superior de Arandas. Arandas, Jalisco.
[d] Laboratorio de Microbiología de Alimentos. Centro Universitario de Los Altos, UDG. Tepatitlán de Morelos Jalisco.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: martinez.mdaniel@inifap.gob.mx

Área del conocimiento: Biología Molecular.

ABSTRACT
In the region of Los Altos de Jalisco, the cheese with greater consumer demand is the Adobera like, which is produced with 100% of cow and raw milk. There are few reports described which lactic acid bacteria (LAB) are used for the elaboration of this cheese, and in these reports, the identification was made by phenotypic methods that are unreliable to discriminate closely related species. The objective was the genetic identification of 24 strains of lactic acid bacteria isolated from a cheese Adobera and which were previously identified with the API system 50 CHL. With the use of the analysis of the sequence of the gene 16S rDNA ribosomal like the golden standard for the BAL identification it will be possible to get a more reliable identification of the bacteria acid lactic presents in cheese Adobera The 24 strains were recovered in MRS agar and incubated at 37 °C for 48 h. The extraction of DNA genomic was carried with the extraction technique of phenol-chloroform with K proteinase. The amplification of the 16S rDNA gene was used primers 27f and 1492r. The amplification products were purified with the Agencourt® AMPure® XP system. The purified amplicons were sent to the sequencing service with the indication of obtaining the sequence with the primer 27f. The bioinformatics analysis to assess the quality and editing sequence. The phylogenetic reconstruction of the strains was made by the parsimony method and 100 bootstrap replicates. Only it was possible to identify 17 of the 24 strains of BAL, 16 corresponded to Enterococcus faecium and one to Enterococcus gallinarum. Genetic identification not coincided with the identification made with API, which is consistent with other studies.

Keywords: *Enterococcus*; 16S rDNA; LAB; Adobera cheese, sequencing.

COMPARATIVE DETECTION OF FLT3-ITD MUTATION IN ACUTE MYELOID LEUKEMIA

(Detección comparativa de la mutación FLT3-ITD en pacientes con leucemia mieloide aguda)

Francisco Alejandro Lagunas Rangel[a]*, Carlos Cortés Penagos[a,b+].

[a] Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas "Dr. Ignacio Chávez". División de Estudios de Posgrado. Morelia, Michoacán. México.
[b] Laboratorios Mendel. Morelia, Michoacán. México.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: neocccs@yahoo.com

Área del Conocimiento: Biología Molecular.

ABSTRACT
Mutations in the FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT3) gene are important molecular markers to establish the clinical prognosis of patients with acute myeloid leukemia. Internal tandem duplications (FLT3-ITD) occur in approximately a quarter of newly diagnosed adult cases and is associated with a poor prognosis and low-response treatment. FLT3-ITD testing is performed with a PCR-based assay of genomic DNA or total RNA isolated from whole blood or bone marrow (BM). A major limitation of most PCR strategies for FLT3-ITD mutations is their relative lack of sensitivity, which is simply a function of the amount of nucleic acids template and the number of PCR cycles. In order to determine the influence of PCR-template (genomic DNA or cDNA) fifty BM samples from anonymous patients with confirmed diagnosis of acute myeloid leukemia were used for nucleic acid extraction and FLT3-ITD testing. Total RNA was used to synthesized the corresponding cDNA. The fragments generated in the PCR reaction consist of the 308 bp (DNA) or 208 bp (cDNA) wild typet fragment and the longer mutant fragment, the length of which is increased over the wild-type length due to the inserted sequence. Significant differences between the detection of FLT3-ITD mutations in DNA and cDNA were observed. Positive FLT3-ITD samples were detected in 36% of the samples when cDNA was used as a PCR-template and only 20% where detected using genomic DNA. In conclusion, the use of cDNA could be recommended to detect FLT3-ITD mutation rather than genomic DNA.

Keywords: FLT3, Leukemia, prognosis, PCR

RESUMEN
Las mutaciones en el gen FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT3) son importantes marcadores moleculares para establecer el pronóstico clínico de los pacientes con leucemia mieloide aguda. Las duplicaciones en tándem internas, FLT3-ITD por su siglas en inglés, ocurren en aproximadamente en un cuarto de los casos de adultos recien diagnosticados y son asociadas con un mal pronóstico clínico y baja respuesta al tratamiento. La prueba de detección de la mutación FLT3-ITD es realizada mediante ensayos de PCR utilizando DNA genómico o RNA total, aislados de sangre periférica o médula ósea. Una importante limitación de la mayoría de las estrategias de PCR para la detección de la mutación FLT3-ITD es la relativa falta de sensibilidad, la cual es simplemente una función de la cantidad de ácido nucleico templado y del número de ciclos en el programa de PCR. Con el fin de determinar la influencia que

presenta el ácido nucleico templado (DNA genómico o cDNA), cincuenta muestras de médula ósea provenientes de pacientes anónimos con diagnóstico confirmado de leucemia mieloide aguda fueron utilizadas para realizar la extracción de ácidos nucleicos y la prueba de detección de la mutación FLT3-ITD. El RNA total fue utilizado para sintetizar el correspondiente cDNA. Los fragmentos generados en la reacción de PCR consisten de 308 pb (DNA) o 218 pb (cDNA) del fragmento silvestre, y fragmentos mayores en presencia de la mutación, incrementándose debido a la secuencia insertada (ITD). Se observaron diferencias significativas entre la detección de la mutación FLT3-ITD utilizando DNA genómico y cDNA. Se detectaron 36% de muestras positivas a FLT3-ITD cuando el cDNA fue utilizado como molde para la reacción de PCR y solamente 20% fueron detectadas utilizando DNA genómico. En conclusión, podría ser recomendable detectar la mutación FLT3-ITD utilizando preferentemente cDNA en lugar de DNA genómico.

Palabras Clave: FLT3, leucemia, pronóstico, PCR.

INTRODUCCIÓN

El receptor FLT3 (FMS-like tyrosine kinase 3) forma parte de la familia de receptores tipo tirosina cinasa de clase III y juega un papel fundamental en la hematopoyesis. Algunas mutaciones en el gen que codifica para esta proteína producen formas constitutivamente activas del receptor, las cuales han sido reportadas en pacientes con algún tipo de Leucemia Mieloide Aguda (LMA) [1]. La mutación más común en el gen FLT3 involucra una duplicación genética en tándem interna (ITD) entre los exones 14 y 15 correspondientes al dominio yuxtamembrana, la cual varia en longitud y en posición [2]. Diversos grupos de investigación han reportado que FLT3-ITD es uno de los principales marcadores de riesgo en LMA debido a que predice un resultado adverso. El impacto de esta mutación es su asociación con altas cuentas blástica, incremento del riesgo de recaída y disminución de la supervivencia. Las mutaciones FLT3-ITD se han correlacionado con ciertos subgrupos citogenéticos, siendo especialmente frecuente en pacientes con un cariotipo normal. Sin embargo, pacientes que presentan la traslocación t(15;17)(q22;q12) [PML-RARA] o t(6;9)(p23;q34) [DEK-NUP214] también presentan alguna mutación en FLT3 [3-5]. Existen diversas estrategias experimentales para realizar la detección de FLT3-ITD, sin embargo la más utilizada es el análisis por electroforesis de los productos de PCR generados de la amplificación de los exones 14 y 15. Usualmente las muestras utilizadas son médula ósea o sangre periférica, de las cuales indistintamente se realiza la extracción de DNA o RNA (cDNA), el cual se usará como templado en la reacción de PCR. En años recientes, Libura et al. [6] reportaron que el uso de cDNA para la detección de FLT3-ITD puede ser hasta 2 escalas logarítmicas más sensible que la utilización de DNA, apareciendo más frecuentemente clonas con baja expresión de FLT3-ITD y pérdida del heterocigosidad. En el presente trabajo se evalúa la sensibildad de una prueba molecular (AS-PCR) para la detección de la mutación FLT3-ITD y el efecto de la utilización de DNA o cDNA como templado en la reacción de PCR.

METODOLOGÍA

Muestras Biológicas. Se utilizaron 50 muestras anónimas con diagnóstico confirmado de LMA con las características citogenéticas presentadas en la tabla 1.

Análisis y manipulación de ácidos nucleicos. La extracción de DNA y RNA a partir de las muestras de médula ósea se llevaron a cabo por el método de extracción en columna utilizando los kits comerciales

QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN®) y QIAamp RNA Blood Mini Kit (QIAGEN®) respectivamente, siguiendo las instrucciones del proveedor. La síntesis de cDNA se efectuó utilizando el kit Omniscript RT Kit (QIAGEN®), haciendo uso de random nonamers (Sigma-Aldrich®) y de acuerdo a las instrucciones del proveedor.

Detección de la mutación FLT3-ITD mediante PCR alelo específico (AS-PCR). La determinación de la mutación FLT3-ITD tanto en DNA como en cDNA se realizó mediante la metodología de PCR punto final utilizando los oligonucleotidos FLT3-ITD F (5'- GGT ATG AAA GCC AGC TAC AGA TGG -3') y FLT3-ITD R (5'- GAC GGC AAC CTG GAT TGA GAC TC -3'). Los productos de amplificación esperados son de 218 y 308pb si se utiliza cDNA o DNA respectivamente. La mutación puede evidenciarse por la amplificación de productos de mayor tamaño resultado de la amplificación en tandem. El análisis de los productos de PCR se llevó a cabo a través de electroforesis en geles de agarosa al 2.3 %. Los productos fueron purificados haciendo uso del kit QIAquick Gel Purification Kit (QIAGEN®) de acuerdo a las especificaciónes brindadas por el provedor y posteriormente se secuenciaron por el método de Sanger.

Análisis de las Secuencias. El análisis de las secuencias se realizo con los sistemas informaticos Finch TV 1.5.0 (Geospiza™, Inc) y CLC Sequence Viewer 7 (QIAGEN® Company).

RESULTADOS

De acuerdo a la clasificación mas reciente de Organización Mundial de la Salud (OMS), las muestras con diagnóstico presuntivo de LMA deben ser clasificadas de acuerdo a la presencia de anormalidades cromosómicas, por lo que las muestras utilizadas en el presente estudio fueron inicialmente analizadas citogenéticamente con el fin de determimar el marcador genético presente. Las muestras fueron clasificadas en 3 grupos principales: sin anormalidades cromosómicas, con anormalidades cromosómicas recurrentes y con otro tipo de anormalidades o de cariotipo complejo (Tabla 1). Cada una de las muestras fue procesada para la extracción independiente de ácidos nucleícos (DNA y RNA) como se describe en materiales y métodos.

Tabla 1. **Clasificación de las muestras de acuerdo al análisis citogenético**.

Cariotipo	**Número de Muestras**	**Porcentaje**
Sin anormalidades cromosómicas	**26**	**52**
Con anormalidades cromosómicas recurrentes	**20**	**40**
• t(6;9) (p23;q34) • t(8;21)(p22;q22) • t(15;17)(q22;q12) • inv(16)(p13.1;q22)	2 5 10 3	4 10 20 6
Otras anormalidades cromosómicas	**4**	**8**
Total	**50**	**100**

Con el fin de determinar la presencia de la mutación FLT3-ITD en las muestras analizadas se llevaron a cabo reacciones AS-PCR independientes utilizando DNA genómico o cDNA como templado de la reacción. Los productos de amplificación fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa (Figura 1). Cuando se analizaron las muestras utilizando el DNA como templado de la reacción, solamente diez de ellas fueron positivas para la mutación FLT3-ITD. Estas muestras fueron confirmadas positivas al utilizar cDNA. Adicionalmente a las diez muestras positivas, ocho muestras mas fueron identificadas como positivas a la mutación por la aparición de amplificados adicionales (Figura 1). De tal forma que utilizando cDNA se contabilizaron 18 muestras positivas.

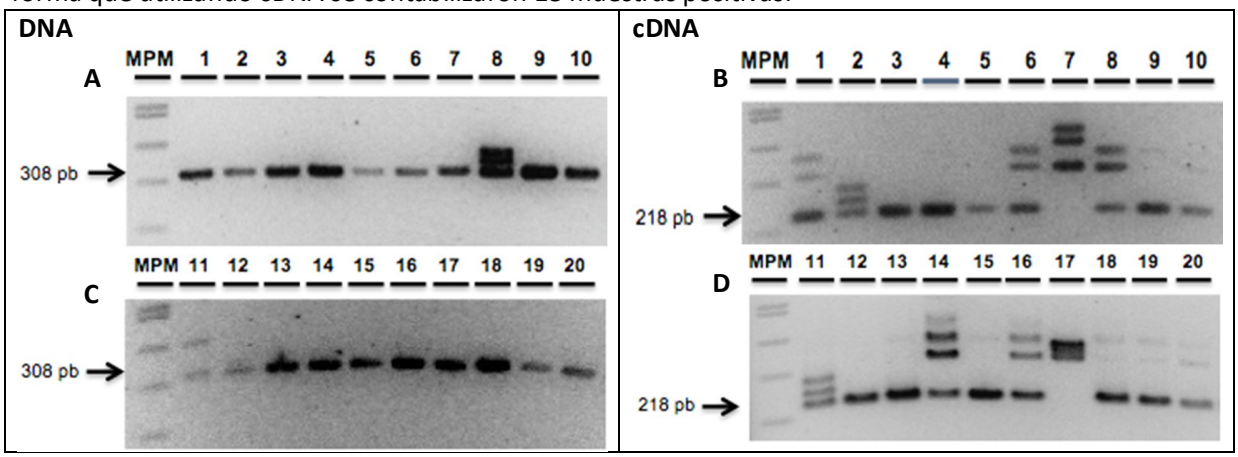


Figura 1. **Análisis comparativo de la prueba AS-PCR para la determinación de la mutación FLT3-ITD**. Los productos de amplificación obtenidos a partir de DNA (A y C) ó de cDNA (B y D) fueron separados utilizando electroforesis en geles de agarosa al 2.3%. MPM: Marcador de peso molecular (100 pb).

Para determinar la identidad de los amplicones correspondientes a la mutación (ITD) en cada una de las muestras positvas, se procedió a purificarlos y secuenciarlos de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos. El análisis de las secuencias mostró que los amplicones correspondian a los exones 14 y 15 del gen FLT3 y presentaban diferentes cantidad de duplicaciones en variables posiciones.

Las muestras positivas para la mutación FLT3-ITD fueron clasificadas con base en el marcador citogenético a fin de poder establecer una correlación (Tabla 2). Las muestras con un cariotipo normal (sin anormalidades cromosómicas) y con anormalidades cromosómicas recurrentes tuvieron una mayor incidencia de la mutación. Mas del 50% de las muestras con la traslocación t(15;17)(q22;q12), que corresponde al marcador genético para Leucemia Promielociítica, fueron pasitivas para FLT3-ITD. Aun cuando ocho de las muestras con cariotipo normal presentaron al mutación estudiada, éstas representan un grupo heterogeneo ya que no existe marcador conocido para su clasificación (Tabla 2).

Tabla 2. Correlación de la mutación FLT3-ITD con el marcador citogenético.

Cariotipo	**Número de Muestras**
Sin anormalidades cromosómicas	**8**
Con anormalidades cromosómicas recurrentes	**9**
• t(6;9) (p23;q34) • t(8;21)(p22;q22) • t(15;17)(q22;q12)	2 0 6

• inv(16)(p13.1;q22)	1
Otras anormalidades cromosómicas	**1**
Total	**18**

DISCUSIONES

Los resultados obtenidos con respecto a la frecuencia y asociación de la mutación FLT3-ITD en las muestras analizadas, se obtuvo una correlación con lo reportado en la ultima revisión de la Organización Mundial de la Salud (OMS) sobre neoplasias hematológicas, esto es, la mutación es frecuentemente identificada en pacientes con leucemia promielocítica aguda [t(15;17)(q22;q12)]. En cuanto a la detección de la mutación utilizando la metodología AS-PCR, los resultados obtenidos mostraron una mayor sensibilidad de la prueba utilizando cDNA como templado, ya que se lograron detectar 8 muestras positivas más que las obtenidas con DNA. Esta discrepancia en la detección de la mutación en el gen FLT3 ha sido previamente reportada por dos gruos de investigación diferentes [7 y 8] y en ambos casos la utilización de cDNA resulta en una mejor identificación del marcador. El aumento de la sensibilidad del ensayo de detección de la mutación FLT3-ITD utilizando el cDNA posiblemente se deba al origen de la muestra, es decir, el RNA que se extrae sufre un proceso de amplificación para la síntesis del cDNA y posteriormente otra amplificación en la reacción de PCR, incrementando la concentración de la secuencia blanco, lo que no ocurre en el caso del DNA. De esta forma un ensayo AS-PCR a partir de RNA permite que un menor número de clonas positivas para la mutación sean mas facilmente detectadas.

CONCLUSIONES

La mutación FLT3-ITD es un marcador genético importante en el pronóstico y seguimiento de la leucemia mieloide aguda. Con base en los resultados obtenidos, la determinación de esta mutación mediante AS-PCR es más sensible cuando se utiliza cDNA como templado, permitiendo así una detección temprana de este marcador.

REFERENCIAS

[1] Griffith J, Black J, Faerman C, Swenson L, Wynn M, Lu F, et al. The Structural Basis for Autoinhibition of FLT3 by the Juxtamembrane Domain. Mol Cell [Internet]. 2004 Jan 30 [cited 2014 Nov 4];13(2):169–78. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14759363

[2] Stirewalt DL, Radich JP. The role of FLT3 in haematopoietic malignancies. Nat Rev Cancer [Internet]. 2003 Sep [cited 2014 Jul 16];3(9):650–65. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12951584

[3] Meshinchi S, Appelbaum FR. Structural and functional alterations of FLT3 in acute myeloid leukemia. Clin Cancer Res [Internet]. 2009 Jul 1 [cited 2014 Oct 28];15(13):4263–9. Available from:http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2716016&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

[4] Parcells BW, Ikeda AK, Simms-Waldrip T, Moore TB, Sakamoto KM. FMS-like tyrosine kinase 3 in normal hematopoiesis and acute myeloid leukemia. Stem Cells [Internet]. 2006 May [cited 2014 Oct 30];24(5):1174–84. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16410383

[5] Martelli MP, Sportoletti P, Tiacci E, Martelli MF, Falini B. Mutational landscape of AML with normal cytogenetics: biological and clinical implications. Blood Rev [Internet]. Elsevier Ltd; 2013 Jan [cited 2014 Aug 21];27(1):13–22. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23261068

[6] Libura M, Asnafi V, Tu A, Delabesse E, Tigaud I, Cymbalista F, et al. FLT3 and MLL intragenic abnormalities in AML reflect a common category of genotoxic stress. Blood. 2003;102(6):2198–204.

[7] Swerdlow, S.H., Campo, E., Harris, N.L., Jaffe, E.S., Pileri, S.A., Stein, H., Thiele, J., Vardiman J., editor. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4a ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC); 2008.

[8] Schnittger S, Schoch C, Dugas M, Kern W, Staib P, Wuchter C, et al. Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. Blood [Internet]. 2002 Jul 1 [cited 2014 Oct 22];100(1):59–66. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12070009

ACC DEAMINASE ACTIVITY AND EVALUATING ACDS GENE IN ENDOPHYTIC AND SOIL MICROORGANISMS.

(Actividad de ACC desaminasa y evaluación del gen acdS en microorganismos endófitos y de suelo)

Alexia Mejía-del Río[a] *, Aurora Huerta-Valle[b], Miguel Beltrán-García[a+].

[a]Laboratorio 309, Departamento de Química, Instituto de Ciencias Exactas y Terrestres (ICET), Universidad Autónoma de Guadajalara (UAG), Av. Patria 1201, Col. Lomas del Valle, C.P. 45129, Zapopan, Jalisco, Méx. *Mejía del Río Alexia, alexia.mejiadr@hotmail.com
Área del Conocimiento: Biología Molecular.
[b]Universidad Autónoma de Baja California (UABC), Departamento de Ingenierías, Mexicali, Baja California.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: mbeltran71@hotmail.com

Área del Conocimiento: Biología Molecular.

ABSTRACT
Plant growth and their productivity are negatively affected by high ethylene levels produced under different stress conditions such as extreme temperature, intense light, flooding, drought, radiation, high salinity, and biotic stress. To inhibit ethylene-biosynthesis in plants, it is necessary to avoid the transformation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC), the immediate precursor for ethylene biosynthesis. This can be achieved with the aids of microorganisms that owns the enzyme ACC deaminase, encoded by the acdS gene. This enzyme is able to use ACC as substrate and nitrogen source and transform it into α-ketobutyric acid, preventing the plant to get into ethylene stress. In addittion to this enzyme, some bacteria can also act as plant growth promoters. In order to select microorganisms that have the presence of the ACC deaminase, some pairs of oligonucleotides (primers) were designed based on the gene sequence of acdS gene in *Trichoderma asperellum* and *Pseudomonas brassicacearum* from the NCBI database. Based on primers designed, PCR conditions were established experimentally; denaturation at 95 °C for 5 minutes, followed by 30 cycles: denaturation for 30 seconds at 95 °C, alignment for 30 seconds at 55 °C and the elongation for 30 seconds at 72 °C followed by a final elongation for 5 minutes at 72 °C. A nested PCR was performed for acdS amplification in the endophytic *Pseudomonas putida*, the product obtained has approximately 200bp, this product was purified for sequencing. Subsequently *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, as well as *Trichoderma* strains, will be assessed to determine the presence of this gene and thus evaluate the enzymatic activity of ACC deaminase spectrophotometrically. All of this microorganisms are important for us as inoculants to improve plant production.

Keywords: ACCdeaminase; ethylene; acdS; 1-aminocyclopropane-1-carboxylic-acid.

BIOINFORMATIC ANALYSIS OF ASSOCIATED GENES IN THE PLANT-ENDOPHYTE BACTERIA INTERACTION AND ORGANIC NITROGEN TRANSFER IN BANANA (*Musa acuminata*)

[Análisis bioinformático de genes asociados en la interacción planta-endófito y en transferencia de nitrógeno en banano (*Musa acuminata)*]

Aurora X. Huerta Robles[*a], Rafael Villa Angulo[a] , Miguel J. Beltrán García[b+].

[a] Universidad Autónoma de Baja California, Instituto de Ingeniería, Mexicali, Baja California, CP 21280,
[b] Universidad Autónoma de Guadalajara, ICET, Zapopan, Jalisco, CP 45129

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: mbeltran71@hotmail.com

Área del Conocimiento: Biología Molecular.

ABSTRACT
To maintain the necessary yields of crop production chemical fertilization is required, especially ammonium, nitrate and urea. In Mexico approximately 35% of the production cost is destined to apply N-fertilizers. However these high rates of fertilization caused plants disease susceptibility, soil organic matter degradation and environmental pollution by volatilization or leaching of nitrogen sources. Plants acquire nutritional requirements through symbiotic interactions with non-pathogenic microorganisms, in addition to growth promotion, phytohormones and defence molecules. In other hand, plant roots attract microorganisms through the production of exudates, which serve as source of nutrients and signalling molecules to establish an interaction. In this context, we have a special interest in those microorganisms that have specialized as endophytes. For us is necessary understand the molecular mechanisms needed to penetrate, root colonization and, activation of membrane transporters especially those related to organic and inorganic nitrogen transport, also the mechanism for activating defence and oxidative stress response. Sequences of Amino acid-preserved regions obtained from the NCBI database for proteins related with cell wall remodeling were selected to design primers. The efficiency of these primers was tested *in silico* to verify their qualities to obtain primers with the expected characteristics. The DNA from roots was obtained with the reagent DNAzol and the PCR to amplificate the genes pectinase, cellulose syntase, expansins and arabinogalactan-protein was performed. PCR products were sent to be sequenced to design qPCR primers, in order to compare the expression in different bacterial colonization experiments. This information will be analyzed by bioinformatics tools that can be applied to elucidate the mechanism through which the roots selectively internalized beneficial microorganisms and facilitate the acquisition of organic nitrogen in the soil, and will be applied to optimize biomass production of major crops using endophytic bacteria as bio-fertilizers for agro-biotechnological solutions.

Keywords: bacterial endophyte, biofetilization, symbiosis, plant microbe signalling.

PROTEOMIC ANALYSIS OF ENTOMOPATHOGENIC NEMATODE *Steinernema carpocapsae* (RHABDITIDA: STEINERNEMATIDAE) INDUCED IN HAEMOLYMPH AND GUT OF *Galleria mellonella* (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE)

(Análisis proteómico del nematodo entomopatógeno *Steinernema carpocapsae* [Rhabditida: Steinernematidae] inducido en hemolinfa e intestino de *Galleria mellonella* [Lepidoptera: Pyralidae])

Miguel Ángel González-Reyes[a]*, Hilda Eréndira Ramos-Aboites[a], Rafael Montiel[a+]

[a] Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Irapuato.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: montiel@langebio.cinvestav.mx

Área del Conocimiento: Biología Molecular.

ABSTRACT
Among the different existing methods for biological control are the entomopathogenic nematodes, which have a symbiotic relationship with bacteria, and can thus develop a lethal septicemia in parasitized insects. The entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* naturally coexist with the symbiotic bacterium *Xenorhabdus nematophila*, which is capable of causing septicemia and express a wide range of toxic factors, which induce the death of the host. The nematode itself also produces toxic factors of peptide nature that cause insect death, nevertheless, the relevance of these factors is not fully understood. Therefore, in order to identify nematode's proteins relevant to the process of parasitism, we induced individuals of *Steinernema carpocapsae* with haemolymph and gut tissues of the insect pest *Galleria mellonella*. We hypothesize that proteins differentially expressed by entomopathogenic nematode *S. carpocapsae* induced with haemolymph and gut of *G. mellonella*, are related with the processes that take place in early stages of parasitism. Induction times were of one hour, two hours, four hours and eight hours. To eliminate the presence of significant amounts of the symbiont bacteria, we used the specific antibiotic nalidixic acid. By two-dimensional electrophoresis (2D-PAGE) and the software PDQuest an identification of differential spots was performed. These spots were further analyzed by mass spectrometry for the identification of the resulting proteins and finally the bioinformatics software Blast2Go was used to obtain functional annotations for the identified proteins. Twenty differential proteins were identified and functional annotations for most of them. Four of them could be strongly related to evasion of the host immune response.

Keywords: entomopathogenic nematodes; parasitism; *Steinernema*; *Xenorhabdus; Galleria*; immune response.

RESUMEN
Dentro de los diferentes métodos de control biológico existentes, se encuentran los nematodos entomopatógenos, los cuales presentan una relación simbiótica con bacterias, pudiendo así desarrollar una septicemia letal en insectos parasitados. El nematodo entomopatógeno *Steinernema carpocapsae* coexiste naturalmente con la bacteria simbionte *Xenorhabdus nematophila*, la cual es capaz de causar

septicemia y expresar un amplio conjunto de factores tóxicos, que inducen la mortalidad del huésped. El nematodo por sí mismo también produce factores tóxicos de naturaleza peptídica, que ocasionan la mortalidad del insecto, no obstante la relevancia de estos factores no es completamente conocida. Por lo tanto, con la finalidad de poder identificar proteínas del nematodo específicamente importantes para el proceso de parasitismo, se indujeron individuos de *Steinernema carpocapsae* con hemolinfa e intestino del insecto plaga *Galleria mellonella*. Se hipotetizó que las proteínas expresadas diferencialmente por el nematodo entomopatógeno *S. carpocapsae* en inducción con hemolinfa e intestino de *G. mellonella*, están relacionadas con los procesos que se llevan a cabo en etapas tempranas del parasitismo. Se aplicaron tiempos de inducción de una hora, dos horas, cuatro horas y ocho horas. Para eliminar la presencia significativa de la bacteria simbionte, se utilizó el antibiótico específico ácido nalidíxico. Mediante electroforesis de dos dimensiones (2D-PAGE) y el software PDQuest se identificaron diferentes manchas diferenciales. Posteriormente estas manchas fueron analizadas por espectrometría de masas para la identificación de las proteínas resultantes y finalmente se utilizó el software bionformático Blast2Go para obtener anotaciones funcionales de las proteínas identificadas. Se identificaron veinte proteínas diferenciales y anotaciones funcionales para la mayoría de ellas. Cuatro de ellas podrían estar fuertemente relacionadas con evasión de la respuesta inmune del huésped.

Palabras Clave: nematodos entomopatógenos; parasitismo; *Steinernema*; *Xenorhabdus*; *Galleria*; respuesta inmune.

INTRODUCCIÓN

Desde tiempos inmemoriales, el ataque de plagas de insectos representa uno de los problemas más severos en la agricultura. A partir de los años 30 el uso de insecticidas químicos ha sido la alternativa más utilizada debido a su bajo costo. Sin embargo resulta nociva para la salud del hombre y otras especies animales. Adicionalmente su uso excesivo ha contribuido al desarrollo de resistencia a estos insecticidas por parte de las plagas. Una alternativa al control químico de plagas, es la manipulación de las poblaciones de los enemigos naturales de los insectos-plaga para disminuirlas hasta límites tolerables, medida en la cual se basa el control biológico. Esta alternativa comprende formulaciones comerciales conocidas como bioinsecticidas, las cuales emplean organismos patógenos de insectos (entomopatógenos). Desde principio de los años 80, los nematodos entomopatógenos de las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae han sido considerados como agentes biocontroladores de gran importancia [1].

Estos nematodos poseen un número de cualidades atractivas que les dan ventaja sobre otras alternativas de control de plagas [2]. Éstas incluyen su persistencia y viabilidad en el suelo. No contaminan, por lo que son seguros para el ambiente y no causan una mortalidad indiscriminada. Presentan cierta especificidad hacia insectos, lo que los hace seguros e inocuos para el usuario. Tienen un rango extenso de hospederos por lo que pueden controlar una gran variedad de plagas de importancia agrícola. Se encuentran disponibles a nivel comercial, por su habilidad de crecer en medio artificial, lo que permite su producción en masa [3]. Los nematodos entomopatógenos de los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis* presentan una relación simbiótica (mutualista) con bacterias del género *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* (ambas Enterobacteriaceae) respectivamente [4]. Cada bacteria simbiótica es requerida para matar al insecto huésped y para digerir los tejidos del mismo, proporcionando de esta manera los nutrientes adecuados para el crecimiento y desarrollo de los nematodos [5]. El ciclo de vida

básico de la mayoría de los nematodos entomopatógenos consiste de varias etapas: una etapa de huevo, cuatro estadios juveniles y una compleja etapa de adulto [6]. Las formas infectivas de estos nematodos, que corresponde a un tercer estadio larval con doble cutícula (recubierto con la cutícula del segundo estadio larval), es la única fase del ciclo biológico del nematodo que se encuentra fuera del huésped. En este tercer estadio larval conocido como infectivo juvenil o también llamado "larva dauer", el nematodo no se alimenta, posee la boca y el ano cerrados y es capaz de sobrevivir en el suelo por varios meses hasta encontrar a un huésped susceptible [7]. Una vez que el nematodo ha localizado al insecto, debe penetrar en su interior a través de las aberturas naturales [8]; penetrando posteriormente al interior del hemocele. Cuando el nematodo ha alcanzado el hemocele se procede a la liberación de la bacteria simbionte, a través de defecación o regurgitación [9].

La bacteria comienza a multiplicarse en la hemolinfa a tal grado, que el insecto muere por septicemia, alrededor de 24 o 48 horas después de haber ocurrido la infección [10]. Al inicio de la infección bacteriana, ésta recibe ayuda de productos de excreción del nematodo, que reprimen el sistema inmunitario del insecto; inhibiendo así la acción de enzimas antibacterianas [11], lo que permite una rápida multiplicación bacteriana. Posteriormente la bacteria produce antibióticos para inhibir el crecimiento de otros microorganismos en el cadáver del insecto [12]. El nematodo se encuentra así en condiciones de establecerse en un cultivo monoxénico de su bacteria simbionte, dentro del cadáver del huésped. A partir de este momento y por medio de la acción de enzimas proteolíticas liberadas por la bacteria, se produce la destrucción total de las estructuras internas del huésped, lo que proporciona los nutrientes necesarios para el desarrollo del nematodo [13]. En el momento en que los recursos alimenticios comienzan a disminuir, se produce el desarrollo de nuevas formas de larvas infectivas juveniles, que saldrán del cadáver del insecto para buscar un nuevo huésped. A temperatura ambiente, el ciclo biológico de la mayor parte de los steinernemátidos, varía de 7-10 días [14]. No obstante, algunas características fundamentales de estos organismos no han sido exploradas por completo, incluyendo los mecanismos que les permiten lograr un parasitismo completo y cuáles son las proteínas sintetizadas para hacer frente al sistema inmunológico de los insectos, desde el punto de vista bioquímico. Para contribuir al estudio y análisis de las proteínas sintetizadas por los nematodos entomopatógenos, se eligió al nematodo *Steinernema carpocapsae* como modelo de estudio de esta investigación, ya que éste es uno de los nematodos entomopatógenos más utilizados para el control biológico y sería de gran importancia determinar las proteínas involucradas en el proceso patogénico de insectos plaga.

De tal manera, para consolidar el análisis de las proteínas sintetizadas y sus funciones, se utilizará un insecto huésped que tenga un impacto mundial como plaga agrícola, el cual es *Galleria mellonella*, conocida también como la polilla de la cera, y se llevará a cabo la identificación y análisis de proteínas expresadas cuando el nematodo *S. carpocapsae* está en contacto con la hemolinfa e intestino de la polilla huésped; utilizando ácido nalidíxico como antibiótico en contra de la bacteria simbionte *Xenorhabdus nematophila*, permitiendo de esta manera el estudio específico de las proteínas sintetizadas únicamente por el nematodo.

MÉTODOS

Se utilizó la metodología desarrolladla por Bedding [15] para poder producir nematodos infectivos juveniles *in vito*. También se disectaron larvas de *Galleria mellonella* para la obtención de intestinos requeridos para los procesos de inducción posteriores. A su vez también se utilizaron demás larvas de *G. mellonella* para la obtención de hemolinfa necesaria para los procedimientos de inducción. Se realizaron

procesos de inducción del nematodo *S. carpocapsae* en contacto con la hemolinfa e intestino de las larvas de *G. mellonella*; manejando tiempos de 1hr, 2hs, 4hs y 8hs. Todos los procesos de inducción fueron realizados con tres replicas inducidas tanto con hemolinfa, como con intestino, y con dos controles negativos a los que no se les agregó ni hemolinfa, ni intestino (es importante mencionar que durante todos los procesos de inducción se aplico sobre los nematodos el antibiótico específico en contra de su bacteria simbionte). Posteriormente por medio de sonicación se extrajo la proteína de los nematodos ya inducidos, misma que se limpio con el sistema ó kit 2 D Clean-up (GE Healthcare). Después se cuantifico la proteína mediante el método de Bradford [16] y se continuó con la separación de la misma mediante electroforesis de dos dimensiones. Durante la electroforesis de dos dimensiones se utilizaron tiras con rangos de pH de 3-10 y de 4-7, con longitudes de 7 cm únicamente. Una vez que se obtuvieron los geles de dos dimensiones correspondientes a todos los procesos de inducción, fueron analizados mediante el programa especializado PDQuest (Bio-Rad) y los spots diferenciales resultantes, fueron analizados mediante espectrometría de masas (ion trap LTQ Velos Thermo-Fisher). Los resultados obtenidos fueron comparados con la base de datos del genoma de *S. carpocapsae*, utilizando el programa de análisis SEQUEST, de donde se obtuvieron varias proteínas identificadas. Las proteínas resultantes fueron integradas al software bioinformático Blast2Go, obteniendo anotaciones funcionales de secuencias caracterizadas similares o de la misma proteína.

RESULTADOS

Mediante el análisis con el programa PDQuest (Bio-Rad) se obtuvieron 16 spots o manchas diferenciales en las condiciones de inducción. Para validar que las manchas fueran realmente diferenciales, se determinó que éstas debían estar presentes en por lo menos dos de las tres réplicas y ausentes en ambos controles negativos. Es decir, las diferencias fueron cualitativas en el sentido de presencia-ausencia. A continuación se muestra una figura (Figura 1) en donde se representa uno de dichos casos:

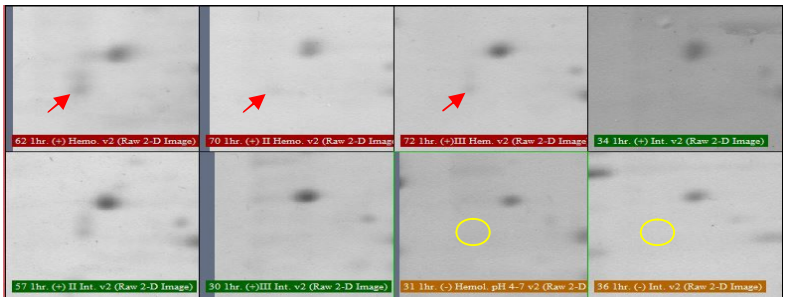


Figura 1. Mancha diferencial con *pI* de 4.1 y PM de 14 kDa. Las flechas indican la presencia de la mancha diferencial en las muestras tratadas con hemolinfa y los círculos, la ausencia en los controles negativos (en este caso no se presentó la mancha diferencial en las muestras tratadas con intestino).

Se obtuvieron además dos manchas significativamente mayores en las muestras inducidas con intestino y/o hemolinfa que en los controles. Para estos casos por tanto, la diferencia fue cuantitativa. A continuación se incluye una figura (Figura 2) en donde se representa uno de estos casos:

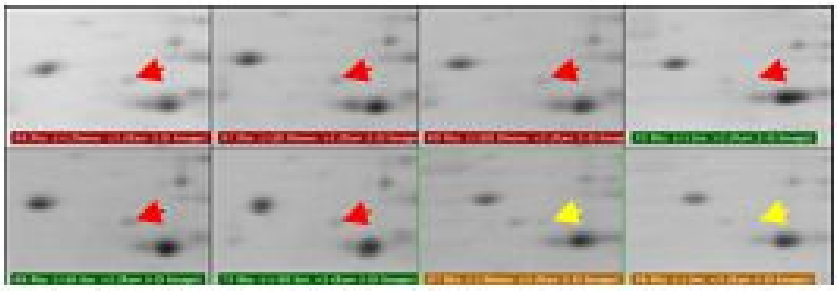


Figura 2. Mancha con diferencia cuantitativa significativa de *pI* de 4.5 y PM de 16.3 kDa. Presencia de la mancha en inducción con hemolinfa e intestino (en mayor proporción), señalado con flechas rojas, y en controles negativos (en menor proporción), señalado con flechas amarillas.

Cuadro 1. Características descritas en bases de datos de algunas proteínas identificadas.

Proteína identificada	Descrita previamente en	Estatus	Función
Proteína CBN-EEF-1B.1	*Caenorhabditis brenneri*	Inferida por homología	Endocitosis mediada por receptores, actividad de factor de elongación (regulación), almacenamiento de lípidos, etc.
Proteína 4c de cuerpo multivesicular	*Ascaris suum*	Proteína hipotética	Presente en membrana endosomal, proteína de transporte, etc.
Peptidasa A1	*Haemonchus contortus*	Inferida por homología	Actividad de endopeptidasa
Proteína perteneciente a la familia de proteínas lipocalinas/citosol de unión a ácidos grasos	*Wuchereria bancrofti*	Inferida por homología	Unión a lípidos y transporte de moléculas

A partir de las manchas diferenciales se obtuvo un total de 19 proteínas identificadas mediante el análisis de espectrometría de masas y solo una proteína secuenciada la cual no se logró identificar. En el Cuadro 1 se muestran algunas de las proteínas identificadas, junto con algunas anotaciones funcionales

acerca de ellas. En la Figura 3 está una gráfica comparativa donde se aprecia la cantidad de proteínas diferenciales obtenidas en los diferentes tiempos de inducción:

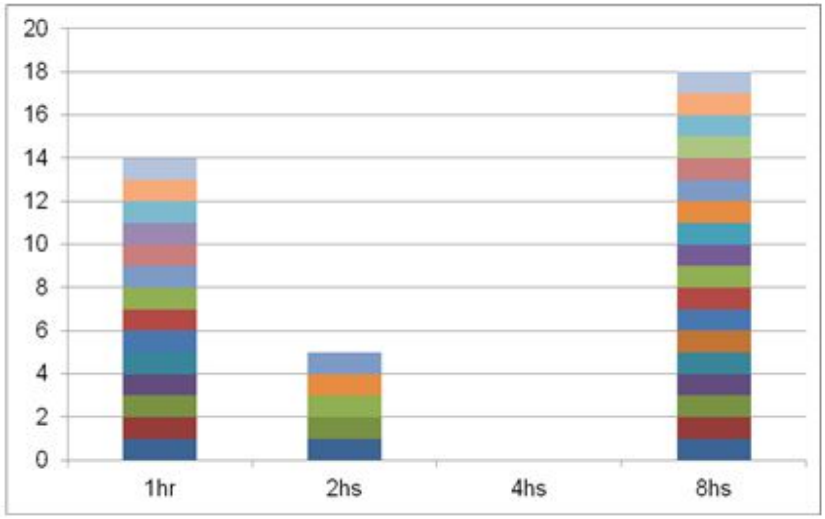


Figura 3. Comparación gráfica del número de proteínas diferenciales pertenecientes a todos los tiempos de inducción.

DISCUSIÓN

Las funciones atribuidas a la proteína CBN-EEF-1B.1, como el almacenamiento de lípidos y estar involucrada en procesos de endocitosis, podrían estar relacionadas con células fagocíticas que participan en reacciones de defensa inmune. Los amebocitos, los cuales son un tipo de células involucradas en este tipo de reacciones de defensa inmune [17] están involucrados en diferentes procesos, como en transporte y almacenamiento de sustancias nutritivas [18], encapsulación [19], cicatrización de heridas [20] y fagocitosis [21]. Posiblemente la proteína CBN-EEF-1B.1 podría tener un papel importante en la participación de funciones que desencadenan este tipo de células involucradas en reacciones de defensa inmune. A la peptidasa A1 se le atribuye una función de endopeptidasa [22], lo cual es interesante ya que varios autores han sugerido la posibilidad de que proteasas sintetizadas por *Steinernema carpocapsae*, puedan facilitar la entrada hacia el hemocele del huésped e incluso contrarrestar las defensas del sistema inmune del insecto [23]. La proteína 4c de cuerpo multivesicular podría estar involucrada con el proceso que desempeñan los cuerpos multivesiculares en rutas endocíticas para la degradación de moléculas [24], tomando en cuenta que los procesos endocíticos para los nematodos en contacto con hemolinfa y/o intestino podrían ser mayores que en los nematodos de los controles. La proteína perteneciente a la familia de proteínas lipocalinas/citosol de unión a ácidos grasos, podría estar involucrada en la respuesta inmune, ya que la familia de las lipocalinas, compuesta por varios miembros proteicos, que son definidos en general por la actividad de unión de ligandos lipofílicos, ejercen funciones inmunológicas significativas, porque pueden tener actividad antiinflamatoria o antimicrobiana [25]. Cuatro proteínas diferenciales fueron exclusivas del tiempo de inducción de ocho horas, mientras

que solo una proteína diferencial lo fue para el tiempo de una hora; no se obtuvieron proteínas diferenciales exclusivas para los tiempos de dos y cuatro horas. Sin embargo, los tiempos de dos y cuatro horas de inducción pudieron haber presentado pocas o ninguna mancha diferencial debido a que únicamente se utilizaron geles de dos dimensiones, con rangos de pH de 3 a 10. Casi todas las proteínas diferenciales se expresaron tanto en inducción con intestino como en inducción con hemolinfa, lo cual podría ser indicativo de que el intestino y la hemolinfa de las inducciones originan un estímulo o respuesta muy similar, para desencadenar la expresión de las proteínas diferenciales.

CONCLUSIONES

La proteína CBN-EEF-1B.1, la proteína perteneciente a la familia de proteínas lipocalinas/citosol de unión a ácidos grasos, la peptidasa A1 y la la proteína 4c de cuerpo multivesicular, posiblemente son proteínas que presenten una relación muy estrecha con la respuesta del sistema inmune de *S. carpocapsae*. El tiempo de inducción de ocho horas en contacto con hemolinfa o intestino resultó ser el que presentó mayor cantidad de proteínas diferenciales en comparación con los otros tiempos. El tiempo de inducción de cuatro horas fue el único que no presentó ninguna proteína diferencial.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Rafael Montiel Duarte y la M. C. Hilda Eréndira Ramos Aboites por brindarme la oportunidad de realizar mi tesis profesional en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad de la Unidad de Genómica Avanzada (LANGEBIO) del CINVESTAV-IPN.

REFERENCIAS

[1] Reyes-Vidal, Y., de la Torre, M. (2005), "La producción de nematodos entomopatógenos y su uso para el control biológico de plagas", Claridades, 243-346.

[2] Rodríguez-Solano, R., Almazán-García, C., Armendáriz-González, I. (2004), "Estudios preliminares con nematodos entomopatógenos para el control biológico de la mosca del cuerno, *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae)", Veterinaria, 35: 339-350.

[3] Smart, G.C. (1995), "Entomopathogenic nematodes for the biological control of insects", J. Nematol, 27: 529-534.

[4] Thomas, G.M., Poinar, G.O. (1979), "*Xenorhabdus* gen. nov., a genus of entomopathogenic and entomophilic bacteria of the family Enterobacteriaceae", Int. J. Syst. Bacteriol., 29: 352-360.

[5] Burnell, A.M., Stock, S.P. (2000), "*Heterorhabditis*, *Steinernema* and their bacterial symbionts-lethal pathogens of insects", Nematology, 2 (1): 31-42.

[6] Sicard, M., Ferdy, J.B., Pagés, S., Le Brun, N., Godelle, B., Boemare, N., Moulia, C. (2004), "When mutualists are pathogens: an experimental study of the symbioses between *Steinernema* (entomopathogenic nematodes) and *Xenorhabdus* (bacteria)", J. Evol. Biol., 17: 985-993.

[7] García, F. (1994). Los Nematodos Entomopatógenos (Rhabditida: Steinernematidae y Heterorhabditidae) presentes en Cataluña y su utilización para el Control Biológico de Insectos. (Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona): 13.

[8] Poinar, G. O. (1990). "Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae", in Entomopathogenic nematodes in biological control (Gaugler, R., Kaya, H.K. Eds.). CRC Pess, 23-60.

[9] García, F. (1994). Los Nematodos Entomopatógenos (Rhabditida: Steinernematidae y Heterorhabditidae) presentes en Cataluña y su utilización para el Control Biológico de Insectos. (Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona): 14.

[10] Burnell, A.M., Stock, S.P. (2000), "*Heterorhabditis*, *Steinernema* and their bacterial symbionts-lethal pathogens of insects", Nematology, 2 (1): 31-42.

[11] Gotz, P., Boman, A., Boman H.G. (1981), "Interactions between insect immunity and an insect-pathogenic nematode with symbiotic bacteria", Proc. Roy. Soc. London Ser. B, 212: 333-350.

[12] Akhurst, R.J. (1982), "Antibiotic activity of *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes of the families Heterorhabditidae and Steinernematidae", J. Gen. Micro., 128: 3061-3065.

[13] Gerritsen, L.J., Raay, G., Smits, P.H. (1992), "Characterization of form variants *Xenorhabdus luminescens",* Appl. Envir. Microbiol., 58: 1975-1979.

[14] García, F. (1994). Los Nematodos Entomopatógenos (Rhabditida: Steinernematidae y Heterorhabditidae) presentes en Cataluña y su utilización para el Control Biológico de Insectos. (Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona): 16.

[15] Bedding, R.A. (1984), "Long scale production, storage and transport of the insect parasitic nematodes *Neoaplectana* spp.", Ann. Appl. Biol., 104: 117-120.

[16] Bradford, M.M. (1976), "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", Anal. Biochem., 72: 248-254.

[17] Adamowicz, A., Wojtaszek, J. (2001), "Morphology and phagocytotic activity of coelomocytes in *Dendrobaena veneta*", Zoologica Poloniae, 46: 91-104.

[18] Valembois, P., Cazaux, M. (1970), "Etude autoradiographique du role trophiques des cellulles chloragogenes des vers de terre", CR. Soc. Biol., 164: 1015-1021.

[19] Valembois, P., Lassehues, M., Roch, P. (1992), "Formation of brown bodies in the coelomic cavity of the earthworm *Eisenia fetida andrei* and attendant changes in shape and adhesive capacity of constitutive cells", Dev. Comp. Immunol., 16: 95-101.

[20] Byzowa, J.B. (1974), "The dynamics of some blood indices in earthworm (Oligochaeta)", Rev. Ecol. Biol. Sol., 11: 325-332.

[21] Stein, E., Avtalion, R.R., Cooper, E.L. (1977), "The coelomocytes of the erthworm *Lumbricus terrestris*: morphology and phagocytic properties", J. Morphol, 153: 467-478.

[22] Binns, D., Dimmer, E., Huntley, R., Barrell, D., O´Donovan, C., Apweiler, R. (2009), "QuickGo: a web-based tool for Gene Ontology searching", Bioinformatics, 25 (22): 3045-3046.

[23] Toubarro, D., Lucena-Robles, M., Nascimento, G., Santos, R., Montiel R., Veríssimo, P., Pires, E., Faro, C., Coelho, A., Simões, N. (2010), "Serine protease-mediated host invasión by the parasitic nematode *Steinernema carpocapsae*", J. Biol. Chem., 285: 30666-30675.

[24] Piper, R.C., Katzmann D.J. (2010), "Biogenesis and function of multivesicular bodies" Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 23: 519-547.

[25] García-Morán, G.A., García-Cardona, A. (2008), "Aspectos biomédicos de las inmunocalinas en la especie humana", Univ. Méd. Bogotá, 49 (1): 77-96.

GENETIC DIVERSITY IN WILD SPECIES OF THE GENUS *Polianthes*

(Diversidad genética en especies silvestres del género *Polianthes*)

Javier Cuauhtémoc Fragoso Jiménez[a*+], Rodrigo Barba González[a], Patricia Dupre[a], Ma. Claudia Castañeda Saucedo[b], Ernesto Tapia Campos[a]

[a] Unidad de Biotecnología Vegetal, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. / Camino arenero, Guadalajara, Jalisco C.P. 44270, México.
[b] Centro Universitario del Sur, Universidad de Guadalajara (CUSUR-UDG) Av. Enrique Arreola Silva No 883, Colonia Centro, C.P.49000, Ciudad Guzmán, Jalisco, México.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: temo_jcfj @hotmail.com

Área del Conocimiento: Biología molecular.

ABSTRACT
Technical AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) was used to determine the level of genetic diversity of wild and cultivated species of the genus *Polianthes* as only been linked based on their morphological characteristics. 11 individuals were analyzed, 9 wild species of *P. montana*, *P. howardii*, *P. platiphylla*, *P. geminiflora var. Clivicola*, *P. zapopanensis*, *P. geminiflora var. Pueblenensis*, *P. pringleii*, *P. tuberosa var. Double* and *P. tuberosa var. Simple*, along with 2 external controls *Prochnyanthes* and *Manfreda*. In the analysis bands by combination of primers was found that the combination Mse + CAT / Eco + ACT had the highest total number of bands. However; It was the combination with the lowest percentage of polymorphism (85.71%), unlike the other two combinations (Mse + CAG / Eco + ACA) and (Mse + CAG / Eco + ACC) where the total number of bands was 95 and 91 respectively, but both combinations polymorphism showed a level of 100%. The product of the level of polymorphism found in individuals could be separated into a cluster dendrogram with average similarity of all individuals of 0.603 with the formation of 3 major groups, Group I consists of individuals of *P. montana*, *P. zapopanensis*, *P. pueblensis*, *P. tuberosa var. Double* and *P. tuberosa var. Simple*; Group II: formed by individuals of the species *P. howardii*, *P. platyphylla*, *P. geminiflora var. Clivicola*, and Group III: formed by individuals of *P. platyphylla* and *P. geminiflora platyphylla var. Clivicola* and the individual's gender *Prochnyantes*. Indicating a wide diversity within the genre as most wildlife is demonstrating the utility of molecular markers such as AFLP to establish phylogenetic relationships between organisms and estimate the variation within populations of *Polianthes*.

Keywords: *Polianthes*; AFLP; Polymorphism; Genetic diversity; Phylogenetic relationships.

RESUMEN
Se usó la técnica AFLP (Amplified Fragment Lenght Polymorphism) para conocer el nivel de diversidad genética de especies silvestres y cultivadas del genero *Polianthes* ya que solo se han relacionado basándose en sus características morfológicas. Se analizaron 11 individuos, 9 especies silvestres *de P. montana, P. howardii, P. platiphylla, P. geminiflora var.* Clivicola*, P. zapopanensis, P. Geminiflora var. Pueblenensis, P. pringleii, P. tuberosa var.* Doble y *P. tuberosa var.* Simple, junto con 2 controles externos de *Prochnyanthes* y *Manfreda*. En el análisis de bandas por combinación de iniciadores se

encontró que la combinación *Mse* + CAT/ *Eco* + ACT presentó el mayor de número de bandas totales. Sin embargo; fue la combinación con el menor porcentaje de polimorfismo (85.71%), a diferencia de las otras dos combinaciones (*Mse* + CAG/ *Eco* + ACA) y (*Mse*+CAG/*Eco*+ACC) donde el número de bandas totales fue 95 y 91 respectivamente, pero en ambas combinaciones presentó un nivel de polimorfismo del 100%**.** El producto del nivel de polimorfismo encontrado dentro de los individuos de pudieron separar en un dendograma de agrupamiento con una similaridad promedio de todos los individuos del 0.603 con la formación de 3 grupos principales, el grupo I formado por individuos pertenecientes a *P. montana*, *P. zapopanensis*, *P. pueblensis*, *P. tuberosa* var. Doble y *P. tuberosa* var. Simple; el grupo II: formado por ejemplares de las especies *P. howardii*, *P. platyphylla*, *P. geminiflora* var. Clivicola, y el Grupo III: formado por individuos de *P. platyphylla* y *P. geminiflora* var. Clivicola y el individuo del genero *Prochnyantes*. Lo que indica una amplia diversidad dentro del género dado que en su mayoría se trata de especies silvestres demostrando así la utilidad de los marcadores moleculares como los AFLP para establecer relaciones filogenéticas entre organismos y estimar la variación dentro de las poblaciones de *Polianthe*s.

Palabras Clave: *Polianthes*; AFLP; Polimorfismo; Diversidad genética; Relaciones filogenéticas.

INTRODUCCION

El continuo incremento del mercado mundial de plantas ornamentales se traduce en una demanda sostenida de nuevas variedades y/o nuevas especies. Para competir a nivel mundial se requieren productos de calidad superior, flores en contraestación, variedades nuevas o especies únicas. A nivel internacional existe un creciente interés en la utilización y domesticación de especies ornamentales nativas y endémicas, principalmente para el mercado local y en algunos casos para la exportación [1]. El género *Polianthes* L. (*Asparagaceae*), endémico de México, comprende aproximadamente 14 especies, de las cuales seis especies y tres formas se encuentran en el Estado de Jalisco. El principal uso del género es ornamental, representado para este fin por el Nardo (*Polianthes tuberosa* L.). El Nardo también es utilizado para la extracción de esencias para la elaboración de perfumes y como sustituto de jabón; sin embargo, poco se sabe de los niveles de diversidad genética existentes en esta especie [2]. El análisis de la diversidad genética entre poblaciones, entre individuos, y variedades e incluso entre especies ha sido la principal tarea para el mejoramiento genético actual. Sin embargo; los métodos de selección basados principalmente en características morfológicas y fisiológicas has sido ampliamente complementados y en algunos casos remplazados por el uso de los marcadores moleculares.Algunas de las aplicaciones de estas técnicas son: la identificación de materiales duplicados, corrección de materiales mal identificados taxonomicamente, evaluar la diversidad genética presente y el flujo genético en el tiempo. El objetivo del presente trabajo es evaluar la diversidad genética de especies silvestres del género *Polianthes* usando marcadores moleculares AFLP debido a la gran polémica que existe entre diversos autores por definir un nombre específico que delimite a cada especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

El material vegetal consistió en 52 individuos representativos del genero *Polianthes*, así como los individuos de *Manfreda* y *Prochnyanthes* como controles externos; posteriormente se realizó la extracción de ADN, usando el método propuesto por [3] con algunas adaptaciones para el género,

estimando la concentración de ADN total en un gel de calidad de agarosa al 1.0 %. El análisis usando marcadores AFLP se basó en la metodología propuesta por [4], que comprende los pasos de digestión, ligación de adaptadores, preamplificación, amplificación selectiva, electroforesis y tinción y codificación de los fragmentos. Para la digestión se cortaron 500 ng de ADN genómico con dos enzimas de restricción, *Mse* I (invitrogene), *Eco* RI. Los extremos la secuencia de los adaptadores para la ligación de los cortes generados por *Eco* RI fue: 5' CTCGTAGACTGCGTACC 3' y para *Mse* I 5' GACGATGAGTCCTGAG 3'; En la preamplificación se añadieron iniciadores complementarios a los adaptadores con una banda selectiva +1 (*Mse*+C y *Eco*+A). Para la amplificación selectiva se realizaron diferentes combinaciones de iniciadores *Eco* + 3 y *Mse* + 3 (Cuadro 1). Los fragmento se separaron en geles de acrilamida al 6 % en una cámara de secuenciación (Sequi-Gen® GT Nucleic Acid Electrophoresis Cell), los fragmentos se visualizaron por tinción con nitrato de plata usando el procedimiento descrito por [5]. Las bandas de AFLP fueron codificadas asignando el valor de 1 a la presencia de una banda dada y 0 a su ausencia; formando así, una matriz de código, el análisis se realizó mediante el uso del paquete computacional Sistema de Análisis Estadístico Multivariado (MVSP), versión 3.1 (copyright 1989-2001, kovach Corporation service), en el cual se realizaron los cálculos de similitud entre los ejemplares, se construyó un dendrograma por el método secuencial aglomerativo jerárquico y de agrupamiento. Se estimó el coeficiente de correlación cofenética para determinar la veracidad del arreglo de los agrupamientos entre las matrices de similaridad y cofenética [6].

RESULTADOS

Con las 3 combinaciónes de iniciadores utilizadas se obtuvieron un total de 284 bandas de las cuales 270(95%) fueron polimórficas. El promedio de bandas por combinación fue de 94.66 con un 90% de polimorfismo.

Cuadro 1. Número de bandas y porcentaje de polimorfismo de tres combinaciones de iniciadores usadas en especies silvestres y cultivadas del genero Polianthes.

Combinación *Mse* +3/*Eco* + 3	Número de bandas totales	Bandas Polimórficas	% de polimorfismo
CAG/ACA	95	95	100
CAG/ACC	91	91	100
CAT/ACT	98	84	85.71
Total	284	270	95.23

En el análisis de bandas por combinación de iniciadores se encontró que la combinación *Mse*+ CAT/ *Eco*+ACT presentó el mayor de número de bandas totales. Sin embargo; fue la combinación con el menor porcentaje de polimorfismo, a diferencia de las otras dos combinaciones donde el número de bandas totales fue 95 y 91 respectivamente (Cuadro 1), en ambas combinaciones presentó un nivel de polimorfismo del 100%, lo que indica que son las combinaciones que aportan mayor información.

Cuadro 2. Número de fragmentos y promedios de similaridad genética entre diferentes especies silvestres y dos variedades cultivadas del género Polianthes.

Combinación	Similaridad	Similaridad genética entre especies								
		MON	ZAP	TLA	PRI	T.S	T.D	HOW	PLA	CLI
CAG/ACC	0.6214	0.726	0.74	0.733	0.653	0.811	0.895	0.73	0.421	0.663
CAG/ACA	0.5211	0.747	0.582	0.604	0.571	0.791	0.758	0.652	0.516	0.622
CAT/ACT	0.6675	0.857	0.871	0.8163	0.724	0.918	0.888	0.7449	0.48	0.726
Promedio total	0.603	0.776	0.731	0.717	0.649	0.84	0.847	0.708	0.47	0.67

MON: *P. montana*, ZAP: *P. zapopanensis*, TLA: *P.geminiflora Tlaxcala,* PRI*: P.pringleii*, T.S: *P.tuberosa simple, T.D*: *P.tuberosa doble, HOW: P. howardii,* PLA: *P. platyphylla,* CLI: *P. geminiflora var. Clivicola*.

La similaridad promedio de todos los individuos fue de 0.603 (Cuadro 2), lo que indica una amplia diversidad dentro del género esperando este resultado. Por otra parte al observar la similaridad dentro de cada especie las especies silvestres mostraron similaridad menor traducida en una mayor variación genética en relación a las dos variedades cultivadas (*P. tuberosa* cv simple y *P. tuberosa* cv. Doble). De este modo las variedades cultivadas, presentan los valores de similaridad más altos de 0.84, mientras que los valores de similaridad menores se presentaron en *P.platyphylla* con un valor de 0.47 (Cuadro 3). El producto del nivel de polimorfismo encontrado y de la similaridad entre individuos fue 0.62 de similaridad con la formación de 3 grupos (Figura 1).

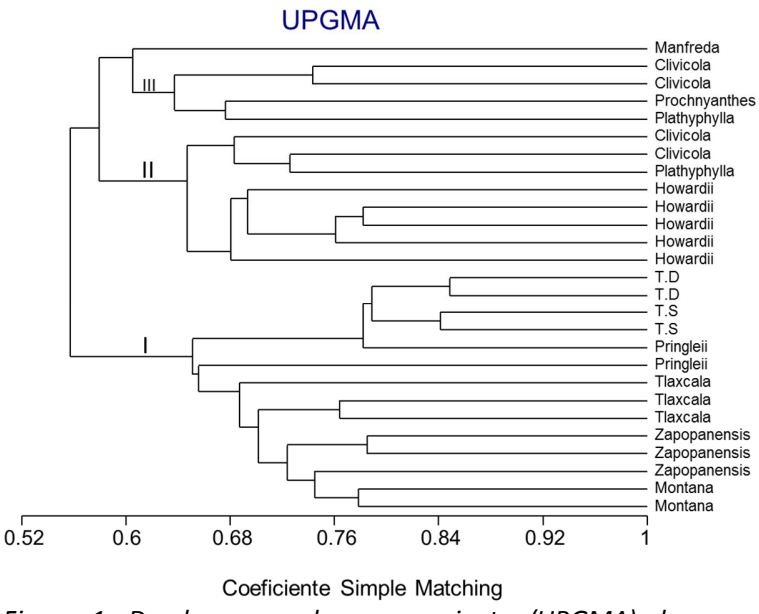


Figura 1. Dendrograma de agrupamiento (UPGMA) de especies silvestres y cultivadas del género Polianthes usando marcadores AFLP (r= 0.84457).

A este nivel de similaridad el único ejemplar que se encontró fuera de estos tres grupos fue el individuo del genero *Manfreda* que junto con el individuo del genero *Prochnyanthes* fueron usados como

controles externos; sin embargo, el último de estos se insertó dentro del agrupamiento de *Polianthes*. A este respecto, se puede mencionar que tanto el género *Polianthes, Prochnyanthes* y *Manfreda*, son los únicos géneros herbáceos de la subfamilia *Agavoidea* (antes familia *Agavaceae*). De tal manera que *Manfreda* se observa muy relacionado a los grupos obtenidos dentro del género *Polianthes.* (Figura 1).

DISCUSIÓN

Desde su creación hasta el momento los AFLP se han convertido en una técnica utilizada en la evaluación de diversidad genética en especies vegetales anuales como pastos [6], soya [7], trigo [8] y maíz [9]; mientras que en especies frutales como uva [10], papaya [11], piña [12]. En el caso del género *Polianthes* no existe antecedente del uso de este tipo de marcadores para su caracterización, por lo que esta información es importante para incrementar el conocimiento respecto al género y junto con características de interés comercial (como el ornamental) hacer un uso más eficiente del mismo. Por su parte Ruiz [13], empleó relaciones interespecificas del género *Pachyphytum*, empleando marcadores genéticos AFLP de 22 especies. De sus resultados reporta un total de 497 bandas distintas con las cinco combinaciones, presentaron un número considerable de bandas polimórficas, lo que se traduce en mayor cantidad de información de cada especie, obteniendo resultados confiables. De éstas resultaron 406 bandas, siendo polimórficas 375, el 92.4 %, el número de bandas polimórficas por combinación de oligonucleótidos varió de 75 a 91, con un promedio de 81.2. Según [13], los AFLPs pueden ser los marcadores más adecuados para el análisis de estabilidad genética. Aunque en el presente trabajo se demostró la utilidad de estos marcadores para evaluar la diversidad del genero *Polianthes*, hubo algunas inconsistencias respecto a la procedencia de los materiales, ya que la separación de estos grupos no fue del todo acorde con las poblaciones de colecta, además de que el individuo del género *Prochnyanthes* apareció inserto dentro de los individuos del genero *Polianthes*. Sin embargo, las combinaciones utilizadas fueron suficientes para diferenciar a todos los individuos, lo cual resulta de mucha importancia ya que si se detecta algún material promisorio con características ornamentales o de tolerancia a factores adversos, pudiera propagarse masivamente por cultivo de tejido y verificar su identidad mediante AFLP además de verificar el estatus híbrido de sus progenies una vez usados en un programa de cruzas controladas.

CONCLUSIONES

La técnica de AFLP fue útil para evaluar la diversidad genética en el género *Polianthes.* La combinación de iniciador que presentó mejores resultado fue la combinación CAT/ACT con un porcentaje de polimorfismo de 85.78%, mostrando el mejor dendograma de agrupamiento y el análisis de coordenadas principales de todas las combinaciones utilizadas en el análisis. A pesar de la diversidad genética existente entre las especies estudiadas, con el uso de los marcadores AFLP permiten discriminar la similitud entre especies del género *Polianthes.* El análisis permitió detectar una importante diversidad entre las especies silvestres evaluadas, resultando de gran importancia valorar los recursos genéticos para su utilización en un programa de mejoramiento genético.

AGRADECIMIENTOS

Fondo mixto CONACYT gobierno del estado de Jalisco 190535.

REFERENCIAS

[1] Weiss, D. (2002). ¨Introduction of new cut flower: domestication of new species and introduction of new traits not found in commercial varieties". In: A. Vainstein (ed.). *Breeding for ornamentals: Classical and Molecular approaches*. Kluwer academic Netherlands 129-137.

[2] R. Barba-Gonzalez, J.M. Rodríguez-Domínguez, M.C. Castañeda-Saucedo, A. Rodríguez, J.M. Van Tuyl, E. Tapia-Campos. (2012). ¨Mexican geophytes I. The genus *Polianthes*". *Floriculture and Ornamental Biotechnology* 6(1): 122-128.

[3] Saghai-Maroof, M. A., K. Soliman, R. A. Jorgensen and R. W. Allard. (1984). ¨Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Medelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics". 81: 8014- 8018.

[4] Vos P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, and M. Zabeau. (1995). ¨AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res*". 23: 4407-4414.

[5] Caetano-Anollés G, Bassam BJ, Gresshoff PM (1992). ¨Primer-template interactions during DNA amplification fingerprinting with single arbitrary oligonucleotides". Mol Gen Genet. 235(2-3):157–165.

[6] Roldán-Ruiz, I. F. (2001). ¨A comparative study of molecular and morphological methods of describing relationships between perennial ryegrass (Lolium perenne L.) varieties. *Theor .Appl.Genet*, 1138-1150.

[7] Ude, G. W. (2003). ¨Genetic diversity of soybean ancestral lines determined by AFLP". *Crop Sci. 43:* , 1858-1867.

[8] Lage, J. M. (2003). ¨Assessment of genetic diversity in synthetic haxaploid wheats and their Triticum dicoccum and Aegilops tauschii parents using AFLP and agronomic traits". *Euphytica 134.*, 305-317.

[9] Beyene, Y. A. (2005). ¨A comparative study of molecular and morphological methods of describing genetic relationships in traditional Ethiopian highland maize". *African J. of Biotech*, 586-595.

[10] Martínez, L. P. (2003). ¨Evaluation of diversity among Argentine grapevine (Vitis vinifera L.) varieties using morphological data and AFLP markers". *Electronic Journal of Biotechnology*, 241-250.

[11] Kim, M. P. (2002). ¨Genetic diversity of Carica papaya as revealed by AFLP markers". *Genome*, 503-512.

[12] Yanes, P. K. (2005). ¨AFLP characterization of the Mexican pineapple germplasm collection". *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* , 575-579.

[13] Ruiz, I. G. (2003). ¨Relaciones Interespecíficas del género *Pachyphytum (Crassulaceae)*,empleando marcadores genéticos AFLP". *Floriculture and Ornamental Biotechnology* 3(1): 12-28.

SELECTION OF ENDOPHYTIC DIAZOTROPHIC BACTERIA BY THE MOLECULAR ANALYSIS OF GENE *NIF-H* USING NESTED PCR OF ISOLATED SEEDS AGAVE (*A. tequilana* WEBER VAR AZUL)

[Selección de bacterias diazotróficas endófitas por el análisis molecular del gen *nif-H* mediante PCR anidada aisladas de semillas de agave (*A. tequilana* Weber var. azul)]

María Carola De la Torre- Becerra[a]*, Jorge Alberto López -Carlos[a], Guadalupe Gálvez- Barbosa[a], Marcela de la Mora-Amutio[a], Tetsuya Ogura[a], Julia Del Carmen Rodríguez- Martínez[a].

[a] Lab 311, Investigación y Desarrollo, Depto. de Química, Universidad Autónoma de Guadalajara. Av. Patria 1201, Lomas del Valle, C.P. 45132, Zapopan, Jalisco. México. Tel (33)36488824 ext. 32433

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: juliam@edu.uag.mx

Área del Conocimiento: Biología Molecular.

ABSTRACT
The agave Azul (*Agave tequilana* Weber var. azul) is one of the agricultural crops with more applications in Jalisco, Mexico. It is essential to find new tools to increase crop performance and improve nutrient utilization in appropriate environmental safety. Little or zero studies has been reported in relation to the endophytic nitrogen-fixing bacterial associations that colonize this plant. Most of the researches have focused on free-living bacteria that develop in soil, such as *Azotobacter, Azospirillum* and *Rhizobium*. Endophytic microorganisms develop part of their life cycle inside the plant without causing it injury. This has caused bigger interest of scientists in the study of beneficial bacteria which can impact plant's growth, through mechanisms as hormone production, antagonism of pathogens or fixing atmospheric nitrogen (diazotrophic Bacteria) and their use in the application as organic biofertilizers that can have impact on crop productivity. The presence of endophytic diazotrophic bacteria was detected in seeds of agave Azul for its characterization in culture media NFB and Congo red growth. The aim of this study is to evaluate the selection of endophytic diazotrophic bacteria by the Molecular Analysis of the expression of the gene nifH as a gene marker encoding the reductase dinitrogenase that is part of the complex nitrogenized enzyme in charge for biological nitrogen fixation, using nested PCR. Research is part of my thesis Project. The isolated bacteria capable of promoting plant growth and fix nitrogen will be used as an opportunity for sustainable crops and contribute in the future to reduce the use of agrochemicals in *Agave* plants.

Keywords: endophytics, diazotrophic bacteria, gene *nif-H*, nested PCR , Agave.

THE ANTI-ANGIOGENIC PEPTIDE Vs30 DOES NOT INCREASE PROLIFERATION OF THE CANCER CELL LINES HeLa AND Jurkat

(El péptido antiangiogénico Vs30 no incrementa la proliferación de las lineas celulares de cáncer HeLa y Jurkat)

Prisiliana Velázquez Bernardino[a*], Antonio De León Rodríguez[a+]

[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., C.P. 78216, México.Tel. 01-444-8342000,

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: aleonr@ipicyt.edu.mx

Área del Conocimiento: Biología Molecular

ABSTRACT
Angiogenesis is essential for the survival and growth of most tumors, and the inhibition of this process provides and attractive anti-tumor therapy. Angiogenesis involves endothelial cell proliferation, migration and degradation of extracellular matrix promoting the metastasis, thus several anti-angiogenic peptides have been development to stop this process. One of them is the Vasostatin (Vs30), which is a small peptide (135-164 a.a.) derived from the Calreticulin. At the moment, it has been reported the inhibition of proliferation of human umbilical vein endothelium-derived ECV30 cells by Vs30 peptide. However, the effect of this peptide on the proliferation of tumoral cells keeps unknown. In the present study, we analyzed three concentrations of Vs on proliferation of Jurkat and HeLa cells, which are typical cancer line cell models. For this 2-4x10^3 cells/ well were incubated with 10, 100 or 1000 nM Vs30, and the percentage of cell proliferation was measured at 24, 48 and 72 h using the MTS kit. We found that Vs30 in the conditions evaluated did not increase the proliferation of Jurkat and HeLa cells until 72 h, in comparison with the control cultures Vs30 free. This find is relevant because a positive effect on the increase of tumor mass is undesirable in the cancer therapy.

Acknowledgments: Thanks CONACyT for postdoctoral fellowship to member with CVU number: 162638, and Victor Balderas for his technical assistance.

Keywords: Anti-angiogenic peptides, Endothelium, Cell proliferation, Cancer.

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF CREOLE AVOCADO (*Persea americana* Mill.) DETERMINED BY ISSRs

[Caracterización molecular de aguacate criollo (*Persea americana* Mill.) determinada por ISSRs]

Graciela López Guzmán[a*], Juan F. Gómez Leyva[b+], Pablo G. Ruelas Hernández[a], Ivonne Carrillo Basañez[a*], Mónica L. Sánchez Herrera[a], Apatzingán Palomino Hermosillo[a]

[a]Posgrado en Ciencias Biológicas Agropecuarias (CBAP), Unidad Académica de Agricultura, Universidad Autónoma de Nayarit. Km 9 carretera Tepic-Vallarta, México.
[b]Profesor-Investigador, Instituto Tecnológico de Tlajomulco de Zuñiga, Jalisco.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: jfgleyva@hotmail.com

Área del Conocimiento: Agrobiotecnología

ABSTRAC
Mexico is the principal producer and consumer of avocado worldwide. The ecotopography conditions in Nayarit and distribution of the genus *Persea,* turn the area into a valuable source of avocado genes. Because this species has a high degree of hybridization, genetic evaluation relationships let it to distinguish different material for breeding programs. The objective was to analyze the genetic diversity of native *Persea americana* from Nayarit by ISSRs. Leaf samples of 45 genotypes were analyzed from five townships; DNA extraction was performed and it's amplified using eight primers. Data were analyzed in the NTSYS program. The genotypes from all localities resulted polymorphic; two large groups defined by altitude characteristics were observed in the dendogram.

Keywords*: Persea americana*; molecular markers; germplasm; ISSRs

RESUMEN
México es el primer productor y consumidor de aguacate a nivel mundial. Las condiciones ecotopográficas de la zona de Nayarit y la distribución del genero *Persea*, convierten el área en un gran acervo genético del aguacate. Debido a que esta especie presenta un alto grado de hibridación, la evaluación de las relaciones genéticas permite distinguir diferente material para programas de mejoramiento. El objetivo fue analizar la diversidad genética de *Persea americana* criollo del estado de Nayarit mediante ISSRs. Se analizaron muestras foliares de 45 genotipos de cinco municipios; se realizó extracción de ADN y su amplificación utilizando ocho iniciadores. Los datos se analizaron en el programa NTSYS. Los genotipos de todos los municipios resultaron polimorficas en el dendograma se observaron dos grandes grupos definidos por características de altitud.

Palabras Clave: *Persea americana*; marcadores moleculares; germoplasma; ISSRs

INTRODUCCIÓN
Persea americana Mill. (aguacate) pertenece a la familia Lauraceae, ampliamente distribuida en el mundo, especialmente en Asia y América. El aguacate se caracteriza por presentar una gran diversidad morfológica [1]. México es considerado centro de origen de *Persea americana* Mill. En Nayarit aún es

posible encontrar plantas silvestres de *P. americana* que forman parte de la vegetación, cuyas características son contrastantes a las variedades mejoradas que se cultivan en diferentes sistemas agrícolas y de forma intensiva, tanto en huertas familiares como de traspatio [2]. La identificación tradicional de las plantas se hace por caracterización fenotípica, procedimiento lento y limitado debido a que la expresión de los caracteres cuantitativos que está sujeta a una fuerte influencia ambiental. Los marcadores moleculares permiten identificar, clasificar y aprovechar la diversidad genética existente en los genomas de las plantas, ya que las diferencias o similitudes a nivel del ADN entre individuos se observa en forma directa [3]. Las relaciones filogenéticas del aguacate han sido estudiadas con diversos marcadores moleculares RFLPs [4,5], minisatélites y microsatélites [6,7] y RAPDs [8]. Sin embargo estos estudios se han dificultado debido a su complejidad genética y a la evolución reticulada de la especie, principalmente debido a la selección y a los múltiples cruzamientos entre las distintas variedades [3]. Los ambientes variados en los que el aguacate ha evolucionado y las diversas formas en que ha sido manejado por diferentes culturas, han producido la gran diversidad de genotipos que actualmente se conocen [9].

MATERIALES Y MÉTODOS

Material genético: se colectaron 10 hojas jóvenes en las ramas de 45 árboles de aguacate en los municipios de Tepic, Xalisco, San Blas, Tecuala y Las Varas, Nayarit., de huertas familiares, traspatio y en su hábitat silvestre.

Caracterización molecular: la extracción de ADN foliar se llevó a cabo en 400 mg de hoja de acuerdo al método descrito por Clarke [10]. La integridad del ADN extraído se evaluó por electroforesis en geles de agarosa al 1% y se visualizó en un transiluminador ultravioleta ChemiDoc- It. La cuantificación del ADN se realizó por espectrofotometría. Las muestras de ADN se diluyeron a 10 ng/µl y se almacenaron a -20 °C para su posterior uso. Para la amplificación del ADN se realizaron pruebas con ocho iniciadores de inter secuencia repetida (ISSR) [11] usados en el presente estudio. La reacción de amplificación fue ajustada a un volumen de 20 µl la cual consistió de 4.0 µl de ADN genómico (40 ng), 1.5 µl mezcla de dNTP, 2.0 µl de iniciadores ISSR (1.0 µM), 2.2 µl 1X taq buffer, 0.2 µl ADN taq polimerasa (1 U. ml-1), 0.8m µl MgCl2 (2.0 mM) y 9.3 µl de ddH2O. El programa térmico de incubación fue 94 °C por 4 min, 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 min, el alineamiento de 52 °C por 1 min, la extensión a 72 °C por 2 min y con extensión final de 5 min a 72 °C. La PCR se llevó a cabo en un termociclador SelecCycler. Cada iniciador fue corrido individualmente.

Electroforesis: la amplificación de los iniciadores se verifico en geles de agarosa al 2 % en buffer de corrida 1X TBE (0.09 M Tris-ácido bórico y 2 Mm de EDTA)
Análisis de datos: Las Bandas de ISSR fueron marcadas en presencia (1) o ausencia (0) de cada una de las muestras de ADN y transformadas en una matriz binaria 0/1. La relación de similaridad genética entre las poblaciones estudiadas, fue estimada por el método de pares no ponderados con media aritmética (UPGMA) usando el método de DICE. Los datos de la matriz binaria fueron analizados por Software Sistema de Análisis Multivariado y Taxonómico Numérico (NTSYS).
Los datos de la matriz para diversidad genética de poblaciones fueron analizadas usando el programa TPFGA [12] utilizando las distancias genética de NEi´s [13].

La diversidad genética de las poblaciones se cuantifico de acuerdo por el número de alelos por locus (A), el porcentaje de loci polimórfico (% P), la heterocigosis observada (Ho) y la heterocigosis esperada (He), se realizó un análisis con el programa TPFGA y GenAlEx (Genetic Analysis in Excel) v 6.4.

DISCUSIÓN

Una vez comprobada la viabilidad del método de extracción de ADN, modificado por Guillen *et al.* [14] se procedió a la amplificación con las ocho secuencias de ISSR indicadas, obteniendo una excelente resolución, misma que permitió detectar con facilidad la presencia de las bandas polimórficas. Un ejemplo del polimorfismo detectado es el que se presenta en la Figura 1 con el iniciador CT8RC.

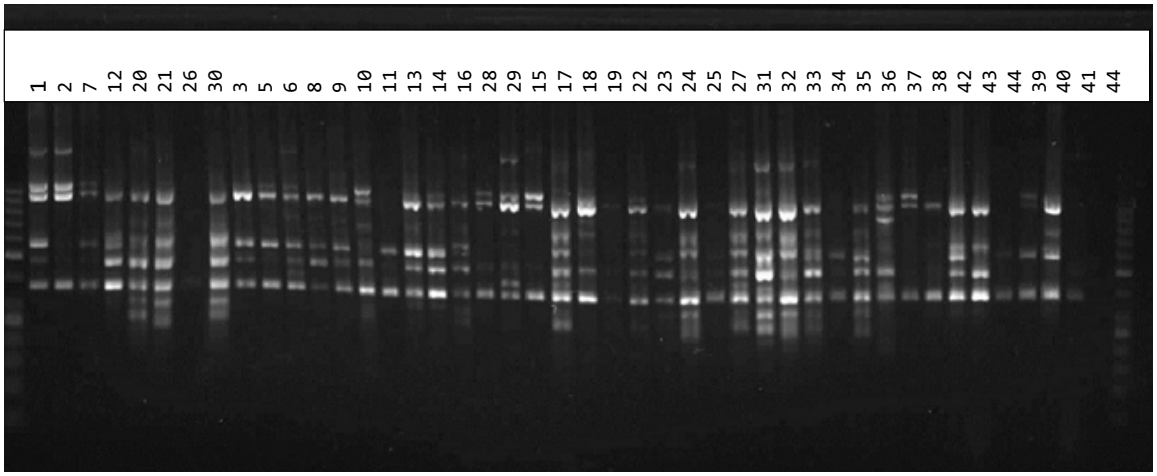


Figura 1.- Perfil genético de genotipos de aguacate criollo obtenido mediante el primer CT8RC.

Nivel de polimorfismo

Con los ocho iniciadores del tipo ISSR utilizados en 45 genotipos de aguacate criollo raza antillana, pertenecientes a cinco municipios, se detectó un total de 82 loci. En todos los casos los iniciadores detectaron polimorfismos en las muestras analizadas, el número de bandas detectadas fue desde 12 hasta 17. En relación con el contenido de información de polimorfismo (PIC) detectado para cada una de las poblaciones (P) vario siendo la P2 del municipio de Xalisco la que dio el valor más alto de 93.90 % y la más pequeña fue la P4 de Las Varas, Nayarit.

Un iniciador detectando polimorfismo fue considerado aquel que detecto al menos una banda diferente entre otros genotipos analizados, es decir las bandas polimórficas fueron las que estuvieron ausentes en al menos uno de los genotipos evaluados, de forma que, aunque una banda estuviera presente en la mayoría de los materiales si falta en uno solo, es considerada polimórfica. En el Cuadro 1 se presentan los resultados completos sobre el polimorfismo detectado por cada una de las secuencias ISSRs utilizadas en el presente trabajo.

Cuadro 1. Parámetros de diversidad genética del aguacate criollo (*Persea americana* Mill.) en cinco localidades muestreadas en Nayarit, México

Población	%loci polimórfico	Heterocigosidad observada (Ho)	Heterocigosidad esperada (He)
P1 (Tepic)	83.93	0. 320	0.3341

P2 (Xalisco)	93.90	0.335	0.351
P3 (San Blas)	91.46	0.341	0.355
P4 (Tecuala)	78.05	0.288	0.308
P5 (Las Varas)	36.59	0.142	0.170
Total de las Poblaciones	63.82	0.238	0.254

En relación con la información del contenido de información de polimorfismo (PIC) detectado para cada una de las secuencias reportadas, los resultados indican que el PIC fluctúo de 78 % hasta 94 %. En general el PIC promedio 86.83 % detectado con este tipo de secuencias es considerado alto por lo cual indica la variabilidad de las ISSRs para estudios de diversidad genética de aguacate. Los resultados obtenidos en este trabajo son muy similares en comparación con el trabajo realizado por Cuirís [15].

La heterocigosidad esperada fue mayor que la observada. En cuanto al índice de heterocigosidad observada de la población tres, presentó un promedio de 0.341, el más alto de todas las poblaciones estudiadas y el de menor valor fue de 0.142 siendo la población cinco (Cuadro 1).

Los datos de los ISSRs para el análisis por distancia genética de las cinco localidades estudiadas generaron el dendograma de la Figura 2.

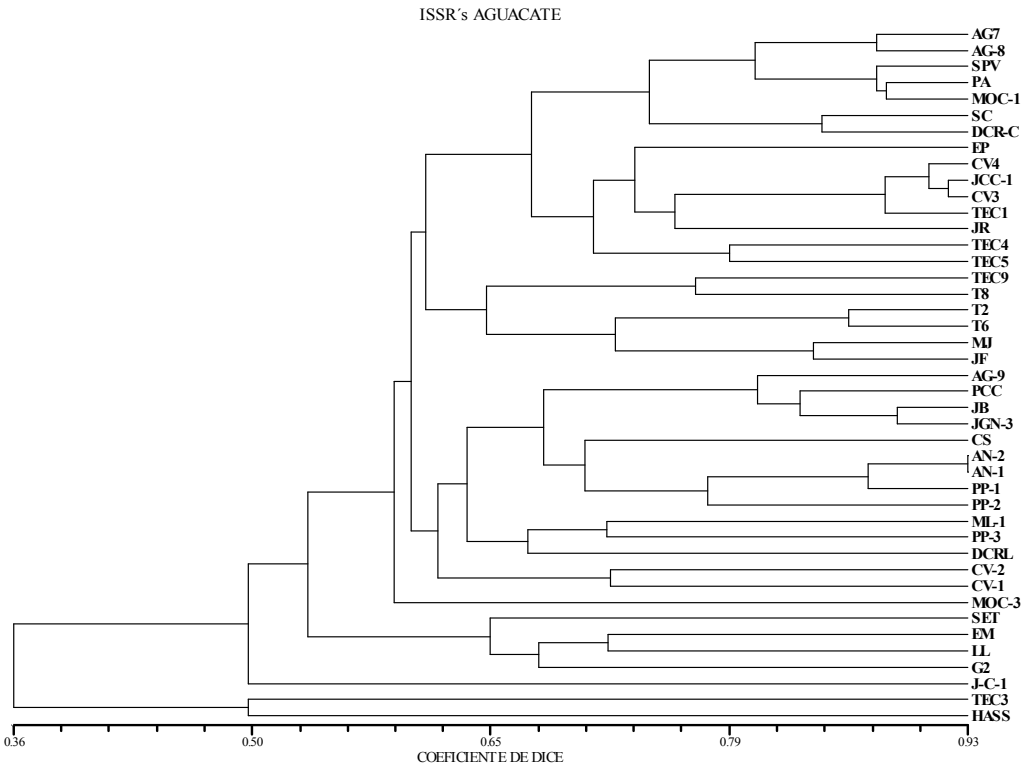


Figura 2.- Dendograma de encadenamiento completo de 45 genotipos de aguacate (*Persea americana* Mill.) criollo obtenido mediante ocho secuencias internas de repetición corta (ISSR).

En el que se observan dos grupos principales, en el grupo I se integraron tres localidades: Tecuala, San Blas y Tepic, dos de ellas tienen la característica en común la altitud ya que se desarrollan a alturas de 24 a 13 m.s.n.m., [16] indican que la altitud es un referente para estimar la diversidad genética, pues un alelo en particular permite mostrar diferencias entre poblaciones, como resultado de la selección natural sobre la altitud. En el grupo II se formó con las localidades de Tepic y Xalisco con una altitud de 956 a 1300 m.s.n.m.

De acuerdo a Ashworth y Clegg [7], las condiciones de agrupamiento de las localidades muestreadas se explican por la complejidad del estado hibrido de los aguacates, debida a la antigua hibridación de la especie o a una diferenciación racial, más reciente de lo que se ha supuesto. Esto, aunado a la antigua relación del aguacate con el hombre y a las diferentes condiciones de domesticación [3], ha resultado en una gran diversidad de genotipos de afinidades genéticas difíciles de separar, mostrada por los individuos colectados en esta investigación.

CONCLUSIONES

Los ocho iniciadores de tipo ISSRs utilizados para el análisis molecular de *P. americana* mostraron alto polimorfismo y reproducibilidad en todas las poblaciones estudiadas en el estado de Nayarit. No se encontraron duplicados entre los genotipos por lo que se pueden conservar como materiales individuales en el banco de germoplasma.

REFERENCIAS

[1] Rowher, J. G. (2000). Toward a phylogenetic classification of the Lauraceas: Evidence from matK sequence Botany. l25,60-71.

[2] Sánchez, J.(1999). “Recursos genéticos de aguacate (*Persea Americana* Mill.) y especies afines en México”, Revista Chapingo, Serie Horticultura. 5: 7-18.

[3]Galindo-Tovar, M.E. (2008). Origen y domesticación del aguacate *(Persea Americana* Mill. LAURACEAE) en Mesoamérica. (Tesis doctoral, Universidad Autónoma del Estado de México, México).

[4] Furnier, G. R. y Bangerth, F. (1998). Genetic relations of avocado (*Persea americana* Mill.) using RAPD markers. Euphitica. 101, 249-255.

[5] Davis, J., Kobayashi, H.M. y Clegg, M.T. (1988). Genealogical relathionsships among cultivated avocado as revealed through RFLP analyses. The American Genetic Association. 89, 319-323.

[6]Mhameed, S., Sharon, D., Kaufman, D., Lahav, E., Hillel, J., Degani, C. y Lavi, U. (1997).Genetic relationships within avocado (*Persea americana* Mill). Cultivar and between Persea species. Theoretical applied Genetics. 94,279-286.

[7] Ashworth, E., Clegg, T. (2003). "Microsatellite markers in avocado (*Persea Americana* Mill.): Genealogical relationships among cultivated avocado genotypes", Journal of Heredity, 94:407-415.

[8] Fielder, J., Buffer, G., Bangerth, F. (1998). Genetic relations of avocado (*Persea americana* Mill) using RAPD markers. Euphitica. 101:249-255.

[9] Chen, H., Morell, L., Asgworth, M., De la Cruz. y Clegg,M. (2009). "Tracing the geographic origins of mayor avocado cultivars", Journal of heredity. 100:56-65.

[10] Clarke, B.C., L.B. Moran and R. Appels. (1989). DNA analysis in wheat breeding genome 32,334-339.

[11] Zietkiewickz, E., Rafalski, A. y Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchores polymerase chain reaction amplification Genomics 20,176-183.

[12]Miller, M.P. 1997. Tools for population genetic analysis (TFPGA) 1.3: a windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. 12 May 2008.

[13] Nei, M., and Li, W. H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Nat. Acad. Sci. 76, 5269-5273.

[14]Guillen, A.H., Alvares, G.G., Vidales, I.F., Ángel, E.P. y Tapia, M.V. (2003). "Asilamiento del ADN genómico del aguacate (*Persea americana* Mill.)", En Memorias de resúmenes del X Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Hortícolas.

[15]Cuirís-Pérez, H., Guillén-Andrade, H., Pedraza–Santos, M. E López-Medina, J. y Vidales-Fernández. I. (2009). Genetic variability within Mexican race Avocado *Persea americana* Mill. germoplasm collection determined by ISSRs. pp 169-175.

[16] Ohsawa, T. y Ide, Y. (2007). Global patterns of genetic varation in plant species along vertical and horizontal gradients on mountains. Global Ecology and Biogeography. 17: 152-163.

DETECTION OF *Candidatus Liberibacter asiaticus* IN CITRUS PLANTS BY REAL-TIME PCR

(Detección de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en cítricos mediante PCR tiempo real)

Luis Felipe Guzmán Rodríguez[a]*+, Manuel de Jesús Bermúdez Guzmán[b], José Joaquín Velázquez Monreal[b], Mario Orozco Santos[b].

[a] Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Centro Nacional de Recursos Genéticos.
[b] Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Tecomán.

*Autor que presentó trabajo.
+ Autor para correspondencia: guzman.luis@inifap.gob.mx

Área del Conocimiento: Agrobiotecnología.

ABSTRACT

Citrus Huanglongbing (HLB) is the most severe disease in citrus, including Mexican lime (*Citrus aurantifolia)*. Three species of *Candidatus* Liberibacter, *Ca*. L. asiaticus, *Ca*. L. africanus, and *Ca*. L. americanus are associated to this disease. In Mexico, the presence of *Ca*. L. asiaticus has been reported in citrus species. To identify these bacteria, iodine-staining, electron microscopy, conventional PCR and real-time PCR are some applied approaches. However, previous reports mentioned that real-time PCR is the most sensitive methodology. Therefore, the objective of this study was the establishment and implementation of a protocol in order to detect *Ca*. L. asiaticus by real-time PCR. Through real-time PCR it is possible to detect the presence of *Ca*. L. asiaticus in citrus plants affected by HLB disease. To establish and implement the detection de *Ca*. L. asiaticus, 380 samples from Mexican lime, sweet orange, Alemow (*Citrus macrophylla*), Persian lime, grapefruit, *C. volkameriana*, sour orange, sweet lime, and other citrus species were included. PCR reactions were prepared in a volume of 25 µL using plates of 96 wells, in which 90 samples and two of each positive, negative and amplification controls were included. The amplification was carried out by real time PCR with Taqman probe and reagents from Taqman Fast Master mix in a StepOne Plus equipment. Concentration of reagents and amplification conditions were according to recommendations of previous reports. Ct data were analyzed in StepOne software version 2.1. Considering a Ct ranged in 0.0 to 36.0 and a typical curve in an amplification plot, we observed 105 (27.6%) positive samples and 272 (71.6%) negative samples, while three (0.8%) specific samples must be retested. Because citrus are crops of economic and social importance in Mexico, the monitoring is a priority activity to reduce transmission and spread of HLB disease.

Keywords: TaqMan probe; 16 rDNA; Greening disease; Huanglongbing.

RESUMEN
La enfermedad más severa en cítricos como el limón mexicano (*Citrus aurantifolia*) es Huanglongbing (HLB). Esta enfermedad se encuentra asociada a tres especies de *Candidatus* Liberibacter: *Ca*. L. asiaticus, *Ca*. L. africanus y *Ca*. L. americanus. En México se ha reportado la presencia de *Ca*. L. asiaticus en varias especies de cítricos. Para la identificación de la bacteria se han utilizado diversas metodologías, entre ellas, tinción con yodo, microscopía electrónica y PCR convencional. No obstante, reportes previos recomiendan el uso de PCR tiempo real debido a la alta sensibilidad. De tal manera que, el objetivo del presente estudio fue establecer e implementar un protocolo de detección de *Ca*. L. asiaticus mediante la técnica de PCR tiempo real. Para el establecimiento e implementación de la metodología de detección de *Ca*. L. asiaticus en cítricos con la enfermedad HLB se incluyeron 380 muestras de DNA genómico de limón mexicano, limón persa, limón dulce, toronja, naranja dulce, naranja agria, *Citrus macrophylla*, *C. volkameriana* y otras especies de cítricos. La amplificación se llevó a cabo por PCR tiempo real con sondas Taqman y reactivos Taqman Fast Master mix en un equipo StepOne Plus. Las reacciones de PCR se prepararon en un volumen de 25 µL sobre placas de 96 pozos, en las cuales se incluyeron 90 muestras y controles positivo, negativo y de amplificación por duplicado. La concentración de reactivos y condiciones de amplificación fueron de acuerdo a reportes previos. Los resultados de Ct se analizaron con el programa StepOne versión 2.1. Con base en el Ct dentro del rango 0.0 a 36.0 y la curva de amplificación típica, las muestras se consideraron HLB positivas. En las muestras analizadas, se observaron 105 (27.6%) positivos y 272 (71.6%) negativos, mientras que en tres muestras (0.8%) no se obtuvo resultado concluyente. Debido al valor económico y social de los cítricos en México, la monitorización de HLB es una actividad de alta importancia para reducir la trasmisión y propagación de la enfermedad.

Palabras Clave: Sonda Taqman; Huanglongbing; Brotes amarillos

INTRODUCCIÓN
Citrus Huanglongbing (HLB) o dragón amarillo es la enfermedad más frecuente en los cítricos [1]. Se caracteriza por un moteado amarillo en el tejido foliar y causa la disminución de la producción de fruto, además puede llegar a causar la muerte de la planta en un tiempo de ocho años de infección [2]. Esta enfermedad es causada por una bacteria Gram negativa del género *Candidatus Liberibacter*, perteneciente a la familia de las *Rizobiaceae.* Es transmitida por el insecto *Diaphorina citri*, el cual ha sido el blanco para combatir la enfermedad mediante el uso de insecticidas [3, 4]. Se han identificado tres diferentes especies de la bacteria asociadas a la enfermedad, *Candidatus* Liberibacter asiaticus (Las), *Candidatus* Liberibacter americanus, y *Candidatus* Liberibacter africanus. En nuestro país se ha reportado la presencia de Las en los estados de Nayarit, Jalisco y Colima en los últimos diez años [1].
La metodología de PCR tiempo real es una técnica de alta sensibilidad por determinar la presencia de la secuencia específica del blanco con base en el empleo de una sonda marcada con fluorescencia que hibrida con el DNA y de un par de iniciadores que delimitan el fragmento amplificado. A diferencia de la PCR convencional o punto final, en PCR tiempo real se conoce el ciclo en el cual la amplificación supera el umbral, conocido como Ct. Este valor permite conocer el grado en que se encuentra presente Las en la muestra, teniendo una relación inversa [4].

METODOLOGÍA
Para el estudio se incluyeron 380 muestras de DNA de cítricos, entre los que se encuentran limón mexicano, naranja dulce, *Citrus macrophylla*, limón persa, toronja, *Citrus volkameriana*, naranja agria,

limón dulce, entre otras especies, procedentes del Campo Experimental Tecomán-Inifap en el estado de Colima, México. Se incluyeron muestras de DNA con valores de pureza dentro del rango 1.8 a 2.0 con respecto a la relación de absorbancias A260/A280. Para la detección de Las en el laboratorio de ADN y genómicas, se estableció e implementó la metodología del ensayo Taqman por PCR tiempo real en un equipo StepOne Plus de Applied Biosystems para la amplificación del gen 16S rDNA de la bacteria *Candidatus* Liberibacter asiaticus con base en las instrucciones de trabajo de la USDA [5], los iniciadores, las sondas marcadas con fluorescencia y las secuencias se observan en la **Tabla 1**. La reacción de PCR se llevó a cabo con 23 µL de master mix (**tabla 2**) y 2 µL de DNA genómico sin diluir. El programa de amplificación constó de 95ºC durante 20 segundos y 40 ciclos a 95ºC por un segundo y 58ºC durante 40 segundos [5].

Tabla 1. Secuencia de iniciadores y sondas utilizadas en la detección de *Candidatus* Liberibacter asiaticus

Nombre primer	**Secuencia**	**Gen Blanco**
HLBas Forward	5'-TCGAGCGCGTATGCAATACG-3'	16S rDNA
HLBas Reverse	5'-GCGTTATCCCGTAGAAAAAGGTAG-3'	
HLBp (sonda)	5'- FAM/AGACGGGTGAGTACCGCG/TAMRA-3'	
COX Forward	5'-GTATGCCACGTCGCATTCCAGA-3'	COX
COX Reverse	5'- GCCAAAACTGCTAAGGGCATTC-3'	
COXp (sonda)	5'- VIC/ATCCAGATGCTTACGCTGG/TAMRA-3'	

Se incluyeron las muestras en cinco placas de PCR de 96 pozos. Cada placa contenía 90 muestras, dos controles positivos, dos controles negativos y dos blancos. En las cinco placas, los resultados de los controles se observaron cómo se esperaban, por lo tanto no se tuvo que repetir ninguna placa. Por otra parte, las muestras que produjeron Ct en HLBas entre 36 y 37 se repitieron para confirmar los resultados. Las muestras con Ct mayor a 36 en COX se volvieron a analizar. Con el propósito de evitar falsos negativos durante la detección, se incluyó un control interno de amplificación en cada reacción individual. El fragmento utilizado fue un segmento del gen COX presente en el genoma de los cítricos. Las muestras en las que no amplificó el control interno, se repitió la reacción.

Tabla 2. Mezcla de reacción para master mix

Master Mix	Concentración inicial	Concentración final	1 Rxn vol (µL)
ddH_2O	-	-	4.7
Taqman Fast Master Mix	-	-	6.3
HLB primers	2 µM	240 nM	3.0
HLB sonda	1 µM	120 µM	3.0
COX primers	2 µM	240 nM	3.0
COX sonda	1 µM	120 nM	3.0
Total			23

RESULTADOS

La detección de Las se realizó en 380 muestras de DNA extraído de limón mexicano y varias especies de cítricos. Se identificaron 105 (28 %) muestras positivas, 272 (71 %) negativas y 3 (1 %) sin resultado concluyente. Los criterios que se consideraron para determinar una muestra como positiva fueron la presencia de Ct menor o igual a 36 [5]. Además, la presencia de la curva de amplificación típica en la gráfica de 'amplification plot', la cual presenta las fases geométrica, linear y estacionaria (**Figura 1**) y que la curva se encuentre por encima del umbral. Por otra parte, para considerar válidos los resultados, se observó la amplificación del gen interno de referencia COX en cada muestra, considerando los mismos criterios. Finalmente, la validez de los resultados depende de la amplificación de ambos controles positivos y no amplificación de los controles negativos y blancos [5] (**Figura 1**).

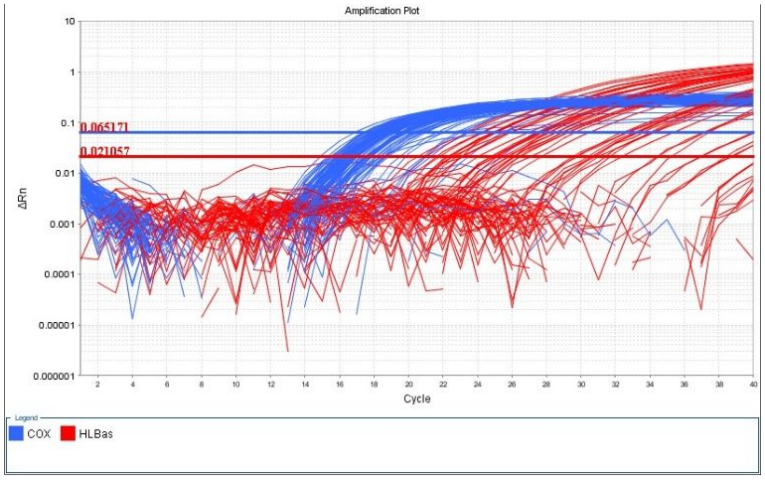


Figura 1.- Gráfica de amplificación. Las líneas rojas representan al 16S rDNA de *Candidatus* Liberibacter asiaticus, mientras que las líneas azules representan al gen COX de referencia del cítrico hospedero. El umbral de detección está representado con las líneas horizontales.

DISCUSIONES

Aunque los síntomas de la enfermedad HLB pueden identificarse visualmente en la planta, se debe llevar a cabo la confirmación mediante métodos de detección con alto grado de sensibilidad y especificidad [6]. Derivado a que *Candidatus Liberibacter spp*. no son cultivables, diferentes tecnologías se han establecido en la detección basadas en radiometría, microscopía electrónica, inmuno-ensayos con anticuerpos, sustancias marcadas con fluorescencia específicas de HLB, PCR punto final y PCR tiempo real [1, 4, 6, 7, 8]. No obstante, la metodología con mayor sensibilidad es PCR tiempo real debido a que, identifica la secuencia específica del gen 16S ribosomal de Las mediante la hibridación de un par de oligonucleótidos y una sonda marcada con fluorescencia. Se ha determinado que el gen 16S rDNA es el indicado para la detección debido a que es altamente conservado en *Ca. Liberibacter spp.* pero la variación en las secuencias es suficiente para realizar el diseño de iniciadores [3, 6].

Otro de los enfoques para la detección es la búsqueda de Las en una cantidad muy grande del psilido en la población, que es una medida rápida y económica de exploración, sin embargo es una medida indirecta [4], se realiza con la técnica de amplificación isotérmica de ácidos nucleicos (LAMP por sus siglas en ingles). Otras metodologías están enfocadas en la cantidad de almidón asociada al incremento en tejido foliar infectado. Las muestras son tratadas con solución de yodo o mediante la captura de

imágenes con el uso de filtros para revelar la acumulación de almidón [7]. Se debe considerar que, la detección precisa de Las en cítricos con síntomas de la enfermedad HLB es un reto importante debido a distribución desigual de la bacteria en las plantas enfermas [9, 10].

Por otra parte, durante el proceso de extracción de ácidos nucleicos, algunos residuos de compuestos del tejido foliar de los cítricos pueden estar presentes en la muestra de DNA afectando el rendimiento de la PCR punto final, no obstante con la implementación del ensayo Taqman, tales inhibidores no afectaron los resultados de la PCR tiempo real a pesar de que se utilizaron muestras sin diluir. Además, la amplificación simultánea del control interno positivo COX y la presencia de la mezcla de primers específicos no afectaron los resultados. Las diferencias de sensibilidad entre PCR punto final y PCR tiempo real son probablemente debidas al uso de la sonda marcada [6]. Además, con la metodología qPCR se obtienen resultados en menor tiempo y con el empleo de ciertos tipos de polimerasas aumenta la eficiencia y se elimina el riesgo de contaminación cruzada. La tecnología Taqman PCR tiempo real ha demostrado ser una herramienta útil en el diagnóstico de HLB [10].

A pesar de la diferencia entre el número de muestras analizadas en el presente trabajo (380) y un reporte previo (76) [6] el porcentaje de muestras positivas es de 28 % y 22 %, respectivamente, no obstante los criterios son diferentes, los autores [6] consideran las muestras positivas a la que presentaron el Ct entre 20 y 30, a diferencia de los recomendado por USDA (Ct<36 en muestras positivas) [5].

Derivado de la frecuencia de *Candidatus* Liberibacter asiaticus encontrada en las muestras analizadas (28%), es necesario implementar y mantener un programa de detección para evitar la propagación de la enfermedad y si es posible, identificar plantas resistentes para su uso en programas de mejoramiento.

CONCLUSIONES

Debido a la importancia económica y social de los cítricos en México y a la presencia de *Candidatus* Liberibacter asiaticus en plantas enfermas con Huanglongbing, actividades de monitorización deben considerarse para reducir la trasmisión de la enfermedad.

REFERENCIAS

[1] Orozco, M., Robles, M.M., Velázquez, J.J., Manzanilla, M.A., Bermúdez, M.J. (2014). El limón Mexicano (*Citrus aurantifolia*). (1 ed.). Tecomán, Colima, México: Libro Técnico Núm. 1. SAGARPA, INIFAP, CIRPAC, Campo Experimental Tecomán, 231-246, 336.

[2] Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Consultado el 10 de septiembre de 2015. Disponible en: http://www.senasica.gob.mx/?id=4512.

[3] Ángel J., Hernández E., Herrera N., Gómez L., Castro A., Sepúlveda A., and Ebratt E. (2014), "Citrus huanglongbing: validation of Real-Time PCR (qPCR) for the detection of Candidatus Liberibacter asiaticus and Candidatus Liberibacter americanus in Colombia", Agronomía Colombiana, 32(3): 377-389.

[4] Keremane M.L., Ramadugu C., Rodriguez E., Kubota R., Shibata S., Hall D.G., Roose M.L., Jenkins D., Lee R.F. (2015). "A rapid field detection system for citrus huanglongbing associated 'Candidatus Liberibacter asiaticus' from the psyllid vector, Diaphorina citri Kuwayama and its implications in disease management", Crop Protection, 68: 41-48.

[5] United State Department of Agriculture. Work Instructions in Real-time PCR for Diagnostic Detection of Citrus Greening or HLB (Huanglongbing) from Plant Samples. Consultado el 2 de septiembre de 2015. Disponible en: http://www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome.

[6] Li W., Hartung J.S., Levy L. (2006), "Quantitative real-time PCR for detection and identification of Candidatus Liberibacter species associated with citrus huanglongbing", Journal of Microbiological Methods, 66: 104-115.

[7] Pourreza A., Lee W.S., Raveh E., Ehsani R., Etxeberria E. (2014), "Citrus huanglongbing detection using narrow-band imaging and polarized illumination", American Society of Agricultural and Biological Engineers, 57(1): 259-272.

[8] Rigano L.A., Malamud F., Orce I.G., Filippone M.P., Marano M.R., do Amaral A.M., Castagnaro A.P., Vojnov A.A. (2014), "Rapid and sensitive detection of Candidatus Liberibacter asiaticus by loop mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick", BMC Microbiol, 6: 14:86.

[9] Morgan J. K., Zhou L., Li W., Shatters R. G., Keremane M., Duan Y. P. (2012), "Improved real-time PCR detection of 'Candidatus Liberibacter asiaticus' from citrus and psyllid hosts by targeting the intragenic tandem-repeats of its prophage genes", Molecular and Cellular Probes, 26: 90-98.

[10] Li W., Levy L., Hartung J.S. (2009), "Quantitative distribution of 'Candidatus Liberibacter asiaticus' in citrus plants with citrus Huanglongbing", Bacteriology, 99(2): 139-144.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

EVALUATION OF GENE EXPRESSION (nifH) ON ENDOPHYTIC NITROGEN-FIXING BACTERIA OF BANANA ENANA GIGANTE CAVENDISH

(Evaluación de la expresión del gen nifH en bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno de banano enano gigante subgrupo cavendish)

Karen Eunise Luna-Enríquez[a*]; Guadalupe Gálvez-Barbosa[a], Edwin Antonio Santiago-Martínez[a], Fernando Ramírez-Bobadilla[a] Enrique Tinajero-Cortés[b], Miguel Juan Beltrán-García[a], Julia del Carmen Martínez-Rodriguez[a+].

[a]Lab 311 Investigación y Desarrollo, Depto. de Química, DDCyT. Universidad Autónoma de Guadalajara. Av. Patria 1201, Lomas del Valle, CP 45129, Zapopan, Jalisco, México.
[b]Centro de Investigación en Biotecnología aplicada, CIBA Tlaxcala-IPN, Ex-Hacienda San Juan Molino Carretera Estatal Tecuexcomac-Tepetitla Km 1.5, C.P. 90700, Tlaxcala, México

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: juliam@edu.uag.mx

Área del Conocimiento: Biología Molecular.

ABSTRACT
Banana is the fourth most important crop in the world, belonging to the Musaceae family which Cavendish variety is the most cultivated. Nitrogen is one of the most limiting nutrients required to promote the development and increase crop productivity every year about 100 million tons of nitrogen fertilizers of chemical origin are used, despite the success of using these compounds to improve production may under certain circumstances have a negative effect to pollute the environment and contribute to health problems in humans and animals, nowadays it´s known that diazotrophic endophytic bacteria have the ability to fix nitrogen through the activation of a complex enzyme nitrogenase system, proteins involved in the fixation of atmospheric nitrogen (N2) in forms and assimilable nitrogen available to plants, this enzyme complex is regulated by the *nif* genes. In order to generate a source of organic nitrogen and reduced environmental impact. The first phase of the project involved the characterization of cultivable endophytic bacteria isolated from banana Cavendish leaf and root using the culture medium Red Congo and NFB selecting a total of 10 bacterial strains capable of nitrogen fixation, later DNA extraction was performed followed by a nested PCR to obtain an amplified segment of 371 bp, confirming the presence of *nifH* gene. The main objective of this study is to evaluate the expression levels of the gene *nifH* in 10 endophytic bacteria selected using qPCR tool thus concluding the second phase of the investigation.

Keywords: *nif-H* gene; nitrogen fixing bacteria¸ Cavendish banana, qPCR

MATHEMATICAL MODELING FOR BIOPOLYMER PRODUCTION BY *Pseudomonas putida* CULTURES

(Modelado Matemático para la Producción de Biopolímeros Mediante Cultivos de *Pseudomonas putida*)

Carlos E. Torres-Cerna*[a], Martha Bermejo-Jambrina[b], Ignacio Poblete-Castro[c], Alma Y. Alanís[a], Esteban A. Hernandez-Vargas [b]

[a] CUCEI, Universidad de Guadalajara, Apartado Postal 51-71,
Col. Las Aguilas, C.P. 45080, Zapopan, Jalisco, Mexico,
[b] Systems Medicine of Infectious Diseases, Department of Systems Immunology and Braunschweig Integrated Centre of Systems Biology, Helmholtz Centre for Infection Research, Inhoffenstr.7, 38124 Braunschweig, Germany.
[c] Departamento de prevención de pérdidas e ingeniería ambiental, Universidad Tecnológica Metropolitana, Dieciocho 390, Santiago, Chile

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: torresemilio86@gmail.com

Área del Conocimiento: Biomateriales.

ABSTRACT
Biopolymers have emerged as a solution to large amount of waste produced by products derived from petroleum every year, however, they are still expensive. Production of poly-hydroxyalkanoates (PHAs) through microbial culture is a promising approach for suitable production of bioplastics. To this end, the strain *Pseudomona putida* (*P. putida*) is able to produce PHAs with low cost materials in comparison with other productions methods. In this paper we propose a mathematical model to evaluate the production of PHA. Using a variant of Differential Evolution (DE) algorithm, we estimate the model parameters that can not be measured directly from experimental data in a batch reactor. This mathematical model provides a better understanding of PHA production by *P. putida* cultures and could be used to reduce the biopolymers productions costs.

Keywords: Biopolymer production, Poly-hydroxyalkanoates, *Pseudomona putida*, Metabolic engineering, Parameter estimation, Differential evolution algorithm

RESUMEN
Los biopolímeros han surgido como una solución a la gran cantidad de desechos plásticos derivados del petróleo, sin embargo, su producción aun es costosa. La producción de Polihidroxialcanoatos (PHAs) mediante cultivos microbianos, es un enfoque prometedor para la producción sustentable de bioplásticos. Con este fin, la cepa *Pseudomona putida* (*P. putida*) es capaz de producir PHAs con materia prima de bajo costo en comparación con otros métodos de producción. El presente trabajo, propone un modelo matemático para evaluar la producción de PHA mediante cultivos de *P. putida*. Los parámetros del modelo que no pueden ser medidos directamente son estimados usando una variante del algoritmo Evolución Diferencial (DE). Este modelo matemático provee un mejor entendimiento de la producción de la cepa P. putida y podría reducir los costos de producción de PHAs.

Palabras clave: Producción de biopolímeros, Polihidroxialcanoatos, *Pseudomona putida*, Ingeniería metabólica, Estimación paramétrica

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, los plásticos son uno de los materiales más usados debido a sus propiedades de durabilidad y resistencia a la degradación. Estas mismas propiedades, han hecho de los plásticos uno de los materiales más contaminantes [1]. Por este motivo, nuevas líneas de investigación han surgido desde la década pasada para el desarrollo de plásticos biodegradables que mantengan las propiedades de los plásticos convencionales [2]. Con este fin, los Polihidroxialcanoatos (PHAs) han atraído la atención debido a la similitud de sus propiedades con las de los plásticos convencionales y su completa biodegradabilidad [2]. Algunas bacterias producen PHAs naturalmente en el citoplasma de sus células, y se estudian nuevos métodos que permitan mejorar su producción [3]. La bacteria *Pseudomona putida* (*P. putida*) es una de las bacterias de mayor interés debido a su versatilidad metabólica, su rápido crecimiento y alta producción de PHAs [4].
Aunque la mayoría de las investigaciones se han enfocado en el uso de ácidos grasos como fuente de carbono [5], la bacteria *P. putida* ha demostrado la capacidad de sintetizar PHAs a partir de fuentes de carbono más económicas, como la glucosa [6]. Además, los enfoques computacionales podrían ser una herramienta crucial para lograr reducir los costos. Anteriores trabajos [7, 8, 9, 10] lograron desarrollar modelos matemáticos que permiten un mejor entendimiento del proceso de producción de bioplásticos usando diferentes bacterias y métodos. En el presente trabajo se propone el modelo matemático para la producción de PHA mediante el uso de cultivos en fed-batch de la bacteria *P. putida* usando glucosa como fuente de carbono [6]. Los parámetros del modelo fueron optimizados usando una variante del algoritmo Evolución Diferencial (DE, por las siglas en ingles de Differential Evolution) [11].
Este trabajo está organizado como sigue: en la sección 2 se presentan la metodología experimental, el modelo propuesto y los métodos para la estimación de parámetros, en la sección 3 se presentan los resultados obtenidos y la discusión, y en la sección 4 se presentan las conclusiones.

METODOLOGÍA

Bacteria, medio y fermentación

Se considera la cepa de la bacteria *P. putida* KT2440 (DSM 6125), obtenida de la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (DSMZ, Braunschweig, Alemania). Los experimentos se realizaron en un bioreactor top-bench BIOSTAT con capacidad de 2 L, con un volumen de trabajo de 1.5 L a 30° C y a 180 rpm. El oxígeno se mantuvo al 20%, y el PH en 7. Para una descripción más detallada, ver [6].

Modelo Matemático

El modelo matemático propuesto consta de las siguientes cuatro ecuaciones diferenciales:

$$\frac{dS(t)}{dt} = -k_1 \mu_S(t) \quad (1)$$

$$\frac{dN(t)}{dt} = -k_2 \mu_N(t) \quad (2)$$

$$\frac{dX(t)}{dt} = \mu(t) \tag{3}$$

$$\frac{dP(t)}{dt} = k_3\mu(t) + k_4\mu_p(t) \tag{4}$$

donde, S es la glucosa, usada como fuente de carbono, N es la concentración de amonio (NH_4) el cual es el nutriente limitado, X es la biomasa activa, y P es el PHA producido.
La glucosa (S), es consumida con un ritmo determinado por k_1, este consumo es modelado por la ecuación (1), donde $\mu_S(t)$ representa la siguiente función Monod:

$$\mu_S(t) = \frac{X(t)}{X(t) + K_S} S(t) \tag{5}$$

donde, K_s es la constante de afinidad de S.
La dinámica del NH_4 está representada en la ecuación (2), cuyo ritmo de consumo está determinado por k_2 y μ_N representa la siguiente función:

$$\mu_N(t) = \frac{X(t)}{X(t) + K_N} N(t) \tag{6}$$

donde, K_N es la constante de saturación de N.
La dinámica de la biomasa (X) es modelada en la ecuación (3), donde μ representa la siguiente ecuación:

$$\mu(t) = \mu_{max}\left(\frac{S(t)}{S(t) + K_{S1}}\right)\left(\frac{N(t)}{N(t) + K_{N1}}\right)X(t) \tag{7}$$

donde μ_{max} representa la máxima velocidad de crecimiento de X. K_{N1} y K_{S1} representan las velocidades constantes en que X consume a N y S, respectivamente.
La dinámica del crecimiento del PHA (P) es modelada en la ecuación (4), donde k_3 representa la velocidad de crecimiento de P durante la etapa de crecimiento de X, k_4 es el ritmo de producción de P durante la escases de NH_4 en el medio. La función μ_p está definida como:

$$\mu_P(t) = \frac{K_P}{N(t) + K_P} X(t) \tag{8}$$

esta ecuación modela la producción de P, cuando escasea el NH_4, la cual aumenta conforme disminuyen los niveles de NH_4.
El modelo propuesto, contiene varios parámetros los cuales deben de ser estimados, estos se presentan en $\theta = [k_1, k_2, k_3, k_4, K_N, K_S, K_{N1}, K_{S1}, K_p]$. El parámetro μ_{max} es ajustado según los resultados en [6].

Algoritmo de optimización

Debido a la complejidad y la no linealidad del modelo propuesto (1)-(4), no se puede realizar una medición directa de los parámetros usando estrategias de optimización comunes. Sin embargo, existen algoritmos de optimización heurísticos con características de auto-adaptación y auto-aprendizaje las cuales han demostrado ser capaces de resolver problemas complejos.

El algoritmo de optimización que usamos para este trabajo es evolución diferencial (DE, por las siglas en inglés de Differencial Evolution) [11], el cual es un algoritmo de optimización evolutivo relativamente nuevo y sencillo de implementar [12], y ha sido usado con éxito en otros problemas similares [13, 14]. Los parámetros de control del algoritmo DE fueron ajustados en: cruce ($CR = 0.7$), factor de escalamiento ($F = 0.8$) y el tamaño de la población ($NP = 20 * n$), donde n representa la dimensión del problema.

Procedimiento

Para nuestro trabajo, podemos ver la estimación de parámetros como un problema de optimización. Comparamos la salida de nuestro modelo con los datos experimentales obtenidos en [6]. El algoritmo de busca los valores para los parámetros que disminuyan la diferencia entre los datos experimentales y la salida del modelo; usando como función de minimización la suma de cuadrados de pesos residuales (SSWR, por las siglas en inglés de Sum of the Square Weighted residues). Las ecuaciones diferenciales del modelo fueron resueltas con la herramienta *ode45* de MATLAB®.

Además, con el objetivo de reducir la complejidad del problema y obtener un modelo con mejor ajuste, dos métodos fueron tomados en cuenta para este trabajo. El primer método, en lo sucesivo método *global,* consta de una estimación global en la cual se estimaron simultáneamente todos los parámetros del modelo. El segundo método, en lo sucesivo método *iterativo-global*, es descrito en [15], en el cual se realiza una pre-estimación, una estimación por si misma, antes de realizar una nueva estimación global.

RESULTADOS

En la Tabla 1 se observan la mejor estimación, el promedio y la desviación estándar de la estimación de parámetros para el modelo matemático después de realizar 50 pruebas de estimación.

Tabla 1: Estimación de parámetros para el modelo usando en método *iterativo-global*.

	Mejor estimación	Promedio	Desviación estándar
P. putida KT2440	0.0755	0.0805	2.9×10^{-03}

El ajuste de la estimación mostrada en la columna “Mejor estimación” de la Tabla 1 se muestran en la Figura 1. Los valores de los parámetros se muestran en la Tabla 2. El valor del parámetro μ_{max} es fijado en 0.53 de acuerdo a los resultados experimentales obtenidos en [6].

Tabla 2: Valores de los parámetros que ofrecen el mejor ajuste usando el método *iterativo-global*

	k_1	k_2	k_3	k_4	K_N	K_S	K_{N1}	K_{S1}	K_P
P. putida KT2440	0.258	0.568	0.059	0.0069	0.499	0.658	0.051	0.052	2.299

Los valores de los parámetros K_{S1}, K_P, K_N y K_4 fueron fijados tomando como base las estimaciones previas realizadas usando el método *global*.

La Figura 1 muestra que la *P. putida* KT2440 tiene un crecimiento en la producción de biomasa durante las primeras 20 horas, sin embargo el crecimiento disminuye significativamente después de este tiempo debido a los bajos niveles de glucosa presentes. También se pueden observar dos fases en el

crecimiento del PHA basadas en los niveles de amonio en el medio de cultivo. El crecimiento del PHA se dispara cuando los niveles de amonio están por debajo de 0.1 g L^{-1}, lo cual revela que la producción de PHA está directamente relacionada a los niveles de amonio en el medio.

Los resultados de la simulación en la Figura 1 muestran un ajuste adecuado del modelo (línea continua) a los datos experimentales (círculos). El mayor desajuste mostrado en las gráficas del peso celular drenado (CDW, por las siglas en inglés de Cell Dry Weight) el cual representa la suma de la biomasa activa y la producción de PHA, $CDW = X + P$. Esto es debido a que X y P, muestran las dinámicas más complicadas de modelar. Esto puede verse en las ecuaciones del modelo, donde se muestran las dependencias más fuertes por parte de las ecuaciones (3) y (4) con el resto del modelo.

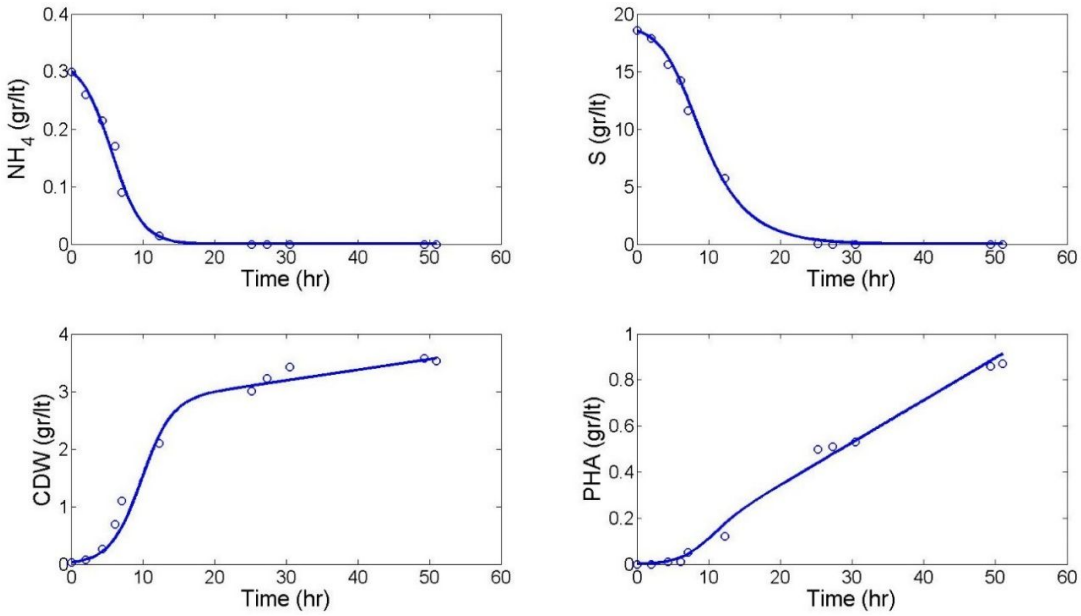


Figura 1: Ajuste del modelo (línea continua) a los datos experimentales (círculos) para la *P. putida* KT2440 usando los parámetros de la Tabla 2, *CDW = P + X.*

Los dos métodos usados para esta estimación lograron disminuir la complejidad del problema, por un lado, aplicar el método *global* logramos determinar cuáles de los parámetros son más sensibles a la estimación. Por otro lado, con el método *iterativo-global* logramos disminuir los espacios de búsqueda de valores para los parámetros. De manera que, con los parámetros sensibles fijos, y con un reducido espacio de búsqueda para los parámetros restantes, logramos un mejor ajuste de nuestro modelo.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se logró modelar satisfactoriamente el proceso de fabricación de bioplásticos usando cultivos de *P. putida*, con glucosa como fuente de carbono y amonio como sustrato limitado, lo cual podría ayudar a reducir los costos de producción de bioplásticos. Además, el modelo propuesto contiene ecuaciones más sencillas en comparación con otros modelos, como los propuestos en [7, 8, 9, 10], lo cual mantiene bajos los costos computacionales y mayor veracidad en los parámetros.

Como trabajo futuro, se propone enfocar la estimación de parámetros a mejorar el ajuste del modelo para la *P. Putida* KT2440 enfocando los esfuerzos en el ajuste de la dinámica de la biomasa activa.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue apoyado por CONACyT en México, y por DAAD en Alemania, a través del programa PROAMEX y el proyecto "OPTREAT"; además iMed – La Iniciativa Helmholtz en Medicina Personalizada.

REFERENCIAS

[1] Eriksen, M., Lebreton, L. C. M., Carson, H. S., Thiel, M., Moore, C. J., Borerro, J. C., … Reisser, J. (2014). "Plastic Pollution in the World's Oceans: More than 5 Trillion Plastic Pieces Weighing over 250,000 Tons Afloat at Sea". PLoS ONE, 1–15.

[2] Lee, S. Y. (1996). "Bacterial polyhydroxyalkanoates". Biotechnology and Bioengineering, 49(1), 1–14.

[3] Reddy, C. S. K., Ghai, R., Rashmi, & Kalia, V. C. (2003). "Polyhydroxyalkanoates: An overview". Bioresource Technology, 87(2), 137–146.

[4] Poblete-Castro, I., Becker, J., Dohnt, K., Santos, V. M. Dos, & Wittmann, C. (2012). "Industrial biotechnology of Pseudomonas putida and related species". Applied Microbiology and Biotechnology, 93(6), 2279–2290.

[5] Poblete-Castro, I., Escapa, I. F., Jäger, C., Puchalka, J., Chi Lam, C., Schomburg, D., … Martins dos Santos, V. A. (2012). "The metabolic response of P. putida KT2442 producing high levels of polyhydroxyalkanoate under single- and multiple-nutrient-limited growth: Highlights from a multi-level omics approach". Microbial Cell Factories, 11(1), 34.

[6] Poblete-Castro, I., Binger, D., Rodrigues, A., Becker, J., Martins Dos Santos, V. a P., & Wittmann, C. (2013). "In-silico-driven metabolic engineering of Pseudomonas putida for enhanced production of poly-hydroxyalkanoates". Metabolic Engineering, 15(1), 113–123.

[7] Raje, P., & Srivastava, A. K. (1998). "Updated mathematical model and fed-batch strategies for Poly-β-Hydroxybutyrate (PHB) production by Alcaligenes eutrophus". Bioresource Technology, 64(3), 185–192.

[8] Johnson, K., Kleerebezem, R., & Van Loosdrecht, M. C. M. (2009). "Model-based data evaluation of polyhydroxybutyrate producing mixed microbial cultures in aerobic sequencing batch and fed-batch reactors". Biotechnology and Bioengineering, 104(1), 50–67.

[9] Patwardhan, P. R., & Srivastava, a. K. (2004). "Model-based fed-batch cultivation of R. eutropha for enhanced biopolymer production". Biochemical Engineering Journal, 20(1), 21–28.

[10] Khanna, S., & Srivastava, A. K. (2005). "A simple structured mathematical model for biopolymer (PHB) production". Biotechnology progress, 21(3), 830-838.

[11] Storn, R., & Price, K. (1995). "Differential evolution-a simple and efficient adaptive scheme for global optimization over continuous spaces" (Vol. 3). Berkeley: ICSI.

[12] Simon, D. (2013). Evolutionary optimization algorithms. (1ra ed.). New Jersey, E.U. John Wiley & Sons.

[13] Rocha, M., Mendes, R., Rocha, O., Rocha, I., & Ferreira, E. C. (2014). "Optimization of fed-batch fermentation processes with bio-inspired algorithms". Expert Systems with Applications, 41(5), 2186–2195.

[14] Noman, N., & Iba, H. (2005). Inference of Gene Regulatory Networks Using S-system and Differential Evolution. Proceedings of the 2005 Genetic and Evolutionary Computation Congress, 439–446.

[15] Binder, S. C., Hernandez-Vargas, E. A., & Meyer-Hermann, M. (2015). "Reducing complexity: An iterative strategy for parameter determination in biological networks". Computer Physics Communications, 190, 15-22.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

CHARACTERIZATION OF STARCH-MMT NANOCOMPOSITES BY SEM, FTIR AND TGA USING TWO METHODOLOGIES

(Caracterización de nanocompositos almidón/MMT POR SEM, FTIR y TGA usando dos metodologías)

Claudia Andrea Romero-Bastida [ac]*, Delia Rita Tapia-Blácido[b], Luis Arturo Bello-Pérez[a], Ma. Guadalupe Méndez-Montelavo[c], Gonzalo Velazquez[c].

[a]Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional. Km 8.5, Carretera Yautepec-Jojutla, Colonia San Isidro, apartado postal 24.62731, Yautepec, Morelos, México.
[b]Universidad de Sao Paulo Depto. Química. Av. Bandeirantes 3900 CEP 14040-901 Bairro Monte Alegre, Ribeirao Preto S P Brasil
[c]Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada. Cerro Blanco No. 141. Col. Colinas del Cimatario. 76090, Santiago de Querétaro, Querétaro, México

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: cbastida@ipn.mx

Área del Conocimiento: Biomateriales

ABSTRACT
In recent years, polymer/clay nanocomposites have attracted considerable interest because they combine the physical and chemical properties of organic and inorganic material. Combining clays and natural polymers, such as starch, at nanometric level, is an attractive way to modify some of the properties of this polysaccharide, including its mechanical and swelling properties as well as its thermal behavior. Starch/clay nanocomposites are economically interesting because they are easy to prepare and involve inexpensive chemical reagents. Starch represents the main form of stored carbohydrate in plants and is readily available, cheap and biodegradable. The properties of starch depend strongly on the ratio of its two principal components: amylose and amylopectin. The main disadvantages of starch films are its hydrophilic character and inadequate mechanical properties. These properties can be improved by the incorporation of reinforcing materials (like montmorillonite MMT). The successful preparation of the nanocomposites still faces problems, mainly related to the proper dispersion of nano-fillers within the polymer matrix. In this study the microstructure and thermal stability of starch/clay nanocomposites were evaluated as well as the interaction between components, evaluated by FTIR. Corn starch was used with two amylose content; also two preparation methodologies were used (process 1: starch is first mixed with glycerol and process 2: starch is first mixed with MMT). Results indicated a smooth surface when starch and glycerol were used, and a rough surface was seen when MMT was added. Thermal stability results showed that there was a slight difference between nanocomposites having different amylose content when using process 1, but this difference increased when using process 2. FTIR results indicated that the interaction between components depends on the process used as well as the amylose content in the starch.

Keywords: Nanocomposites of starch, FTIR of nanocomposites, TGA analysis

RESUMEN
En años recientes los nanocompósitos polímero/arcilla han atraído el interés debido a que combinar las propiedades físicas y químicas de materiales orgánicos e inorgánicos. Combinando las arcillas y polímeros naturales como el almidón, a nivel nanométrico, es un modo atractivo para modificar algunas de las propiedades de este polisacárido, incluyendo sus propiedades mecánicas y de hinchamiento asi como su comportamiento térmico. Loa nanocompositos almidón/arcilla son económicamente interesantes porque son fáciles de preparar e involucran reactivos químicos baratos. El almidón representa la principal forma de almacenamiento de carbohidratos en plantas, está disponible, barato y biodegradable. Las propiedades del almidón dependen fuertemente de la proporción de sus dos componentes principales: la amilosa y la amilopectina. La desventaja principal de las películas de almidón es su carácter hidrofílico y propiedades mecánicas inadecuadas. Estas propiedades pueden ser mejoradas por la incorporación de agentes de refuerzo (como la montmorillonita, MMT). El éxito en la preparación de los nanocompositos tiene problemas relacionados con la correcta dispersión de los nano-refuerzos con la matriz del polímero. En este estudio la microestructura y la estabilidad térmica de los nanocompositos almidón/arcilla fue evaluada así como la interacción entre los componentes, evaluado por FTIR. El almidón de maíz fue usado con dos contenidos de amilosa así como dos procesos (proceso 1: el almidón fue mezclado primero con el glicerol y en el proceso 2: el almidón fue mezclado primero con la MMT). Los resultados indican una superficie suave cuando el almidón y el glicerol están presentes y una superficie rugosa cuando se utiliza la MMT. Los resultados de estabilidad térmica muestran que hay una ligera diferencia entre los nanocompositos teniendo diferente contenido de amilosa, utilizando el proceso 1, pero esta diferencia aumentó cuando se utilizó el proceso 2. Los resultados de FTIR indican que la interacción entre los componentes depende del proceso empleado así como del contenido de amilosa en el almidón.

Palabras Clave: nanocompositos de almidón, FTIR de nanocompositos, análisis de TGA.

INTRODUCCIÓN

Los materiales plásticos han sido utilizados ampliamente para conservar diversos productos alimenticios; sin embargo, el uso desmedido está ocasionando problemas ambientales debido a su escasa biodegradación. Es por eso que en los últimos años, diversas investigaciones se han realizado para encontrar materiales alternativos que sean más biodegradables y sigan cumpliendo con su función protectora. Entre estos materiales se encuentra el almidón, ya que es abundante, económico y tienen la cualidad de ser termoplástico, permitiendo la formación de películas. Sin embargo, las películas de almidón son sensibles a la humedad del ambiente, por lo que la adición de un agente de refuerzo como como la montmorillonita, puede disminuir su hidrofilicidad, mejorando así su funcionalidad. El problema de añadir este agente es su dificultad para homogeneizarlo en la matriz de almidón. Es por esto que el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del tipo de metodología de preparación de las películas de almidón/montmorillonita y el contenido de amilosa sobre las propiedades de las películas.

METODOLOGÍA

Preparación de las películas

Las soluciones filmogénicas se prepararon con dos procedimientos, los cuales consistían en la diferencia en el orden de agregación de los componentes: Proceso 1 (P1), la solución se preparó utilizando 4 g almidón de maíz con dos porcentajes de amilosa: AN (30%) y VII (70%), se mezclaron con glicerol (G) al 30%, se gelatinizó en una olla de presión (marca Presto) a 121°C por 20 min para el almidón alto en amilosa (Hylon VII) y en una parrilla termoagitadora (marca Termolyne) para el almidón normal a 85°C. A continuación se agregó la montmorillonita (MMT) que fue sometida a un proceso de sonicación durante una hora. Se continuó la agitación por 10 minutos más a 80°C. En el proceso 2 (P2), se gelatinizó el almidón como en el procedimiento anterior pero sin la adición del glicerol. A continuación se agregó la montmorillonita sometida al proceso de sonicación y por último se agregó el glicerol. Posteriormente las soluciones se vaciaron en moldes de acrílico de 20 X 20 cm y se secaron en una estufa modelo IBTF-050 A 65°C por 6 h. Después del secado, las películas fueron retiradas del molde y colocadas en bolsas de plástico hasta su análisis.

Técnicas empleadas

El análisis de termogravimetría de las películas fue realizado utilizando un TGA Q-500 (TA Instruments). Para ello se pesaron 10 mg de muestra y fue realizado el calentamiento de 40 a 700°C a una velocidad de 10°C/min y flujo de nitrógeno de 60 ml/min. Las películas fueron analizadas por espectroscopia en la región de infrarrojo en un espectrofotómetro (Shimadzu, modelo IR, Prestige-21. Kyoto-Japan) con transformada de Fourier. Los análisis fueron realizados en la región de 4000 a 400 cm^{-1} con una resolución de 2 cm^{-1} con 20 barridos. Los espectros fueron analizados usando el software WinBomem Easy.

RESULTADOS

En la Figura 1 se muestran las películas de almidón de maíz con diferente contenido de amilosa y con MMT. Se puede observar que la película de almidón con 30% amilosa tiene una superficie más suave y uniforme que la de 70% de amilosa y ésta última muestra más rugosidad cuando contiene MMT.

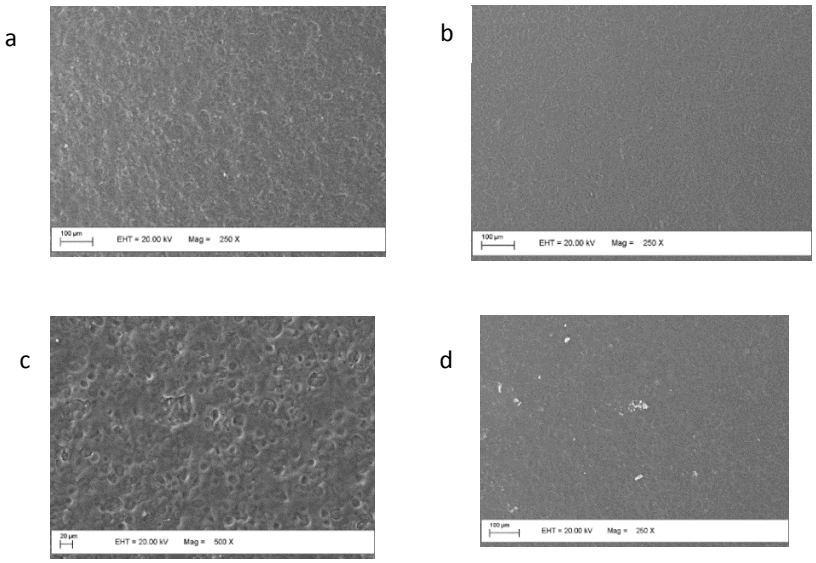


Figura 1. Imágenes SEM de la superficie de las películas de almidón de maíz sin MMT con a) 70% de amilosa y b) 30% amilosa y con 15% de MMT para c) 70% de amilosa y d) 30% de amilosa.

Los resultados encontrados mediante TGA se muestran en la Figura 2. Se encontraron tres procesos de degradación principales. El escalón inicial corresponde a pérdida de agua y volatilización del plastificante. El segundo escalón corresponde la descomposición del almidón. Puede observarse que, en el caso de películas con 70% amilosa (Figura 2a) el proceso de elaboración tiene un efecto en la degradación de la película. En el proceso 1, en el cual el glicerol esta interactuando primero con el almidón, no solo la pérdida de peso es menor sino su temperatura de degradación es mayor. En el proceso 2, en el que el glicerol se añadió al final, la pérdida de peso es mayor y su temperatura de degradación fue menor, similar a la película solo con glicerol. En cambio en el almidón con 30% amilosa (Figura 2b), los dos procesos no muestran diferencia.

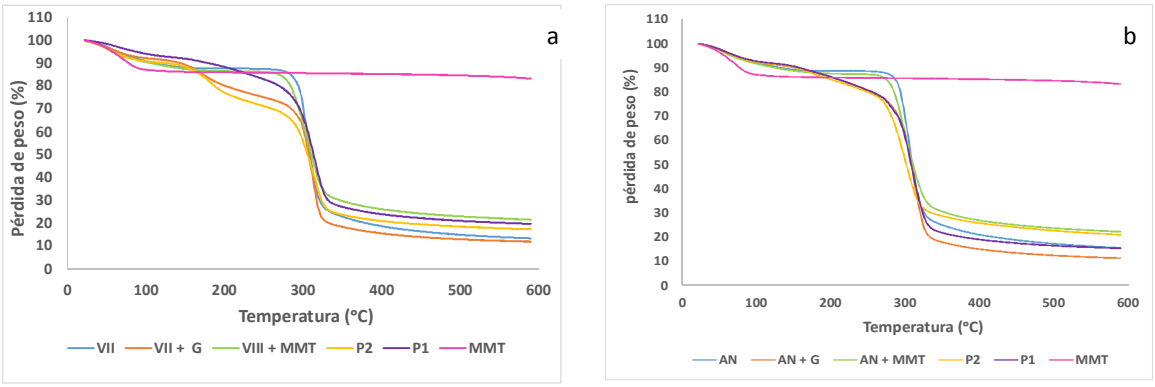


Figura 2. Curvas de TGA de películas de almidón de maíz con a) 70% de amilosa y b) 30% amilosa

Los resultados de FTIR a las películas con 70% de amilosa se muestran en la Figura 3. Puede observarse que hay un corrimiento a un menor número de onda en dos regiones diferentes al comparar los espectros de las películas elaboradas únicamente con almidón 3320 cm^{-1}, con glicerol 3290 cm^{-1}y con MMT (3256 cm^{-1}. Además en la región del 1600 se observa que las películas elaboradas únicamente con almidón tienen un pico en el 1653 cm^{-1}, para las elaboradas con glicerol de 1650 cm^{-1} y de 1642 cm^{-1} para las que contenían MMT.

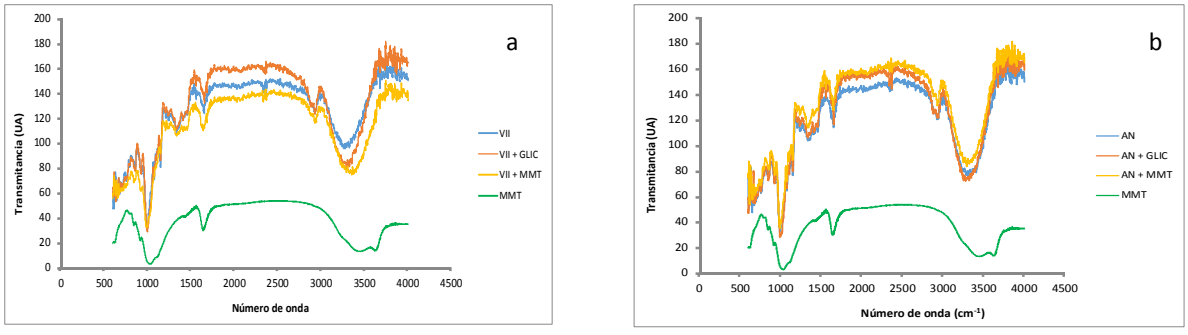


Figura 3. Espectros de FTIR para películas de almidón de maíz con a) 70% de amilosa y b) con 30% de amilosa

Los resultados obtenidos para películas con 30% de amilosa se encuentran en la Figura 4. Se observó un cambio menor en el número de onda de las películas elaboradas solo con almidón nativo de 3322 cm^{-1} a un pico de 3319 cm^{-1} y 3291 cm^{-1} para las películas elaboradas con glicerol y MMT respectivamente. También se observó un número de onda menor en la región de 1600 aunque de menor intensidad de 1653cm^{-1} para películas solo de almidón y de 1642 y 1647 cm^{-1} para elaboradas con glicerol y MMT respectivamente. En la MMT hay una amplia banda en el 3430 cm^{-1} que indica flexión de –OH debido a la absorción de agua, otra banda en el 3621 cm^{-1} que indican grupos –OH libres, otra señal en el 1636 cm^{-1} que corresponde a la vibración del H-O-H y una última en el 1045 cm^{-1} correspondiente a la flexión del Si-O.

DISCUSIONES

Las micrografías muestran que en las películas hubo una adecuada gelatinización del almidón y una buena miscibilidad con el glicerol por tener una polaridad similar. Se observa una mayor rugosidad cuando se les incluye la MMT, esto ha sido observado por otros investigadores [1] y podría indicar el grado de distribución homogénea de la MMT en la película de almidón.

Las gráficas de TGA muestran que el método de preparación tiene un efecto importante sobre las propiedades térmicas, como ha sido reportado por otros investigadores [2]. En este caso, el proceso 1 (P1) tiene una temperatura de degradación mayor al compararlo con el proceso 2 (P2). Esto puede deberse a que en el P1 el glicerol está unido al almidón, en el cual los grupos hidroxilo están unidos a la matriz y no son tan fáciles de descomponerse como en el proceso 2 en el cual la montmorillonita está unida al almidón y el glicerol al estar unido al final tiene sus hidroxilos más fáciles de descomponerse. Sin embargo, en películas de almidón con 70% de amilosa la temperatura de degradación fue mayor al compararse con películas con 30% de amilosa. La temperatura de degradación del 50% de pérdida de peso incrementa de 300° C a 308°C para películas AN con el P2 y P1 respectivamente. De igual manera, las películas con VII aumentaron de 305° C a 313° C con el P2 y P1 respectivamente. Esto puede deberse a que a que la estabilidad térmica de un material depende de las características inherentes a las muestras así como de las interacciones moleculares entre las diferentes macromoléculas. La disociación de los enlaces toma lugar cuando la energía térmica suministrada excede a la energía de disociación de enlace de los enlaces químicos respectivos [3].

Las bandas de absorción de la MMT concuerdan con lo reportado por otros investigadores [4]. La desaparición de la banda 3621 indica el reemplazo del agua libre en la galería de la MMT para formación de nuevos puentes de hidrógeno con el almidón [5 y 6] lo cual se puede observar al disminuir la banda de absorción de las películas de almidón de maíz con ambos contenidos de amilosa. La señal alrededor del 3290 cm^{-1} corresponde a los grupos –OH que interactúan con el glicerol y el agua.

CONCLUSIONES

Se observó mayor rugosidad en las películas con MMT que puede indicar la homogeneidad de la muestra. Se encontró diferencias en la estabilidad térmica de las películas, se encontró que la manera en que se adicionan los compuestos influye en la degradación térmica, el proceso 1 tiene una degradación mayor que el proceso 2 para los dos contenidos de amilosa, sin embargo la temperatura de degradación es mayor para las películas elaboradas con 70% de amilosa. En los resultados de FTIR se detectaron dos regiones en las cuales se puede ver la interacción entre los componentes de la película.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Facultad de química de la Universidad de Ribeirão Preto en Brasil por las facilidades obtenidas para utilizar los equipos.

REFERENCIAS

[1] Humairah, A.R.N., Zuraida, A., Norshahida, S., Naqiah Z.S. (2014). Characterizations of Thermoplastic Starch and Starch Reinforced Montmorillonite Clay Nanocomposite Advances in Environmental Biology, 8(3): 792-796

[2]Wilhelm, H.-M., Sierakowski, M.-R., Souza, G. P., & Wypych, F. (2003). Starch films reinforced with mineral clay. Carbohydrate Polymers, 52(2): 101–110.

[3] Cole, K. C. (2008) Use of infrared spectroscopy to characterize clay intercalation and exfoliation in polymer nanocomposites. Macromolecules, 41(3):834-843.

[4] Cyras, P.; Mandredi, L.; Ton-That, M.; Vázquez, A. (2008) Physical and mechanical properties of thermoplastic starch/ montmorillonite nanocomposite films. Carbohydrate Polymers, 73(1):55-63.

[5] Liu, H.; Chaudhary, D.; Yusa, S. I.; Tadé, M. O. Glycerol/ starch/Na+-montmorillonite nanocomposites: A XRD, FTIR, DSC and 1H NMR study. Carbohydrate Polymers. 83(4):1591-1597, 2011

[6] Aouada, F. A. Mattoso L H.C, Longo, E. 2011. New strategies in the preparation of exfoliated thermoplastic starch–montmorillonite nanocomposites Industrial Crops and Products 34: 1502– 1508

SYNTHETIC CLAYS SYNTHESIS AND STUDY OF THEIR OPTICAL PROPERTIES

(Síntesis de arcillas sintéticas y estudio de sus propiedades ópticas)

Cecilia Sánchez Jiménez[a]*+, José Guadalupe Galván Quiñones[b], Gregorio Guadalupe Carbajal Arízaga[a].

[a] Departamento de Química, CUCEI, Universidad de Guadalajara.
[b] Departamento de Física, CUCEI, Universidad de Guadalajara.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: celisan2905@hotmail.com

Área del Conocimiento: Biomateriales.

ABSTRACT
Crystalline compounds known as layered double hydroxides (LDH) are formed by layered units with trivalent and divalent metal cations. The former produce an excess of positive electrostatic charge which is neutralized by interlayer anions. The objective of this work was to synthesize LDH by alkaline precipitation of nitrate metal salts including the addition of dysprosium nitrate. Since the ionic radius of Dy^{3+} cations is larger than regular cations in LDH structures (name zinc and aluminum), the isomorphic introduction of dysprosium was conducted varying the molar ratio during the synthesis. The resulting materials were analyzed by X-ray diffraction (XRD) infrared (IR) and photoluminescence (PL) spectroscopies. XRD gave information related to crystal structure and quality; data indicated that the structure is stable when one fourth of trivalent cations are substituted by dysprosium. A larger content of dysprosium lead to formation of zinc oxide (a second phase) which is not desired. The identification of ZnO was conducted by comparison with diffraction cards from the ICDD (International Centre for Diffraction Data) database. Additionally, the distance between layers calculated with the Bragg equation was in agreement with the presence of interlayer nitrate ions, this result was compared with a reference LDH structure synthesized without dysprosium. Infra-red spectroscopy revealed signals of –OH stretching vibrations from the layers, as well as vibrations from nitrate, confirming the successful synthesis of the LDH structure. Finally, PL spectra revealed that the dysprosium-containing LDH produce intense emissions at 410 and 430 nm when excited with 370 UV light. The samples where zinc oxide was also formed presented and additional emission band from 500 to 650 nm related to emissions of ZnO. The main feature of these LDH is the light emitting capability due to dysprosium cations spread along the crystalline matrix. Such emission becomes useful in confocal microscopy since LDH nanoparticles could be detected in bioassays.

Keywords: Layered double hydroxide; Clay; Probe; Luminescence.

RESUMEN
Los compuestos cristalinos conocidos como hidróxidos dobles laminares (HDL) están formados por láminas constituidas por cationes di- y trivalentes, donde los cationes trivalentes generan un exceso de carga positiva y a su vez esta carga es neutralizada mediante atracciones electrostáticas de aniones presentes entre las láminas. El objetivo de este trabajo fue sintetizar HDL basándonos en la técnica de coprecipitación sustituyendo isomórficamente al catión divalente presente en las láminas por Dy^{3+} en diferentes proporciones. La caracterización se realizó por difracción de rayos X (DRX) y las

espectroscopías infrarroja (IR) y de fotoluminiscencia (PL). La DRX mostró información de la estructura y calidad cristalina indicando que la estructura es estable con una sustitución máxima de 25% átomos de Dy con respecto al aluminio. Un contenido mayor de disprosio produce ZnO identificado a través de fichas de difracción. Otro dato es que la distancia que separa a dos láminas es congruente con la presencia de nitrato en medio de ellas. Dicho valor se comparó con un HDL de referencia que no contiene disprosio. La espectroscopía IR mostró bandas de vibraciones –OH que surgen por la gran cantidad de hidroxilos en las superficies de las láminas que junto con las vibraciones de nitrato, dan pruebas de la formación del HDL. Finalmente, la espectroscopía PL reveló que el HDL con disprosio produce una emisión intensa a 410 y 430 nm cuando se excita con luz UV de 370 nm. Las muestras donde se formó ZnO presentaron una banda de emisión adicional entre 500 y 650 nm relacionadas a transiciones en esta segunda fase. La característica principal de estos HDL es la capacidad de emisión de luz debido a los cationes disprosio dispersados a lo largo de la matriz cristalina. Dicha emisión se vuelve útil en microscopía confocal dado que las nanopartículas de HDL pueden ser detectadas en bioensayos.

Palabras Clave: Hidróxidos dobles laminares; Arcillas; Sonda; Luminiscencia.

INTRODUCCIÓN

Hidróxidos dobles laminares

Los hidróxidos dobles laminares (HDLs) son compuestos sintéticos conocidos también como arcillas sintéticas, arcillas aniónicas o compuestos tipo hidrotalcita [1,2]. Los HDLs constan de láminas de cationes metálicos, donde las superficies de las láminas están ocupadas por grupos hidroxilo, aniones y moléculas de agua [1].

Los HDLs fueron sintetizados por primera vez por Feitknetch usando una metodología basada en la precipitación controlada de soluciones acuosas conteniendo cationes metálicos, con una solución alcalina [3].

Estos compuestos presentan características estructurales donde destaca la presencia de dos cationes metálicos, divalente y trivalente [3]. Los cationes divalentes se encuentran parcialmente sustituidos por cationes trivalentes, y se genera un exceso de cargas positivas en las capas, que es compensada por aniones interlaminares (Figura 1), en general carbonato y moléculas de agua [3,4].

Los HDLs pueden ser representados por la siguiente fórmula general: $[M^{2+}_{1-X} M^{3+}_{X} (0H)_2]^{X+} (A^{n-})_{X/n} \bullet H_2O$, donde M^{2+} representa al catión metálico divalente, M^{3+} al catión metálico trivalente y A^{n-} corresponde al anión (Figura 1). Se han estudiado y sintetizado un gran número de HDLs, conteniendo una amplia variedad de cationes metálicos [3]. En el caso de los cationes divalentes los más utilizados son: Ca^{2+}, Mg^{2+}, Zn^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+}, Cu^{2+} y Mn^{2+}; en los cationes trivalentes son: Al^{3+}, Cr^{3+}, Fe^{3+}, Co^{3+}, Ni^{3+} y Mn^{3+}; y entre los aniones empleados se encuentran los siguientes: Cl^-, NO_3^-, ClO_4^-, CO_3^{2-} y SO_4^{2-} [1].

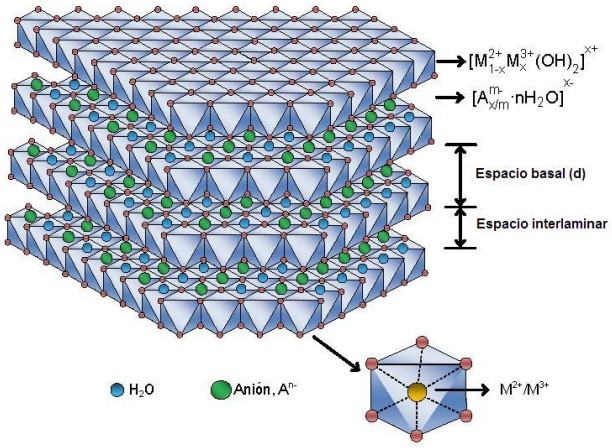


Figura 1. Estructura de un hidróxido doble laminar [5]**.**

Las láminas de las estructuras están compuestas por los cationes metálicos. En la literatura se ha encontrado que los cationes en las láminas no están limitados a cationes di y trivalentes. También es posible la presencia de cationes monovalentes, como en el caso del Li^+ y tetravalentes como lo son Ti^{4+}, Zr^{4+} y Si^{4+} [6,7].

La fracción "x" del catión trivalente, determina la carga electrostática de las láminas. Algunos minerales naturales contienen un valor fijo de x = 0.33, aunque la estructura puede ser estable en valores que van de 0.20 a 0.33. El valor de "x" también influye en la dimensión del espacio interlaminar y en la capacidad de intercambio iónico [1].

El tamaño de los radios catiónicos de M^{2+} y M^{3+} es un parámetro importante en la síntesis de los HDLs. La estructura de los HDLs es lo suficientemente flexible para permitir cualquier catión M^{3+} con una variación en radio iónico de 0.67 (Al^{3+}) a 0.93 (In^{3+}) y dichas estructuras se tornan inestables cuando el radio iónico de M^{2+} es menor a 0.6 [8].

METODOLOGÍA

Síntesis de hidróxidos dobles laminares (HDLs)

En un vaso de precipitado se calentó agua desionizada para descarbonatarla y se dejó enfriar hasta temperatura ambiente, evitando que tuviera contacto con el ambiente.

Se pesaron las cantidades de sales necesarias en una balanza analítica dependiendo de la composición y relación molar (Tabla 1) para disolverlas en agua decarbonatada y se colocaron en agitación en una placa magnética y se introdujo el electrodo en la solución. Se controló una atmósfera de N_2 con ayuda de una manguera y pipeta Pasteur.

Para la precipitación, en una bureta se colocó hidróxido de amonio al 14% y se añadió poco a poco, controlando la estabilización del potenciómetro para medir el pH. Este paso se concluyó hasta llegar a un pH de 8.00.

Enseguida, para el envejecimiento del compuesto ya formado, se dejó la mezcla en agitación durante 1 día. Después del tiempo transcurrido, se separó el precipitado obtenido, por decantación, colocando la mezcla en tubos tipo Falcón para introducirlos en la centrifuga. De esta manera se realizaron lavados con agua desionizada, hasta que la fase líquida se encontró en un pH de 7, verificado con tiras reactivas.

Finalmente el sólido se colocó en una cápsula de porcelana y se dejó secando durante 1 día en la estufa a 70 °C.

Tabla 1. Composición molar en relación a 1 mol de M^{3+} por cada 2.5 mol de M^{2+}.

Etiqueta	Composición	Zn^{2+}	Al^{3+}	Dy^{3+}
Dy=0	Zn/Al/Dy	2.5	1	0
Dy=0.25	Zn/Al/Dy	2.5	0.75	0.25
Dy=0.50	Zn/Al/Dy	2.5	0.5	0.5
Dy=0.75	Zn/Al/Dy	2.5	0.25	0.75
Dy=1.00	Zn/Al/Dy	2.5	0	1

Caracterización de compuestos obtenidos

Difracción de rayos X

Mediante la técnica de difracción de rayos X se determinó la estructura cristalina de los compuestos sintetizados, para ello se trituró la muestra y se colocó sobre el portamuestras del difractómetro presionando al final con un portaobjetos de vidrio para lograr una superficie uniformemente plana. El portamuestras se introdujo en un difractómetro de rayos X marca PANalytical modelo Empyrean y los análisis se realizaron en el modo 2θ en un intervalo de 5 a 70°, con una intensidad de corriente de 30 mA y un voltaje de 40 kV.

Espectroscopía Infrarroja

Para poder identificar los principales grupos funcionales presentes en los HDLs y sus eventuales cambios de composición, se realizó una lectura mediante espectroscopía infrarroja en el rango de 400 a 4,000 cm^{-1} en un equipo ThermoScientific modelo NICOLET iS5 iD5 ATR. Para ello se colocó la muestra en polvo previamente triturada, en el portamuestra del espectrómetro infrarrojo.

Fotoluminiscencia

Para ratificar que los compuestos obtenidos emitían luz mediante fotoluminiscencia se realizaron análisis de fluorescencia, excitando las muestras en una longitud de onda de 370 nm y recolectando los espectros en un rango de 400 a 700 nm para analizar las señales emitidas. Para esto se trituró la muestra previamente y se colocó el polvo sobre una cinta de carbón para colocarla en el portamuestra de un equipo con lámpara de xenón de 1kW de potencia y una luminiscencia registrada por un sistema Acton SpectraPro 2755, con una línea de excitación de 370 nm.

RESULTADOS

Difracción de rayos X

Por medio de la técnica de difracción de rayos X se obtuvo información de la calidad cristalina y estructura de estos compuestos. En la figura 2 se muestran los difractogramas donde se observa que los compuestos Dy = 0.00 y Dy = 0.25 corresponden a hidróxidos dobles laminares, presentando reflexiones con valores múltiplos en 10 y 20 grados (2theta).

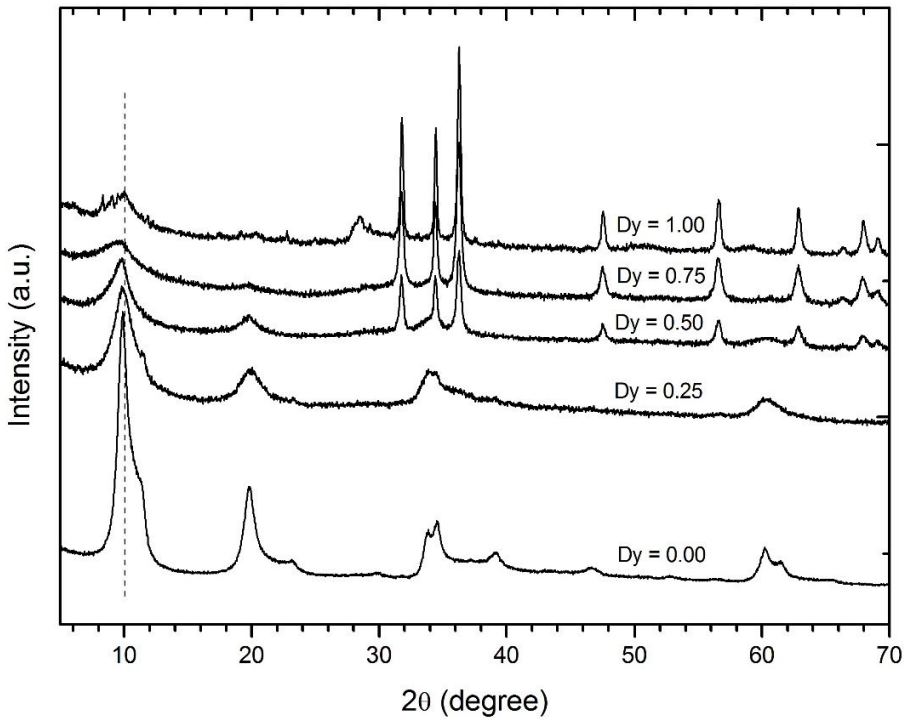


Figura 2. Difractogramas de los HDLs sintetizados en diferentes relaciones molares, donde se muestra que a partir de 0.50 de disprosio en relación molar en base a 1 mol de M^{3+} se presenta la formación de óxido de zinc.

Espectroscopía infrarroja

Mediante la técnica de espectroscopía infrarroja se reforzó la información obtenida por medio de difracción de rayos X, Los espectros de los compuestos se presentan en la Figura 3.

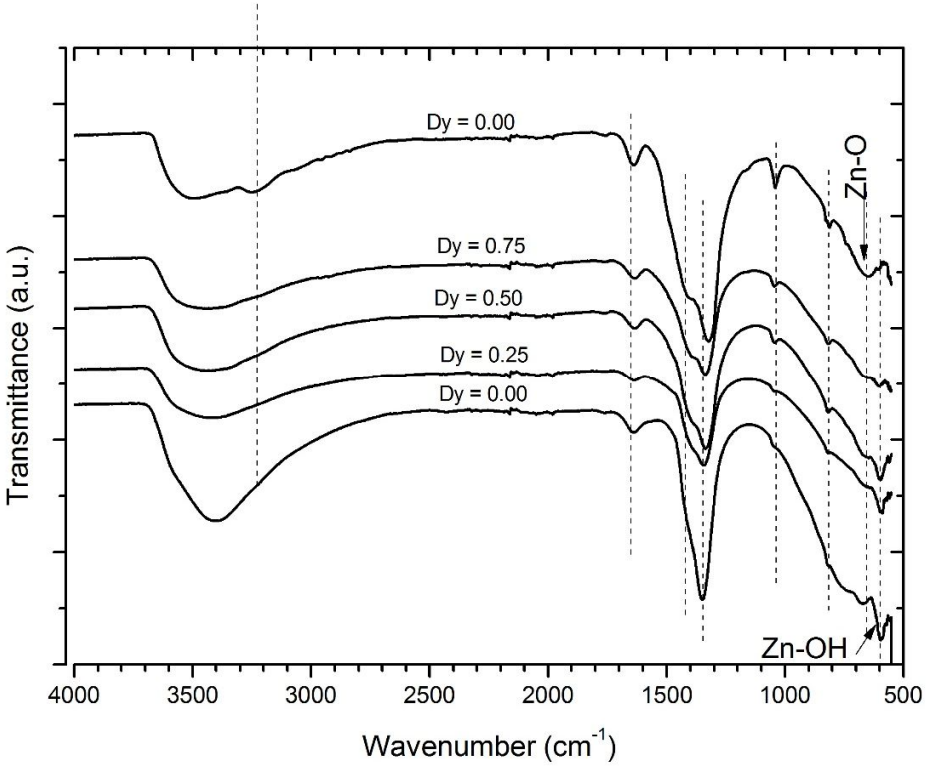


Figura 3. Espectros obtenidos de los HDLs donde se logra ver la presencia de óxidos a partir del compuesto sintetizado con 0.50 de disprosio en proporción molar en base a 1 mol de M^{3+}.

Análisis de fotoluminiscencia

Para la técnica de fotoluminiscencia se realizó un análisis de fluorescencia excitando a 370 nm y colectando los espectros de emisión donde se aprecian señales en diferentes longitudes de onda que nos confirman que estos compuestos tienen la capacidad de emitir luz. Los espectros obtenidos en los análisis se presentan en la Figura 4.

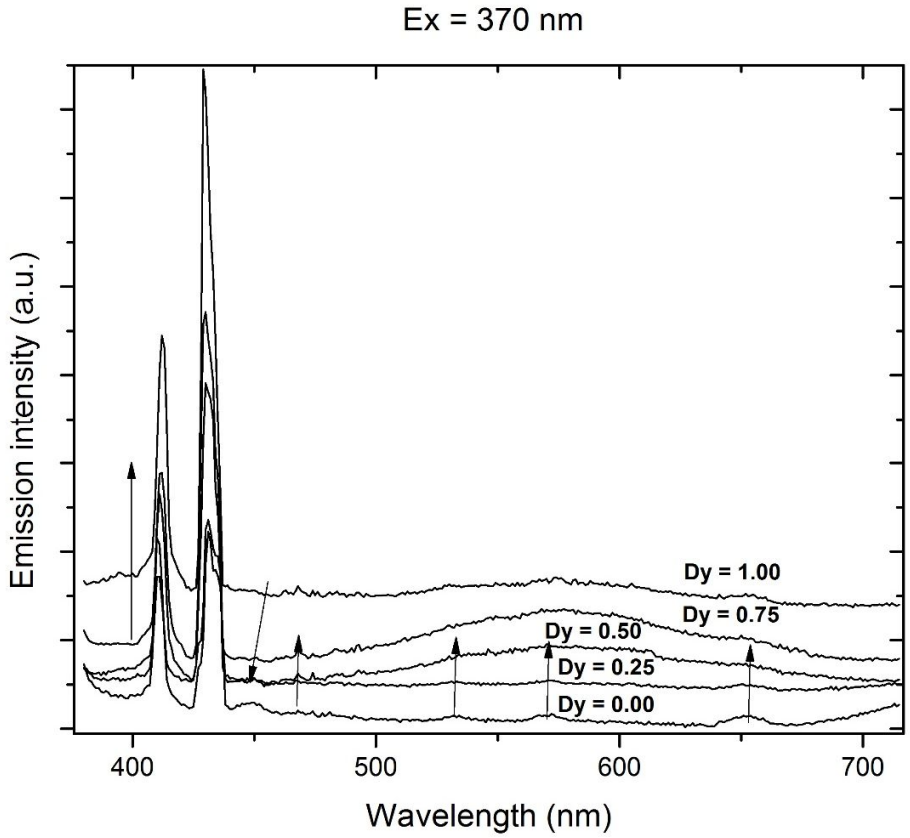


Figura 4. Espectros donde se indican con las flechas las bandas características de emisión de luz, observándose que los compuestos con mayor concentración de disprosio presentan una banda más ancha entre 500 y 650 nm.

DISCUSIONES

Difracción de rayos X

Considerando la ley de Bragg ($\lambda = 2D\text{sen}\theta$) [9] se conoció la distancia basal de la que se extrae el espacio interlaminar de estos compuestos con un valor de 0.89 nm. Finalmente con la información obtenida en la base de datos de difracción (ficha ICDD número 361451) se encontró que los compuestos Dy = 0.50, Dy = 0.75 y Dy = 1.00 presentan formación de óxido de zinc debido a las reflexiones encontradas entre 20 y 40 grados (2theta); en estos compuestos también se encuentra una segunda fase dando reflexiones en 10 y 20 grados (2theta), pero conforme aumenta la concentración de disprosio se pierde la señal, hecho que podría darse debido a que el disprosio siendo un catión mucho más grande que el aluminio, deforma las láminas de los HDLs y por lo tanto su calidad cristalina disminuye y se duda que ya corresponda a un HDL.

Espectroscopía infrarroja

La espectroscopía reveló que los espectros de los primeros dos compuestos (Dy = 0 y Dy = 0.25) presentan bandas en 3390 cm^{-1} correspondiente a los OH^- presentes de las láminas, otra señal que corresponde al ion nitrato en 1340 cm^{-1} y una más alrededor de 590 cm^{-1} que corresponde a vibraciones de enlace Zn-OH. En los compuestos Dy = 0.50, Dy = 0.75 y Dy = 1 hay formación de óxido de zinc apareciendo una banda a 660 cm^{-1} de vibraciones de enlace Zn-O; otra característica de estos espectros es que la banda correspondiente a los iones nitrato que aparece alrededor de 1340 cm^{-1} comienza a desdoblarse apareciendo una banda a 1640 cm^{-1}.

Análisis de fotoluminiscencia

La información obtenida de los espectros de fotoluminiscencia indica que en el caso del compuesto que contiene una relación molar de 2.5:1 de Zn/Al (Dy = 0), considerado como base, donde se observan picos de emisión en 460, 530, 570 y 650 nm (Figura 4), confirmando que estos compuestos tienen la capacidad de emitir luz sin contener disprosio entre sus láminas. En el compuesto Dy = 0.25 las diferencias con el compuesto base son mínimas ya que tienen bandas muy similares encontradas en la misma longitud de onda. Los compuestos siguientes dan señales bastante similares entre ellos, apareciendo una banda de emisión más ancha que pudo darse por la acumulación de señales provenientes del disprosio presente entre las láminas, pues conforme aumenta la cantidad de disprosio la intensidad esta banda aumenta. La banda es ancha porque se suman las bandas de emisión del disprosio y de la matriz HDL.

CONCLUSIONES

Las técnicas realizadas durante este proyecto corroboraron que los compuestos sí contenían disprosio, hecho observado por la luminiscencia, pero entre mayor era la proporción de disprosio menor su calidad cristalina, efecto confirmado por DRX, pues las reflexiones de estos compuestos estaban menos definidas. También se consideró que el anión presente entre las láminas era el nitrato, ya que DRX lo confirma de acuerdo con el valor de la distancia basal tomando en cuenta la ley de Bragg y también por las bandas observadas en espectroscopía IR.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Sara Cortes por el acceso del equipo de espectroscopía infrarroja y al Maestro Sergio Oliva León por el apoyo en las mediciones de DRX.

REFERENCIAS

[1] D. R. Martínez and G. G. Carbajal. (2012). “Hidróxidos dobles laminares : arcillas sintéticas con aplicaciones en nanotecnología,” vol. 7, no. 1, pp. 87–99.

[2] D. Sonia and M. Guáqueta. (2010). “ Catalizadores de Mn-Cu y Mn-Co sintetizados a partir de hidrotalcitas y su empleo en la oxidación de COVs ,”

[3] S. S. Santos and J. A. M. Corrêa. (2011). “Síntese de hidróxidos duplos lamelares do sistema Cu, Zn, Al-CO3: propriedades morfológicas, estruturais e comportamento térmico,” *Ceramica*, vol. 57, pp. 274–280.

[4] F. Kovanda, E. Jindová, B. Dousová, D. Kolousek, J. Plestil, and Z. Sedláková. (2009). “LAYERED DOUBLE HYDROXIDES INTERCALATED WITH ORGANIC ANIONS AND,” vol. 6, no. 1, pp. 111–119.

[5] J. Tronto, A. C. Bardonal, Z. Naal, and J. Valim Barros. (2003). “Conducting Polymers / Layered Double Hydroxides Intercalated,”.

[6] O. Saber. (2006). “Preparation and characterization of a new layered double hydroxide, Co-Zr-Si,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 297, no. 1, pp. 182–189.

[7] W. H. Zhang, X. D. Guo, J. He, and Z. Y. Qian. (2008). “Preparation of Ni(II)/Ti(IV) layered double hydroxide at high supersaturation,” *J. Eur. Ceram. Soc.*, vol. 28, no. 8, pp. 1623–1629.

[8] M. Rajamathi, G. S. Thomas, and P. V. Kamath. (2001). “The many ways of making anionic clays,” *Journal of Chemical Sciences*, vol. 113, no. 5–6. pp. 671–680.

[9] M. E. Aparicio Ceja and G. G. Carbajal Arizaga. (2010). “Utilidad de la difracción de los rayos X en las nanociencias,” *Mundo Nano*, vol. 3, no. 2, pp. 62–72.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

EVALUATION OF PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF NATURAL FIBERS REINFORCED THERMOPLASTIC STARCH FILMS

(Evaluación de propiedades fisicoquímicas de películas de almidón termoplástico reforzadas con fibras naturales)

María Guadalupe Iniestra Galindo[a*], Francisco Rodríguez González[b], Benjamín Marcos Marín Santibáñez[a,+], José Pérez González[c].

[a] Sección de estudios de posgrado e investigación de la Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias Extractivas, Instituto Politécnico Nacional.
[b] Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional.
[c] Laboratorio de Reología y Física de la Materia Condensada, Escuela Superior de Física y Matemáticas, Instituto Politécnico Nacional.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: bmarin@ipn.mx; bmmarins@gmail.com

Área de conocimiento: Biomateriales

ABSTRACT
The environmental problems originated by the disposal of large volume of plastics have prompted to an increasing interest on the design of new environmental-friendly polymers, which can be obtained from different biopolymers as starch. In this work agave fibers reinforced thermoplastic corn starch (TPS) was used to obtained biodegradable films, assuming better fiber-matrix interaction and an enhancement of physicochemical properties. TPS films reinforced with 0 (control), 1, 3 y 8 wt% of agave fibers were obtained by continuous extrusion in a conical twin extruder to improve dispersion and distribution of fibers in matrix. Once the films were extruded, solubility in water, mechanical properties at tension and water vapor permeance of TPS films were determined using ASTM standards. Results show that the maximum stress at tension of TPS increases as a function of fiber content; however the elongation at break decreases as a function of fiber content. In addition, Young´s modulus increases exponentially as a function of fiber content. On the other hand, water vapor permeance of TPS films with 8 wt% of agave fibers decreases approximately 28 % compare to the control. Finally, it was observed that solubility in water of TPS films decreases as a function of fiber content.

Keywords: Thermoplastic starch; Extrusion; Films; Mechanical properties; Permeance; Solubility.

NATURAL SORBENTS FOR WASTEWATER TREATMENT IMPACTED BY PATHOGENIC BACTERIA

(Sorbentes naturales para el tratamiento de aguas residuales impactadas con bacterias patógenas)

Jorge Eduardo Zamora-Castro [a*], Ángel Leal-Rodríguez [b], Galdy Hernández-Zárate [a+], Carlos Lezama-Cervantes [c], Juan Zacarías Lorenzo-Gregorio [b], Noé Trinidad-Marcos [b], Liliana María Álzate-Gaviria [d], Ricardo Herbé Cruz-Estrada [e]

[a] Ingeniería en Biotecnología, Universidad Politécnica Metropolitana de Puebla
[b] Estudiante de la Ingeniería en Biotecnología, Universidad Politécnica Metropolitana de Puebla.
[c] Facultad de Ciencias Marinas, Universidad de Colima.
[d] Unidad de Energía Renovable, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C.
[e] Unidad de Materiales, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C.

*Autor que presentó el trabajo: jorge.zamora@metropoli.edu.mx
+Autor para correspondencia: galdyhz@gmail.com

Área del Conocimiento: Biomateriales.

ABSTRACT
In this paper, a reactor packed with biosorbents made starting with by-products from the industry and the farm like cactus fiber, sawdust activated coal and hydroxyapatite from eggshells was investigated to treat wastewater impacted by biotic pollutants. The effect of water flow rate was evaluated on the biosorbents efficiency to remove fecal coliform bacteria (FCB) by using two types of flow 2.5 $\pm$ 0.2 (T1) and 5.0 $\pm$ 0.3 mL min^{-1} (T2). Biomaterials showed high removal efficiencies for FCB in a short retention time: 1.5-3 h (86.7% for T2 and 88% for T1). The biomaterial was characterized by Infrared Spectroscopy and Fourier's Formula (IR-TF) obtaining a characteristic profile of the functional groups of flavonoids, which have been reported to have antimicrobial activity. The characterization of cactus fiber was performed via Scanning Electron Microscopy (SEM) found micropores that present a spheric geometry with elongated spaces from 0.720 to 11.933 μm of diameter, which improves the absorption capacity of the material. The results suggest that the by-products tested are an efficient and low cost alternative for wastewater treatment containing FCB.

Keywords: agro-industrial by-products; eco-friendly biosorbents; remediation; pathogenic bacteria.

RESUMEN
En este trabajo, se elaboró un filtro para el tratamiento de aguas residuales impactadas con contaminantes bióticos, a partir de subproductos de origen agrícola e industrial (fibra de nopal, carbón activado de aserrín de pino e hidroxiapatita de cascaron de huevo). Se evaluó el efecto del flujo de agua sobre la eficiencia de los biosorbentes para la remoción de bacterias tipo coliformes (BCF), empleando dos flujos: 2.5 ± 0.2 (T1) y 5.0 ± 0.3 mL min^{-1} (T2), respectivamente. En ambos tratamientos, los biomateriales mostraron una remoción alta de BCF (86.7% para T2 y 88% para T1). La caracterización de los biomateriales se realizó por medio de Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (IR-TF) obteniéndose los grupos característicos de flavonoides, los cuales se ha reportado poseen actividad antimicrobiana. La técnica de Microscopia Electrónica de Barrido (MBE) fue empleada para conocer la

estructura y geometría de la fibra de nopal tratada. El biomaterial mostró múltiples microporos de forma esférica cuyo diámetro osciló entre 0.720 a 11.933 μm. Esta propiedad del biomaterial, representa una ventaja en la remoción bacteriana por su alta superficie de absorción. Con base a estos resultados, se concluye que los subproductos evaluados representan una alternativa eficiente y de bajo costo para el tratamiento de BCF en aguas residuales.

Palabras Clave: subproductos agro-industriales; biosorbentes ambientalmente compatibles; remediación; bacteria patógena.

INTRODUCCIÓN

En México, la mayoría de las plantas de tratamiento municipales son ineficientes en cuanto a la eliminación de contaminantes. Por razones operacionales, no cuentan con la capacidad para tratar el agua residual que reciben. Eso implica la liberación de volúmenes significativos de agua, que solo se halla parcialmente tratada, o que carece de tratamiento. Dicha situación acarrea riesgos para la salud pública y el ambiente [1].

Debido a las estrictas normas internacionales, cada día hay un mayor interés en el desarrollo de sistemas de tratamiento ambientalmente compatibles y de carácter renovable, que permitan reducir la incidencia de enfermedades gastrointestinales. Una tecnología reciente y prometedora para cumplir con tales normas es el uso de materiales bioadsorbentes. Dichos materiales se definen como sólidos de origen biológico con capacidad para retener, sobre su superficie, sustancias específicas que se encuentran en las corrientes líquidas o gaseosas.

Los materiales bioabsorbentes se caracterizan por su inercia química frente al medio en el que se van a utilizar. Presentan grandes beneficios, ya que partir de ellos pueden elaborarse diferentes dispositivos (p.ej.: los biofiltros). Pueden cumplir, adecuada y eficientemente, con los objetivos de la biorremediación de aguas residuales; especialmente en la remoción de compuestos recalcitrantes y/o dañinos para la salud humana, tales como bacterias patógenas, metales pesados, pesticidas, colorantes e hidrocarburos, entre otros. De ahí la importancia de estudiar sus características y estructuras. Igualmente importante es conocer la forma para implementarlos como una alternativa de tratamiento terciario. Es decir, como una opción de bajo costo y ecológicamente racional.

Precisamente, una de las estrategias innovadoras de este proyecto es la elaboración de un biofiltro para tratar aguas residuales a partir de fibra de nopal, cascarón de huevo y aserrín. Los tres tienen origen agrícola e industrial; son materiales de bajo costo, fáciles de adquirir. Una de sus ventajas en la generación de dispositivos con alto valor agregado es su abundancia y conveniencia económica. En ese sentido, ha de considerarse que el estado de Puebla es el segundo productor de huevo a nivel nacional, octavo en producción maderable y un importante productor de nopal, con ventajas competitivas en el país, ya que la producción de nopal y tuna en esta zona se extiende por un período de ocho meses (abril a noviembre) [2].

El presente trabajo se concentra en el campo de las Ciencias Ambientales y tiene como objetivo desarrollar un biofiltro constituido con biomateriales adsorbentes, cuya configuración proporcione altos rendimientos respecto a la remoción de la carga bacteriana en aguas residuales, acordes con las nuevas políticas internacionales sobre el ambiente para lograr un desarrollo sostenible.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de la fibra de nopal

La obtención de la fibra se realizó de forma manual, de acuerdo con la metodología propuesta por Negrete y Prieto [3]. Los cladodios secos del nopal se sometieron a un tratamiento térmico en estufa de secado, durante 3.5 h a una temperatura constante de 60 °C. La desfibrilación del nopal se realizó de manera artesanal con una carda metálica de cerda mediana. La fibra ablandada se sometió a un proceso de esterilización a 121 °C (15 psi) por 15 min. Una vez estéril el material, la fibra se trituró en un molino eléctrico hasta obtener un tamaño de grano pequeño de 0.500 mm.

Obtención de hidroxiapatita a partir de cáscara de huevo

La hidroxiapatita fue obtenida a partir de cáscara de huevo de la industria restaurantera del estado de Puebla, mediante múltiples fases de tratamiento térmico (rampeo) en una mufla.

En una primera instancia, las cáscaras trituradas se sometieron a un proceso de calcinación durante 2 h a 450 °C. Posteriormente los restos se trataron a 900 °C durante 2 h. Subsecuentemente, el producto se dejó enfriar a temperatura ambiente y se le añadió una solución de $Ca_3(PO_4)_2$ para tratarla durante 3 h a 1050 °C [4].

Obtención de carbón activado a partir de aserrín de madera

El aserrín fue tratado térmicamente en una mufla, con una atmosfera controlada (sin presencia de oxigeno), a una temperatura de 800-1200°C por un periodo de 40-60 min, hasta alcanzar la carbonización. Durante un período de 24 horas se dejó enfriar el material resultante, y su activación se realizó en un sistema cerrado (dos matraces Kitazato conectados entre sí), mediante la recirculación constante del vapor de agua a través del Kitazato que contenía el carbón. El carbón se secó en una mufla por 45 min a 65°C de temperatura y se trituró en un molino eléctrico hasta obtener un tamaño de grano pequeño y homogéneo con la ayuda de un tamiz No. 35 (0.500 mm).

Diseño, montaje y empacado del biofiltro

Se diseñó una unidad experimental para el tratamiento de aguas residuales. Constó de 8 bio-reactores verticales de tipo estático, elaborados de vidrio con una capacidad aproximada de 0.1 L cada uno (22 cm L X 3 cm Ø). Para fines estadísticos, cuatro de ellos correspondieron a los tratamientos (empacados con biomateriales) y los restantes a los controles (sin empacar). Para la fase experimental la configuración estructural del biofiltro estuvo conformada de una capa superior compuesta de fibra de nopal, una capa intermedia de carbón activado compactado, y una capa inferior compuesta de una mezcla de hidroxiapatita y fibra de nopal (10:1). El espesor de la capa superior fue de 8.0 cm, y las capas intermedia e inferior fueron de 4.5 cm, para obtener una tasa de empaque total real de ~ 80%.

Pruebas de remediación de efluentes impactados con contaminantes bióticos.

Con el fin de evaluar el efecto del flujo de agua sobre la eficiencia de los biosorbentes para la remoción de bacterias tipo coliformes, se emplearon dos tratamientos con dos repeticiones cada uno: a. 500 mL de agua proveniente del río Atoyac, con un tiempo de residencia de 200 min y b. 500 mL en 100 min, equivalentes a un flujo 2.5 ± 0.2 y 5.0 ± 0.3 mL min^{-1}, respectivamente. Para regular los flujos se utilizó una bomba de vacío (Labessa).

Para la determinación bacteriana, se utilizó el método de filtración en membrana (MF). Las muestras de agua se procesaron bajo la norma mexicana NMX-AA-102-SCFI-2006 [5]. Para ello, se utilizaron muestras concentradas (y diluciones) que fueron filtradas (0.2 μm) utilizando un sistema de vacío. Las membranas se colocaron en medio de cultivo para coliformes totales (agar M-Endo LES), y se incubaron a la temperatura específica para este grupo bacteriano (35 ± 0.5°C). Transcurridas 24 h de incubación, se

contaron las unidades formadoras de colonias (UFC) utilizando un contador de colonias provisto de lupa y pluma.
Los análisis fueron realizados por triplicado. La eficiencia de remoción se calculó utilizando la ecuación propuesta por Zamora-Castro [6]: % ER = (Ci – Cf)/ Ci * 100 donde Ci = concentración inicial (mg L^{-1}), Cf = concentración final (mg L^{-1}).

Caracterización del biomaterial mediante técnicas físico-químicas
La caracterización fisicoquímica de la fibra de nopal se realizó mediante espectroscopia de IR -TF para determinar los grupos funcionales presentes, y mediante Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) para determinar las propiedades físicas del biomaterial (tamaño de poro).

Análisis estadístico
Para detectar diferencias de medias entre tratamientos (flujos), y entre los tratamientos y los controles, se realizó un análisis de rangos múltiples (Kruskal-Wallis) con un nivel de confianza del 95% (α =0.05). Todos los análisis se realizaron mediante el programa estadístico Statistica Ver. 10® (StatSoft, Inc. 2011).

RESULTADOS

En la tabla 1 se muestra la carga bacteriana presente en el agua del río Atoyac, antes y después de ser tratadas con el filtro empacado con los biosorbentes. El tratamiento 1 (2.5 mL min^{-1}) mostró un mayor porcentaje de remoción de bacterias coliformes (88%) que el tratamiento 2 (5.0 mL min^{-1}) 86.7%, sin embargo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (p> 0.05) entre los dos tratamientos. En ambos, los valores de coliformes disminuyeron considerablemente hasta alcanzar concentraciones cercanas a 4.5 x 10^5 UFC/100 mL. Por su parte, los reactores de control no mostraron diferencias significativas (p> 0.05) en la remoción de la carga bacteriana, lo que indica que los biomateriales fueron los responsables de la remediación de coliformes fecales del agua residual.

Tabla 1. Valores promedio (± Des. Est.) de las unidades formadoras de colonia (UFC) antes y después del tratamiento del agua residual con el dispositivo elaborado a base de fibra de nopal, aserrín e hidroxiapatita.

Tratamiento	Flujo	Antes del tratamiento (UFC/100 mL)	Después del tratamiento (UFC/100 mL)	Porcentaje de remoción
Biom T1	2.5 mL min^{-1}	3.60 x 10^6 ± 4.2 X10^4	4.32 x 10^5 ± 1.1 X10^3	88.0% [a]
Biom T2	5.0 mL min^{-1}	3.60 x 10^6 ± 4.2 X10^4	4.79 x 10^5 ± 1.8 X10^3	86.7% [a]
Ctrol 1	2.5 mL min^{-1}	3.60 x 10^6 ± 4.2 X10^4	3.63 x 10^6 ± 5.2 X10^4	0 [b]
Ctrol 2	5.0 mL min^{-1}	3.60 x 10^6 ± 4.2 X10^4	3.56 x 10^6 ± 4.7 X10^4	0 [b]

Las letras diferentes en la misma columna, indican que hay diferencia estadística (p<0.05) (a>b).

En la figura 1 se muestran los espectros de IR -TF de los grupos funcionales de la fibra de los cladodios de nopal, los cuales se encontraron en un rango entre los 500 y 4000 cm^{-1}. Los espectros exhibieron frecuencias de absorción a 875.43 cm^{-1} asignada a la vibración de valencia del enlace $C_{sp}{}^2$-C. Se observan bandas anchas, fuertes y superpuestas alrededor de los 1483 hasta 1407 cm^{-1}, que pueden ser debidas a la tensión del enlace C-O sin equilibrio cetoenólico. Una banda ancha a 2899 cm^{-1} correspondiente a las vibraciones del enlace C-H. La vibración de la banda a 3252 cm^{-1} es característica de los grupos OH.

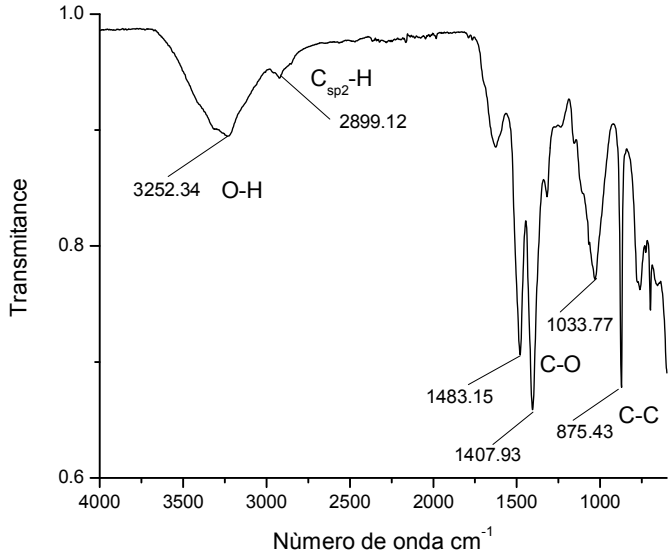


Figura 1.- Espectro de infrarrojo por transformada de Fourier de la fibra de nopal

La figura 2 muestra la fotografía tomada con el microscopio electrónico de barrido de la fibra de nopal utilizada en el presente estudio. En general, la estructura interna del nopal se caracteriza por presentar una estructura irregular constituida de una gran cantidad de microporos (en un rango de 0.720 a 11.933 µm) de forma alargada o de geometría esférica cavernosa, que sirve de sitio de anclaje o reservorio para la retención de bacterias.

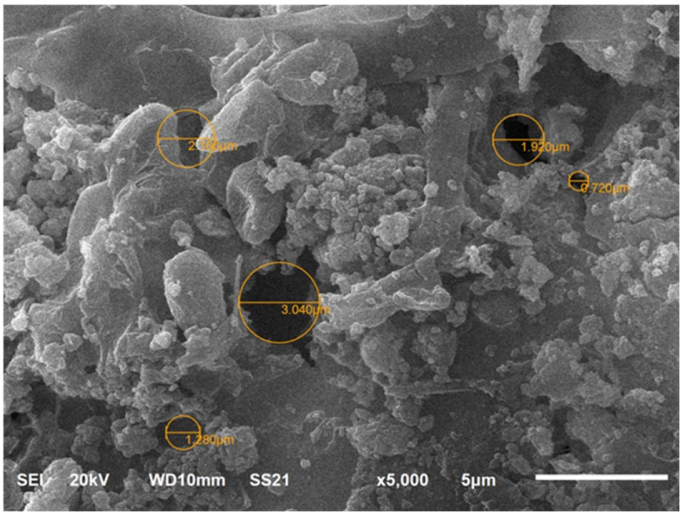


Figura 2.- Fotografía de microscopía electrónica de barrido de morfología de la fibra de nopal

DISCUSIÓN

En la última década, se han desarrollado tecnologías de bioadsorción basadas en la remoción de diversas especies contaminantes que se encuentran el en agua (principalmente metales pesados y colorantes). Se ha realizado mediante la unión pasiva de biomoléculas o iones a biomasa desnaturalizada (muerta), los cuales han mostrado potencialidad para el tratamiento terciario del agua a gran escala [7].

En este trabajo evaluamos la eficiencia de los tres subproductos de origen agrícola e industrial mencionados. Son abundantes en la región (fibra de nopal, carbón activado de aserrín de pino e hidroxiapatita de cascaron de huevo) como biosorbentes para la remoción de bacterias coliformes fecales. Los resultados mostraron una eficiencia de remoción alta (arriba del 85%). Algo importante es que no se halló un efecto significativo ($p> 0.05$) entre el tiempo de contacto del agua residual con el biosorbente sobre la remoción de BCF. A pesar de ello, es necesario determinar el nivel de saturación del material, para establecer la vida media útil del biomaterial.

La caracterización de la fibra de cladodios secos de nopal por medio de espectroscopia IR-TF, revelan la presencia de grupos funcionales característicos de flavonoides, los cuales se ha reportado poseen actividad antimicrobiana. Pereira Souza et al [8] determinaron la composición fitoquímica de *Opuntia ficus-indica*, detectando la presencia de flavonoides con propiedades antioxidantes, anti-inflamatorios, antimicrobiano y actividades inhibidoras fotoprotectoras y enzimáticas [8]. Balbuena et al [9] empleando flavonoides de la hoja de tamarindo, planteó que los flavonoides podrían ser los responsables del efecto de inhibición del crecimiento bacteriano por la inducción de la ruptura de su DNA en un sitio determinado; por bloqueo del complejo aminoacil transferasa, por intercalación entre bases del ADN alterando la síntesis de ácido nucleico o por la formación de dímeros de timina. De tal modo, que la presencia de flavonoides en la fibra de cladodios secos de nopal es una condición que podría favorecer en la reducción de la carga bacteriana en el agua residual [9].

Un análisis más a fondo de los perfiles del espectro de IR-TF revelan que el nopal contienen una variedad de grupos funcionales tales como carboxilo, hidroxilo, cetonas y otros grupos cargados, que difieren en afinidad y especificad respecto a la susceptibilidad para unirse a los diferentes compuestos diana [10]. Esta gama de grupos funcionales sugieren que este biomaterial puede además ser considerado como una alternativa para la eliminación de colorantes y metales pesados. Por ejemplo, se ha encontrado que el mucilago de *Opuntia ficus-indica* está compuesto por una mezcla de polisacáridos ácidos y neutros que sirven de agentes quelantes de metales pesados [11]. De igual modo, la composición del nopal podría conferir a esta biomasa la posibilidad de establecer vínculos con las moléculas orgánicas que incluyen colorantes. No obstante, en la actualidad es escasa o nula la información sobre el potencial de biosorción de esta biomasa sobre contaminantes bióticos.

La técnica de microscopia electrónica de barrido fue empleada para conocer la estructura y geometría de la fibra de nopal tratada. El material mostró múltiples microporos de forma esférica cuyo diámetro osciló entre 0.720 a 11.933 μm. La alta porosidad y gran superficie de área/volumen exhibida por la fibra del nopal y el carbón activado de pino, permitió que el agua residual pasara libremente sobre los biosorbentes, y consecuentemente se promoviera la auto-fijación de microorganismos. Esta propiedad del biomaterial, representa una ventaja al permitir una mayor superficie de contacto y adherencia bacteriana.

Por otra parte, el pretratamiento térmico y químico de los biomateriales, juega un papel importante para mejorar la capacidad de adsorción de la biomasa mediante la modificación de la superficie celular. Ambos tratamientos, permiten una mayor exposición de los sitios de unión (microporos), favoreciendo la adhesión de BCF al biomaterial.

La hidroxiapatita fue empleada como un adsorbente físico, dado su alto grado de compactación. En el biofiltro, las partículas de hidroxiapatita estuvieron estrechamente empaquetadas y dado que las dimensiones de los microbios son pequeñas (ca, 0.5- 5 μm de diámetro) tienen una alta capacidad para absorber tanto bacterias como virus.
Queda claro que la hidroxiapatita, al igual que carbón activado y la fibra de nopal son candidatos muy prometedores para ser empleados como biosorbentes naturales, para el tratamiento económico de aguas residuales, dado que son subproductos agro-industriales eficaces, abundantes y de bajo costo.

CONCLUSIONES

Con base a los resultados se sugiere que el dispositivo construido a partir de subproductos agro-industriales (fibra de nopal, carbón activado de aserrín de pino e hidroxiapatita de cascaron de huevo) permitió reducir eficientemente la carga bacteriana presente en aguas residuales, y que su mantenimiento no representa un costo energético y económico elevado en comparación con los sistemas tradicionales.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Dr. Efraín Rubio Rosas, del Centro Universitario de Vinculación y Transferencia de Tecnología (CUVyTT) de la BUAP por el apoyo técnico para los análisis de Microscopía Electrónica de Barrido y el análisis IR-TF. También, agradecemos al Dr. Álvaro Zamora Castro por la valiosa revisión y atinados comentarios que contribuyeron a mejorar el artículo.

REFERENCIAS

[1] Howard, I., Espigares, E., Landelli, P., Martin, J. L., Espigares M. (2004). “Evaluation of Microbiological and physicochemical indicators for wastewater treatment”, Environmental Toxicology, 19 (3): 241-249.

[2] SIAP. (2011). Anuario Estadístico de la Producción Agrícola de los Estados Unidos Mexicanos. Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera. México, D.F.: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, 305.

[3] Negrete, L. A., Prieto, A. (2010). “Extraccion de fibras de agave para elaborar papel y artesanias”, Acta Universitaria, 77-83.

[4] Sadat-Shojai M., Mohammad-Taghi, K., Dinpanah-Khoshdargi, E., Jamshidi, A. (2013). “Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures”, Acta Biomaterialia, 9 (8): 7591–7621.

[5] NMX-AA-102-SCFI-2006. (2006). Que establece los requisitos y especificaciones de calidad del agua – detección y enumeración de organismos coliformes, organismos coliformes termotolerantes y *Escherichia coli* presuntiva – método de filtración en membrana. Secretaría de Economía. México.

[6] Zamora-Castro, J. (2004). Sistema de bio-remediación de un efluente costero marino mediante tapetes microbianos construidos. (Tesis de maestría, CICESE): 172.

[7] Cukierman., A. L. (2007). “Metal ion biosorption potential of lignocellulosic biomasses and marine algae for wastewater treatment”, Adsorption Science and Technology, 25 (3-4): 227–244.

[8] Pereira Souza, C. M., Silva Almeida, F., Veiga Junior, V. F., Goulart de Lima Damasceno, B. P., Dantas Medeiros, A. C., Pereira Santana, D., Silva, J.A. (2014). "Characterization of atomized extract of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. and assessment of its pharmaceutical potential". Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, 35 (2):195-203.

[9] Balbuena Escalona, V., Calderius Espinosa, I., Arias, M. (1994). "Caracterización físico-química de los extractos de *Tamarindus indica* Lin. y su acción como antibacteriano", Informe final Bayamo. Granma: Grupo de trabajo para la investigación de plantas medicinales.

[10] Barka, N., Ouzaouit, K., Abdennouri, M, El Makhfouk, M. (2013). "Dried prickly pear cactus (*Opuntia ficus indica*) cladodes as a low-cost and eco-friendly biosorbent for dyes removal from aqueous solutions", Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 44:52–60.

[11] Trachtenberg, S., Mayer, A.M. (1981). "Composition and properties of *Opuntia ficus-indica* mucilage", Phytochemistry, 20: 2665–2668.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

MICROENCAPSULATION OF CURING AGENT FOR THE FORMULATION OF EPOXY ADHESIVES

(Microencapsulación de un agente de curado para la formulación de adhesivos epóxicos)

Carlos F. De la Peña C.[a]*, Tito E. Herrera L.[a+], Roberto Ibarra W.[b]

[a]Laboratorio Polytex, Departamento de Química, Universidad Autónoma de Guadalajara.
[b]Centro de Innovación en Manufactura Avanzada, CIMA de BC, S.A. de C.V.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: therrera@edu.uag.mx

Área del Conocimiento: Biomateriales.

ABSTRACT
Traditional epoxy adhesives are formulated immediately before use by mixing the two essential components; A bifunctional epoxy compound and a curing agent which is usually an amine, which may be difunctional or polyfunctional. Once the two components are mixed polymerization starts and takes few hours before the resin hardens completely. In the electronics industry preformulated epoxy adhesives are used for the die attach process and to prevent the curing reaction, they are transported and stored at -40 ° C which increases its cost. Before use, they are brought to room temperature and only has 48 hours to use. The material that is not used is discarded increasing the cost of the process. The objective of this work is to obtain an epoxy adhesive stable at room temperature, pre-formulated with microencapsulated curing agent. The curing agent is activated only when the melting temperature of the polymeric shell of the microcapsules is reached. Results of microencapsulation technique, characterization of the microcapsules, properties of the formulated adhesive and performance are presented.

Keywords: Epoxy Adhesives, Microencapsulation, Curing Agent.

MECHANODYNAMIC PROPERTIES OF COMPOSITES BASED ON THERMOPLASTIC STARCH/POLY(LACTIC ACID)/AGAVE BAGGASE FIBER

(Absorción de agua y propiedades mecanodinámicas de compositos con base en el almidón termoplástico/Poli (ácido láctico)/ Fibra de Bagazo de Agave)

Francisco José Aranda-García[a*+], Rubén González-Nuñez[a], Carlos Federico Jasso-Gastinel[a], Martín Rabelero Velazco[a], J. Felix Armando Soltero Martínez[a], Eduardo Mendizabal Mijares[a]

[a]Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Departamento de Ingeniería Química, Blvd Marcelino García Barragán 1421.Guadalajara, Jal., Méx.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: iq.pacoaranda@gmail.com

Área del Conocimiento: Biomateriales.

ABSTRACT
Nowadays a large amount of nonbiodegradable plastics is generated; to overcome that problem, natural fibers to reinforce starch based plastics have been developed. As a consequence, the production and use of synthetic plastics may be reduced in the near future. In this work water absorption and mechanodynamical behavior of composites based on thermoplastic starch (TPS) are presented. The concentration of discarded agave bagasse fibers (ABF, 0–15 wt %) and poly(lactic acid) (PLA, 0–30 wt %) is varied. Glycerol (G) is used as plasticizer of corn starch (S) as polymer matrix (70/30 w/w, S/G). Hygroscopicity of plasticized starch decreases as PLA and fiber content increase. TPS is a highly hygroscopic biodegradable material with low storage modulus (E '), which with the addition of the biodegradable materials included here (PLA and/or ABF), presents an increase in moduli. The ABF was washed, milled and sieved. The amounts required of TPS, PLA and ABF were mixed in a twin screw extruder to obtain a continuous cord that was pelletized and then processed by thermal compression. For the samples, the adsorbed moisture was determined. Materials were characterized by dynamic mechanical analysis (DMA), Differential Scanning Calorimetry (DSC), Fourier Transformed Infrared (FT-IR) and Scanning Electronic Microscopy (SEM). The moisture absorption decreases with ABF and/or PLA content. The storage modulus increases with ABF and PLA content. The TPS glass transition temperature increases with ABF content and decreases with PLA content. Micrographs of the studied biocomposites show a stratified brittle surface with a rigid fiber fracture. Such types of modifications promote rigidity in the composites; in addition, the wood appearance and biodegradability justify the production of this type of composites for many applications.

Keywords: thermoplastic starch, agave bagasse fibers, poly(lactic acid), mechanodynamical analysis.

INTRODUCCIÓN

El almidón (S) es un biopolímero que es económico el cual puede ser utilizado para producir materiales plásticos y que existe en abundancia [1]. El almidón tiene una temperatura de fusión alrededor de 240°C

[2–4] y está compuesto por dos moléculas diferentes amilosa y amilopectina, las cuales tienen muy diferentes propiedades físicas y químicas. Infortunadamente, los materiales con base en el almidón tienen propiedades mecánicas bajas debido a su carácter hidrofilico [5, 6] para solucionar este problema se han utilizado diferentes proporciones de mezclas de polímeros, plastificantes, compatibilizantes o agentes de reforzamiento (por ejemplo fibras naturales o sintéticas han sido utilizadas [1-3].

El almidón termoplástico (TPS) se puede preparar al adicionarle un plastificante (agua, glicerol, sorbitol, azúcares, o aminoácidos) al almidón; de esta de esta manera, la temperatura de transición vítrea (T_g) disminuye y el moldeo del TPS se hace factible bajo la acción de temperatura y presión [7, 8]. El glicerol (G) es el plastificante más comúnmente utilizado en proporciones que van del 20 a 50% en peso de almidón (S / G, % w / w).

Entre las ventajas de utilizar a las fibras naturales como materiales reforzantes se pueden considerar: el mejoramiento de las propiedades mecánicas de la matriz termoplástica, la minimización de la contaminación del medio ambiente [6, 9] y menores costos de producción; sin embargo, las fibras tienen algunas limitaciones, como temperaturas de procesamiento limitadas a temperaturas inferiores a los 200 °C, además de tener poca resistencia a los microorganismos [6, 9]

Dufresne et al. reportaron los primeros trabajos de compositos de almidón / fibra, donde se obtuvieron mezclas de fécula de papa y nanofibras de celulosa en forma de película, la adición de las nanofibras celulósicas al almidón produce: una disminución en la sensibilidad a la humedad, un aumento en las propiedades termomecánicas además de mantener la biodegradabilidad; y por otra parte encontraron que la humedad de equilibrio aumentaba con el contenido de glicerol y disminuía con el contenido de las nanofibras [10].

También se ha reportado que al mezclar el TPS con algún polímero biodegradable como el poli (ácido láctico) (PLA) tanto el módulo de Young como la resistencia a la tracción se incrementan con el aumento del contenido de PLA mediante el mezclado con TPS [11, 12].

Aunque hay estudios previos sobre el efecto de la adición de algunas fibras celulósicas y TPS al PLA [13-15]. sobre la absorción de humedad y propiedades mecánicas del material, no hay reportes que muestren resultados mecánicos, termomecánicos y morfológicos de TPS con fibra de agave, además de que en este caso el polímero matriz es el almidón en lugar del PLA.

METODOLOGÍA

Materiales Los materiales utilizados en este trabajo fueron: Almidón de maíz (IMSA) con 10% de humedad, Glicerol QP (Reactivos Golden Bell), Bagazo de agave tequila *Weber* var. Azul, PLA (Ingeo Biopolymer 3521D Industries Leben) y Nitrato de magnesio (Fermont). Para obtener el TPS, el almidón fue secado durante 24 h a 60°C, enseguida se mezcló manualmente con el glicerol (30% en peso). Después el TPS se mezcló con las diferentes cantidades de PLA y Fibra (Tabla 1), en una extrusora de doble husillo (Leistritz Micro 27 GL / GG 32D) e inmediatamente se granuló. Los gránulos de los diferentes compositos fueron moldeados por compresión térmica (Schwabenthan Polystat 200T) durante 2 minutos en un prensa a 180°C y 200 Bar, finalizando con un enfriamiento de 10 minutos manteniendo la presión.

Tabla 1.Formulaciones de Compositos de TPS.

S, g	G, g	TPS*, g	PLA, g	ABF, g	% PLA en mezcla polimérica•	ABF wt % in composite▼
70	30	100	0	0	0	0
63	27	90	10	0	10	0
56	24	80	20	0	20	0
49	21	70	30	0	30	0
70	30	100	0	11.11	0	10
63	27	90	10	11.11	10	10
56	24	80	20	11.11	20	10
49	21	70	30	11.11	30	10
70	30	100	0	17.65	0	15
63	27	90	10	17.65	10	15
56	24	80	20	17.65	20	15
49	21	70	30	17.65	30	15

* TPS es la mezcla de S y G. • Mezcla polimérica representa la mezcla de TPS y PLA. ▼Composito representa el sistema de TPS/PLA/ABF.

Humedad de equilibrio. Primero los compositos se secaron a 60°C durante 24 h; entonces la muestra fue pesada y colocada a 25°C en una cámara cerrada mantenida a 53% de humedad relativa (solución saturada de nitrato de magnesio). El peso de cada una las muestras fue registrado a diferentes tiempos hasta que el peso constante fue alcanzado.

Pruebas mecanodinamicas. Las pruebas mecanodinámicas se llevaron a cabo siguiendo la norma ASTM D5023-01, utilizando un analizador mecanicodinámico (TA Q800 DMA) con las siguientes condiciones: Rango de tempetatura: -85 a 150°C, velocidad de calentamiento 2°C/min utilizando la mordaza de tres puntos en flexión y una frecuencia de 1 Hz. Antes de la prueba las muestras se secaron a 60°C por 30 días.

RESULTADOS

En la Figura 1 muestra una curva típica de absorción de humedad para los compositos estudiados. En dicha figura se muestra que la velocidad de absorción de la humedad disminuye a medida que aumenta el contenido de fibra, y que la humedad de equilibrio se alcanza en aproximadamente dos semanas. En la Figura 2, se muestra para todas las formulaciones que el contenido de la humedad de equilibrio disminuye conforme la cantidad de fibra aumenta; esto se puede explicar por el menor carácter hidrofílico de la fibra en comparación con el TPS; tal comportamiento ha sido reportado para compositos de fibras de bagazo y TPS donde se mostró una disminución en la humedad de equilibrio conforme aumentó el contenido de fibra [16]. Además, independientemente del contenido de fibra, el aumento en la concentración de PLA provoca una disminución en la capacidad de absorción de humedad del composito (Figura 2) debido que el PLA es un material menos hidrofílico que el TPS.

La Figura 3 muestra el módulo de almacenamiento como una función de la temperatura para los materiales compuestos (compositos) que contienen 20% de PLA. Los compositos mantienen su meseta ahulada aproximadamente 10 °C más que la mezcla de polímeros; esto indica que la fibra actúa como un material de refuerzo debido a su rigidez y a la formación de puentes de hidrógeno entre el TPS y la fibra. Los módulos de almacenamiento de los otros materiales muestran comportamientos similares.

Los módulos de almacenamiento a 25°C de los compositos estudiados se muestran en la Figura 4. Esta figura indica que los módulos de almacenamiento más altos se obtienen cuando contienen la fibra y/o el PLA y este aumento es mayor con el incremento del contenido de fibra y/o PLA. Tal efecto de reforzamiento se debe a la rigidez del PLA y de la fibra además de que pueden interactuar con el TPS mediante los puentes de hidrógeno.

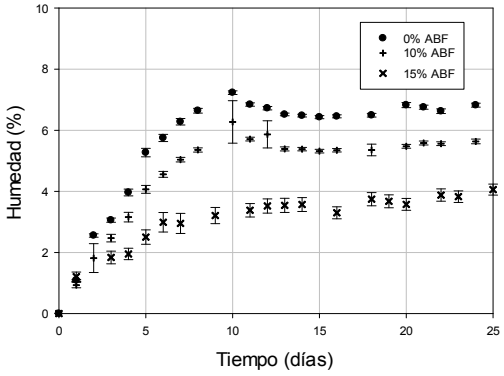


Figura 1. Absorción de humedad de mezcla y compositos vs. tiempo para materiales conteniendo 30 % en peso de PLA.

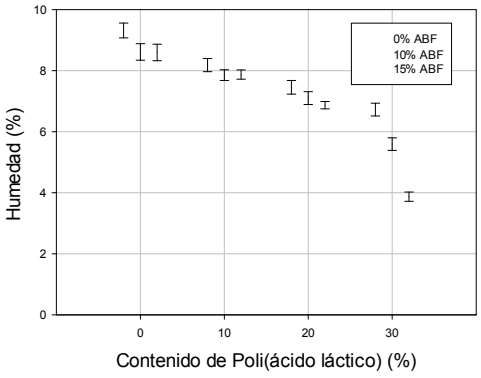


Figura 2. Humedad de equilibrio para compositos de TPS.

En la Figura 5 se muestra el factor de disipación (tan ⍰⍰ versus temperatura para la mezcla polimérica y compositos que contienen el 20% de PLA. En la figura se muestran las T_g´s de los componentes de los compositos en forma de picos, el primer pico aparece alrededor de las -55°C (T_g glicerol), el segundo aparece a los 60°C, el cual es atribuido a la T_g del PLA y el tercer pico aparece a los 115°C el cual corresponde al almidón.

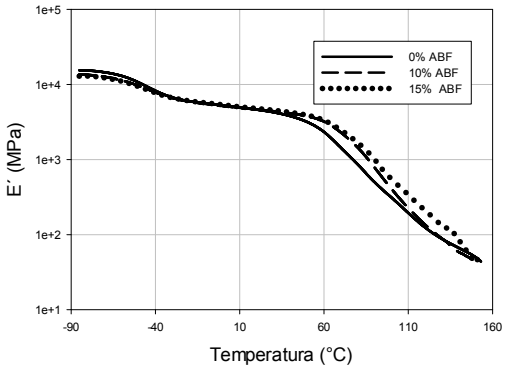


Figura 3. Módulo de almacenamiento en función de la temperatura para materiales que contienen 20% de PLA.

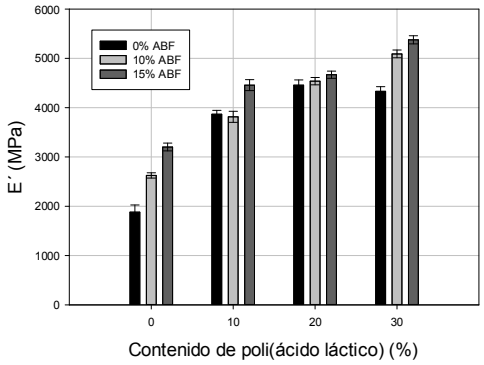


Figura 4. Módulo de almacenamiento para compositos a 25°C.

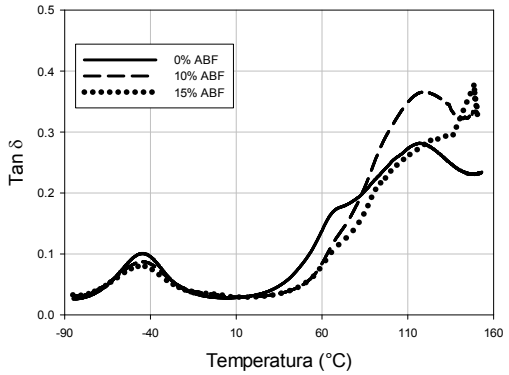


Figura 5. Tan δ vs temperatura para materiales que contienen 20% de PLA.

En la Tabla 2 se indica que el incremento en el contenido de PLA provoca una disminución en la T_g correspondiente al almidón en los compositos; esto puede ser explicado porque la T_g del PLA es menor que la T_g del almidón (T_g=220°C) [4]. En la Tabla 2, también puede ser notado que para contenidos constantes de PLA existe un incremento en la T_g conforme el contenido de fibra se incrementa, el desplazamiento de la T_g puede ser atribuido a la disminución de la movilidad de las cadenas de almidón y a la interacción entre las fibras y el TPS [17].

Tabla 2. T_g del almidón de mezclas y compositos obtenidas por DMA.

Mezcla polimérica	T_g °C		
Contenido de PLA, %	0% ABF	10% ABF	15% ABF
10	120	124	132
20	115	120	130
30	111	114	127

Los termogramas de DSC (Figura 6) muestran las transiciones térmicas de los materiales que contienen 20% de PLA (mezcla polimérica y sus compositos). Alrededor de los 60°C se observa un cambio en la pendiente de las diferentes curvas, lo cual corresponde a la T_g del PLA, la siguiente transición es el pico exotérmico que aparece aproximadamente a los 100°C el cual se relaciona a la temperatura de cristalización (T_c) del PLA, facilitada por presencia del plastificante [18]; después, entre los 120 y 130°C aparece la T_g del almidón; tales valores para los diferentes compuestos corresponden a las T_g´s obtenidas por los picos de tan δ (Tabla 2) y finalmente el pico endotérmico que aparece alrededor de los 165°C corresponde a la temperatura de fusión del (T_m) PLA

La Tabla 3 muestra la T_g de las mezclas y compositos, donde se observa que la T_g correspondiente del PLA es menor al PLA puro (62°C); lo cual puede atribuirse a la migración del glicerol [19], por otra parte los valores correspondientes a la T_g del PLA en los compositos con el mayor contenido de fibra (15%) muestran una ligera disminución causada por una mayor movilidad de la cadenas del PLA; por ejemplo, Jaafar et al reportaron una disminución de la T_g del PLA por la presencia de fibras de kenaf que ellos atribuyeron a que las fibras aumentaron la movilidad de las cadenas del PLA. [20]

Las T_c se muestran en la Tabla 4, donde no se pueden ver efectos notables con el incremento en la concentración de fibra y/o PLA. Texeira et al reportaron una pequeña disminución en T_c por la presencia de TPS y bagazo de yuca [21].

En la Tabla 5 se presentan las T_m del PLA de los diferentes materiales y se muestra que la T_m del PLA en el composito aumenta ligeramente con contenido PLA y disminuye ligeramente con la adición de fibra de agave. Esta disminución se explica por la interferencia que las fibras de agave pueden causar para permitir la cristalización del PLA, Castaño et al reportaron una disminución de la cristalinidad con el contenido de pehuén [22]. Antes de los picos de fusión del PLA, aparece un pequeño "hombro" el cual se atribuye a la reordenación de las fracciones lamelares formadas durante la cristalización del PLA [23], o a la fusión previa de pequeños cristales.

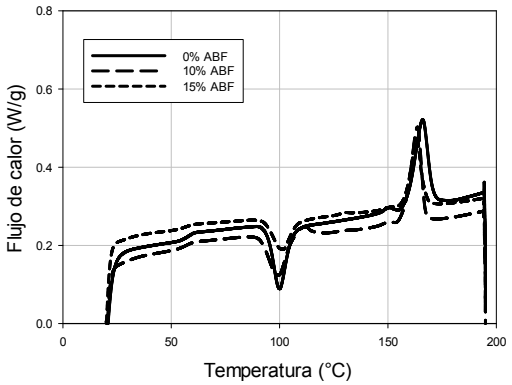


Figura 6. Termogramas obtenidos por DSC de materiales con 20% de PLA

Tabla 3. T_g del PLA en °C para mezclas poliméricas y compositos TPS/PLA/ABF.

Contenido de PLA en mezclas poliméricas, %	Contenido de ABF en compositos ,%		
	0	10	15
10	57.0	57.1	54.5
20	57.0	57.3	55.5
30	57.0	57.0	56.0

Tabla 4. T_c del PLA en °C para mezclas poliméricas y compositos TPS/PLA/ABF.

Contenido de PLA en mezclas poliméricas, %	Contenido de ABF en compositos ,%		
	0	10	15
10	100.0	100.7	99.1
20	99.9	99.8	101.0
30	98.9	100.4	100.25

Tabla 5. T_m del PLA en °C de las mezclas poliméricas y compositos de TPS/PLA/ABF

Contenido de PLA en mezclas poliméricas, %	Contenido de ABF en compositos ,%		
	0	10	15
10	163.0	164.5	161.0
20	165.9	163.6	163.4
30	166.1	165.9	163.2

En la Figura 7 se muestra la resistencia al impacto de los diferentes materiales después de alcanzar la humedad relativa de equilibrio a 25°C y 53% de humedad relativa**,** se puede observar que el aumento de rigidez del TPS causado por la presencia de PLA y / o ABF, conduce a una disminución de la resistencia al impacto. Tal valor disminuyó 76% al adicionarle el 20% en peso de PLA, y 82% cuando se incluyó el 15% de ABF a dicha mezcla.

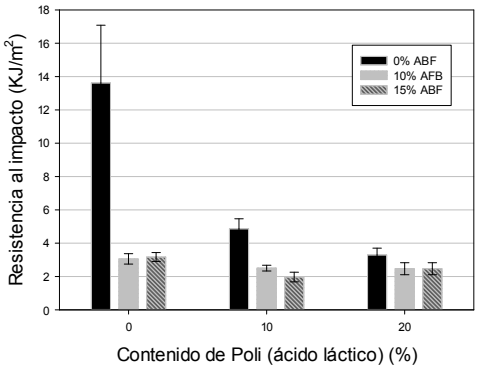


Figura 7. Resistencia al impacto de materiales poliméricos variando el contenido de PLA.

En la Figura 8 se muestran los espectros FT-IR de los materiales con 20% de PLA. Se puede observar que no existen cambios evidentes, sin embargo al adicionar la fibra de agave se tienen pequeños cambios en la intensidad de señal de los grupos CH_2 y CH_3 que aparecen alrededor de los 2850 y 2950 cm^{-1}, del grupo OH (3300 cm^{-1}) y el grupo carbonilo del PLA (1750cm^{-1}) son debido a las interacciones puente de hidrógeno. Los demás materiales siguen este comportamiento.

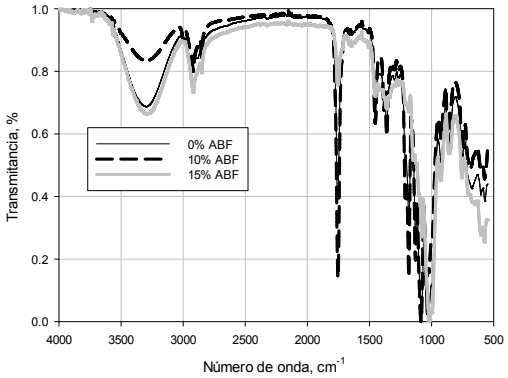


Figura 8. Espectros FT-IR de materiales con 20% de PLA.

En la Figura 9 se puede observar un rompimiento rígido en las fibras de agave dispersas en la mezcla polimérica



Figura 9. Imagen obtenida por SEM del material que contiene 20% de PLA en la mezcla polimérica y 15% de ABF en el composito

CONCLUSIONES

Para los compositos estudiados, la adición del PLA y la fibra de agave contribuyen a disminuir la absorción de agua, la resistencia al impacto, e incrementar el módulo de almacenamiento. La temperatura de transición vítrea del almidón se incrementa con el contenido de fibra de agave y disminuye con el contenido de PLA. La adición del 15% de fibra de agave disminuye tanto la T_g y la T_m del PLA mientras que para T_c no existe un cambio significativo. Este tipo de modificaciones promueve la rigidez en los compositos; adicionalmente, la apariencia de madera y la biodegradabilidad justifica la producción de este tipo de compositos para diversas aplicaciones

AGRADECIMIENTOS

Francisco José Aranda García agradece al CONACYT por su beca doctoral

REFERENCIAS

[1]Guimarães, J. L., Wypych, F., Saul, C. K., Ramos, L. P., Satyanarayana, K. G. (2010), "Studies of the processing and characterization of corn starch and its composites with banana and sugarcane fibers from Brazil", Carbohydrate Polymers, 80(1): 130–138.

[2]Sarazin, P., Li, G., Orts, W. J., Favis, B. D. (2008), "Binary and ternary blends of polylactide, polycaprolactone and thermoplastic starch", Polymer, 49(2): 599–609.

[3]Wang, H., Sun, X., Seib, P. (2002), "Effects of starch moisture on properties of wheat starch/poly (lactic acid) blend containing methylenediphenyl diisocyanate", Journal of Polymers and the Environment, 10(4): 133–138.

[4]Dufresne, A., Dupeyre, D., Vignon, M. (2000), "Cellulose Microfibrils from Potato Tuber Cells : Processing and Characterization of Starch – Cellulose Microfibril Composites", Polymer, 76(14): 2080–2092.

[5]Shogren, R. L. (1995), "Poly (ethylene oxide)-coated granular starch-poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) composite materials", Journal of Polymers and the Environment, 3(2): 75–80.

[6]Yu, L., Dean, K., Li, L. (2006), "Polymer blends and composites from renewable resources", Progress in Polymer Science, 31(6): 576–602.

[7]Liu, H., Xie, F., Yu, L., Chen, L., Li, L. (2009), "Thermal processing of starch-based polymers", Progress in Polymer Science, 34(12): 1348–1368.

[8]Forssell, P. M., Mikkilä, J. M., Moates, G. K., Parker, R. (1997), "Phase and glass transition behaviour of concentrated barley starch-glycerol-water mixtures, a model for thermoplastic starch", Carbohydrate Polymers, 34(4): 275–282.

[9]John, M. J., Thomas, S. (2008), "Biofibres and biocomposites",. Carbohydrate Polymers, 71(3): 343–364.

[10]Dufresne, A., Vignon, M. R. (1998), "Improvement of starch film performances using cellulose microfibrils", Macromolecules, 31(8): 2693–2696.

[11]Huneault, M. A., Li, H. (2007), "Morphology and properties of compatibilized polylactide/thermoplastic starch blends", Polymer, 48(1):, 270–280

[12]Jiang, L., Liu, B., Zhang, J. (2009), "Novel High-Strength Thermoplastic Starch Reinforced by in situ Poly(lactic acid) Fibrillation", Macromolecular Materials and Engineering, 294(5): 301–305.

[13]Iovino, R., Zullo, R., Rao, M. A., Cassar, L., Gianfreda, L. (2008), "Biodegradation of poly (lactic acid)/starch/coir biocomposites under controlled composting conditions", Polymer Degradation and Stability, 93(1): 147–157.

[14]Bocz, K., Szolnoki, B., Marosi, A., Tábi, T., Wladyka-Przybylak, M., Marosi, G. (2013), "Flax fibre reinforced PLA/TPS biocomposites flame retarded with multifunctional additive system", Polymer Degradation and Stability, 106(1):63-73

[15]Smitthipong, W., Tantatherdtam, R., Chollakup, R. (2013), "Effect of pineapple leaf fiber-reinforced thermoplastic starch/poly(lactic acid) green composite: Mechanical, viscosity, and water resistance properties", Journal of Thermoplastic Composite Materials, 28(5):717-729.

[16]Vallejos, M. E., Curvelo, A. a. S., Teixeira, E. M., Mendes, F. M., Carvalho, A. J. F., Felissia, F. E., Area, M. C. (2011), "Composite materials of thermoplastic starch and fibers from the ethanol–water fractionation of bagasse", Industrial Crops and Products, 33(3): 739–746.

[17]Avérous, L., Fringant, C., Moro, L. (2001), "Plasticized starch ± cellulose interactions in polysaccharide composites", Polymer, 42(15), 6565–6572.

[18]Martin, O., Averous, L. (2001), "Poly (lactic acid): plasticization and properties of biodegradable multiphase systems", Polymer, 42(14): 6209–6219.

[19]Li, H., Huneault, M. A. (2011), "Comparison of Sorbitol and Glycerol as Plasticizers for Thermoplastic Starch in TPS / PLA Blends", Journal of Applied Polymer Science, 119(4): 2439–2448.

[20]Jaafar, W., Raihan, W. N., Siti Norasmah, S., Azmi, N. N., Noor Najmi, B., Anuar, H., Bahri, S. (2012), "Thermal Properties of PLA/Kenaf Green Nanocomposite: Effect of Chemi-Mechanical Treatment", Advanced Materials Research, 576: 342–344.

[21]Teixeira, E. D. M., Curvelo, A. a. S., Corrêa, A. C., Marconcini, J. M., Glenn, G. M., Mattoso, L. H. C. (2012), "Properties of thermoplastic starch from cassava bagasse and cassava starch and their blends with poly (lactic acid) ", Industrial Crops and Products, 37(1):, 61–68.

[22]Castaño, J., Rodríguez-Llamazares, S., Carrasco, C., Bouza, R. (2012), "Physical, chemical and mechanical properties of pehuen cellulosic husk and its pehuen-starch based composites", Carbohydrate Polymers, 90(4): 1550–1556

[23]Way, C., Wu, D. Y., Cram, D., Dean, K., Palombo, E. (2012), "Processing Stability and Biodegradation of Polylactic Acid (PLA) Composites Reinforced with Cotton Linters or Maple Hardwood Fibres", Journal of Polymers and the Environment, 21(1): 54–70.

REMOVAL MECHANISM OF CADMIUM ION BY CHITOSAN SULFATE

(Mecanismo de remoción del ión cadmio por sulfato de quitosana)

Nely Ríos Donato[a], Martha Patricia Macías Pérez[a*], José Antonio Rivera Mayorga[a], Eduardo Mendizábal Mijares[a*+]

[a]Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Departamento de Química, Blvd. Marcelino García Barragán 1421.Guadalajara, Jal., México

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: lalomendizabal@hotmail.com

Área del Conocimiento: Biomateriales.

ABSTRACT
There is great interest in using biomaterials for removing metal ions from aqueous media, because they are biodegradable and are not harmful to the environment. An example of biomaterials is chitosan (Q) that is capable of removing metal ions such as cadmium, chromium, and copper. However, the use of this polymer as an adsorbent is limited because its solubility in acidic media. In this paper chitosan sulfate (SQ), a derivative of chitin, which is insoluble in a wide pH range (2.0-9.0) is used as an adsorbent of cadmium ions. Amino and sulfate groups present in the SQ can complex with metals. SQ was synthesized and characterized. Cadmium solutions were prepared at a concentration of 1000 mg /L. Adsorption experiments were conducted in plastic centrifuge tubes of 15 mL, placing a mass of 0.300 g of SQ and adding 10 mL of the solution of the metal ion. The suspension was stirred for 24 hours at 25 C. The tubes were centrifuged at 1380 rpm to separate the solid phase from the liquid phase. The solid phase was analyzed by infrared spectroscopy.

Keywords: Removal; Chitosan Sulfate; Mechanism; Cadmium.

RESUMEN
Hay un gran interés en la eliminación de iones metálicos de medios acuosos mediante biomateriales debido a que éstos son biodegradables y no son perjudiciales para el medio ambiente. Un ejemplo de biomateriales es el quitosano (Q) que es capaz de eliminar iones de metales tales como cadmio, cromo, y cobre. Sin embargo, el uso de este polímero como adsorbente está limitado debido a su solubilidad en medios ácidos. En este trabajo un derivado de la quitina, el sulfato de quitosano papel (SQ), que es insoluble en un amplio intervalo de pH (2,0 a 9,0) se utiliza como un adsorbente de iones de cadmio. Los metales pueden formar complejos con los grupos presentes en el SQ (grupos hidroxilo y amino) . El SQ fue sintetizado y caracterizado. Se prepararon soluciones de cadmio a una concentración de 1000 mg / L. Los experimentos de adsorción se realizaron colocando una masa de 0.300 g de SQ en tubos de centrífuga de plástico de 15 ml y la adición de 10 ml de la solución del ión metálico. La suspensión se agitó durante 24 horas a 25 °C. Los tubos se centrifugaron a 1,380 rpm para separar la fase sólida de la fase líquida. La fase sólida se analizó por espectroscopia infrarroja.

Palabras clave: Eliminación; sulfato de quitosana; mecanismo; cadmio.

INTRODUCCIÓN

Los iones metálicos entran al medio ambiente a través de una variedad de fuentes, que incluyen procesos biogeoquímicos y antropogénicos; tales como, efluentes domésticos, urbanos, escurrimientos *[1-5]*.

El cadmio es un elemento muy tóxico, se cree que gran parte de la acción fisiológica del ión cadmio se debe a su similitud química con el zinc, ya que el ión cadmio puede reemplazarlo en algunas enzimas, alterando la estéreo-estructura de la enzima y dañando su actividad catalizadora, dando como resultado diversas enfermedades entre ellas el cáncer pulmonar, la tensión arterial, daños en el riñón, destrucción del tejido testicular, destrucción de glóbulos rojos y osteoporosis. La Norma Oficial Mexicana (NOM-127-SSA1-1994 Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano-límites permisibles de calidad y tratamientos a que se debe someterse el agua para su potabilización) establece un límite máximo permitido de cadmio para el uso y consumo del agua de 0.005 mgL^{-1}.

Las técnicas generales para el tratamiento de efluentes contaminados con iones metálicos se basan en procesos fisicoquímicos como, floculación, electrolisis, cristalización y la bioadsorción [*6-10]*. Entre los biosorbentes de iones metálicos, se encuentra la quitosana (Q), la cual es un copolímero derivado de la quitina, que puede ser obtenida principalmente de la cáscara de camarón y de caparazones de jaiba, es biodegradable, no tóxica e insoluble en agua. Este polímero es un eficiente captador de iones metálicos debido a la gran cantidad de grupos aminos que se encuentran en este polielectrolito, pero presenta propiedades de solubilidad a pH ácido, lo que eleva los costos de separación [*11]*.

La inserción de grupos sulfato, de manera parcial o total sobre los grupos OH de C-6, origina un polielectrólito menos soluble (sulfato de quitosana, SQ) lo que proporciona un intervalo de pH de insolubilidad adecuado y al mismo tiempo permite tener los grupos amino libres, de tal manera, que las propiedades de complejación siguen conservándose y además la introducción de los grupos sulfato da como resultado un mayor número de sitios activos para llevar a cabo el proceso de extracción sólido-líquido, facilitando su separación del sistema por decantación o filtración simple una vez terminado el proceso de adsorción [12].

En este trabajo se propone un mecanismo de adsorción de estos iones metálicos determinando el estado químico de la superficie de los grupos funcionales del SQ y la naturaleza del complejamiento del metal por medio de espectroscopia de infrarrojo por transformadas de Fourier (FTIR).

METODOLOGÍA

Para elucidar y proponer un modelo del mecanismo de adsorción del ión metálico Cd(II) por el sulfato de quitosana fue necesaria la recolección de una serie de datos basados en la adsorción de este ión por el SQ que permitieron establecer los sitios de adsorción en los que dichos cationes interactúan con el biopolímero y además conocer si estos sitios activos eran susceptibles a cambios en el pH.

Para tal fin, se preparó una disolución de cadmio a una concentración de 1000 mg/L, disolviendo nitrato de cadmio tetrahidratado [$Cd(NO_3)_2 \bullet 4H_2O$] (Fermont, Monterrey, Mexico) en agua desionizada; una vez disuelta la sal, el pH de la disolución fue ajustado al valor necesario (3.0, 4.0, 5.0, 6,0 y 7.0) empleando disoluciones de NH_4OH 0.1N y HNO_3 1N, el pH fue medido con un potenciómetro Conductronic pH120 (Conductronic, Puebla, México). Las disoluciones fueron almacenadas en frascos ámbar para protegerlas de la luz y refrigeradas a 4 °C . Antes de ser empleadas en los experimentos de adsorción fueron llevadas a temperatura ambiente y su pH determinado nuevamente, en caso de cambios en el pH, este fue reajustado con disoluciones de NH_4OH 0.1 N y HNO_3 0.1 N

Los experimentos fueron llevados a cabo en tubos para centrifuga de plástico de 15 mL (Corning Inc., NY, USA), colocando una masa de 0.300 g de SQ y adicionando 10 mL de la disolución del ión cadmio por un tiempo de contacto de 24 horas en un termo-baño de agitación Thermo Scientific Precision 2872 (ThermoScientific, Massachusetts, USA) a una temperatura de 25 °C y una agitación de 150 rpm. Posteriormente los tubos fueron centrifugados a 1380 rmp (Centrifuga K56A, Gerber Instruments, Suiza) para separar la fase sólida de la fase líquida. La fase sólida de SQ-Metal fue secada a una temperatura de 40 °C por 24 horas.

Obtención de los espectros de FTIR

Las muestras se prepararon mezclando una masa de 100 mg de SQ-metal con 150 mg de KBr (libre de humedad) en un mortero de ágata. Una vez realizado este paso, se introdujo la mezcla en un molde de acero inoxidable y se compactó hasta obtener una pastilla de aspecto cristalino, la cual se instaló posteriormente en un espectrómetro de FTIR (Spectrum 100 FTIR, Perkin Elmer, USA) para obtener su espectro en el intervalo de 450 a 4000 cm^{-1}. Adicionalmente se preparó una muestra de SQ que se utilizó como referencia.

RESULTADOS

En la Figura 1 se muestra el conjunto de espectros de las muestras SQ-Cd, en ella se puede observar que aparece una banda a 3600 cm^{-1} que se hace más notoria conforme aumenta el pH de las disoluciones y se debe a la banda de estiramiento de los grupos hidroxilos que no presentan puente de hidrógeno (grupos hidroxilo "*libres*") debido a la que los puentes de hidrógeno entre los OH disminuyen por la adsorción del metal por grupos OH. La señal a 3200 cm^{-1} correspondiente a la sal de la amina aumenta con el pH debido a que los grupos amino se desprotonan y el metal se puede unir a los electrones de la amina que se liberan. También se destaca que la banda en 800 cm^{-1} sufre modificaciones en la intensidad de la señal, apareciendo más pequeña, esta modificación aparece a todos los pH´s utilizados. Finalmente las señales presentes por debajo de los 800 cm^{-1} desaparecen a todos los pH´s estudiados.

En base a estos resultados fueron propuestos mecanismos de adsorción tomando en consideración los siguientes factores: a) el tamaño de los iones metálicos a adsorber impediría algunas formas de complejación por razones estéricas, por lo que se propone un complejo en el que intervienen dos moléculas del SQ (figura 2); b) es muy probable la formación de un complejo como el que se presenta en la figura 2 (A) entre el metal y los grupos sulfatos del SQ; c) la presencia de múltiples grupos con pares electrónicos que se liberan al aumentar el pH, hace factible la formación de estructuras como se muestra en la figura 2 (B) donde hay presencia de grupos OH. Las estructuras propuestas en la figura 2 (C), solo es posibles cuando los grupos amino no se encuentran protonados y corresponden con algunos de los mecanismos propuestos por otros investigadores *(13)*.

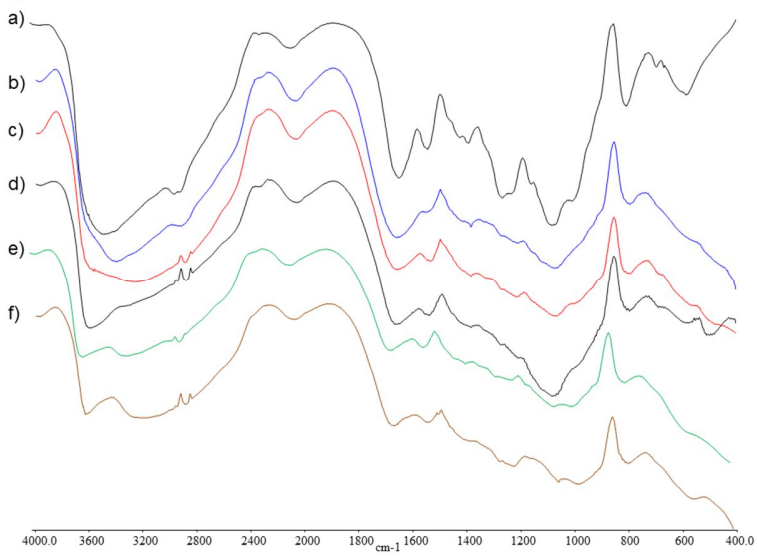


Figura 1. Análisis comparativo de los FTIR de SQ y SQ tratado con disoluciones de Cd(II) a diferentes pH.´s a) SQ libre de Cd(II), b) SQ –Cd(II) pH: 3, c) SQ –Cd(II) pH: 4, d) SQ –Cd(II) pH: 5, e) SQ –Cd(II) pH: 6, f) SQ –Cd(II) pH: 7.

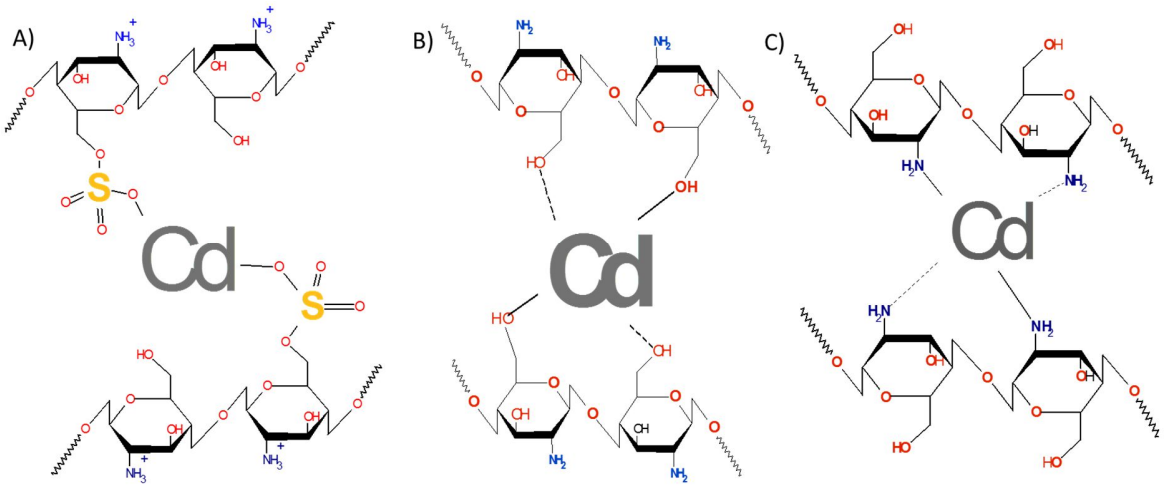


Figura 2. Mecanismos de adsorción propuestos para Cd(II): A) por intercambio iónico con el grupo sulfato, B) por complejación con el OH, C) por complejación con los grupos amino no protonados.

CONCLUSIONES

El SQ probó ser efectivo en la remoción del ión metálico en un amplio intervalo de pH´s.

En base a los resultados de FTIR, se concluye que los mecanismo de adsorción es a través del intercambio iónico con los grupos sulfato y por complejación con los grupos OH y NH_2. Dado que el tamaño del ion metálico favorece dichas interacciones. La complejación a través de los grupos amino es

afectada por el pH, tomando mayor importancia mientras más elevado sea el pH.
Aunque las estructuras propuestas están en concordancia con los FTIR´s, es necesario reconocer la necesidad de emplear técnicas adicionales que proporcionen más datos que permita establecer sin lugar a dudas el mecanismo o efectuar modificaciones en el mismo, por lo que el empleo de XPS y otras técnicas de espectrometría de rayos X como complementarias para confirmar el mecanismo propuesto.

REFERENCIAS

[1] Manahan E. Stanley. (2007). Introducción a la química ambiental. 1º Edición. Reverte. España

[2] Moreno Grau M. (2003).Toxicología Ambiental. Evaluación de riesgo para la salud humana. 1° Edición. McGraw-Hill. Madrid, España.

[3] BairdColin. (2001) Química ambiental. 1ª Edición en español, Reverté.España

[4] Valcárcel M., Gómez A. (1988) Técnicas analíticas de separación. 1ª Edición. Reverté, España.

[5] Restrepo I., Darío L., Galvis A., Rojas J., Sanabria I. (2007) Avances en investigación y desarrollo en agua y saneamiento. 1ª Edición. Universidad del Valle. Cali, Colombia.

[6] Chassary P., Vincent T., Guibal E. (2004). Metal anion sorption on chitosan and derivative materials: a strategy for polymer modification and optimum use. Reactive & Functional Polymers, 60, 137–149.

[7] Debbaudt A.L, Ferreiraa M.L., Gschaider M.E. (2004). Theoretical and experimental study of M2+ adsorption on biopolymers. III. Comparative kinetic pattern of Pb, Hg and Cd. Carbohydrate Polymers, 56, 321–332.

[8] Kurniawan T.A., Chan G.Y.S., Lo W., Babel S. (2006). Comparisons of low-cost adsorbents for treating wastewaters laden with heavy metals. Science of the Total Environment, 366, 409–426.

[9] Raize O., Argaman Y., Yannai S. (2004). Mechanisms of biosorption of different heavy metals by brown marine macroalgae. Biotechnology and Bioengineering, 87, 4, 451-458.

[10] Jiménez C. R., (2010). Adsorción de cobre y cromo en disoluciones acuosas con sulfato de quitosana. Tesis de licenciatura. Universidad de Guadalajara. p.27

[11] Guzmán M. M., (2010). Extracción de iones zinc y cadmio de disoluciones acuosas con sulfato de quitosana. Tesis de licenciatura. Universidad de Guadalajara. p.27

[12] Ríos D. N., Navarro R., Ávila-Rodríguez M., Mendizábal E. (2012) Coagulation-Flocculation of Colloidal Suspensions of Kaolinite, Bentonite, and Alumina by Chitosan Sulfate. Journal of Applied Polymer Science, Vol. 123, 2003-2010.

[13] Guibal E. (2004). Interactions of metal ions with chitosan-based sorbents: a review. Separation and Purification Technology 38, 43–74.

LAYERED DOUBLE HYDROXIDES (LDH) FOR THE IMMOBILIZATION BY METAL AFFINITY OF GENETIC ENGINEERED ENZYMES FOR THE DEVELOPMENT OF BIOSENSORS

(Hidróxidos dobles lamelares (HDL) para la inmovilización por afinidad a metales de enzimas modificadas genéticamente para el desarrollo de biosensores)

Gilberto Velázquez-Juárez[a*+], Gregorio Carbajal Arizaga[a].

[a] Universidad de Guadalajara. Departamento de Química. Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: gilvelazquez83@gmail.com

Área del Conocimiento: Biomateriales.

ABSTRACT
Searching for a simple and reliable scheme to immobilize enzymes is of great importance. The strong affinity link between a metal cation and a chelator such as nitrilotriacetic acid (NTA) or imidodiacetic acid (IDA) has been used to develop enzymatic biosensors, nevertheless these materials are registered or patented[1], becoming difficult its use for commercial purposes. Development of new materials for enzymatic affinity immobilization overcomes that impediment. Layered double hydroxides (LDHs), are a great option for making new materials[2], they can be expressed with the following general formula: $[M^{II}_{1-x}M^{III}_{x}(OH)_2]\times[A^{n-}_{x/n}\times mH_2O]$. Where, M^{II}_{1-x} are divalent cations (Mg^{2+}, Cu^{2+},Zn^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+}); M^{III}_{x} are trivalent cations (Al^{3+}, Cr^{3+}, Fe^{3+}), and A^{n-} is an interlayer anion (Cl^-, NO_3^-, CO_3^{2-}, SO_4^{2-}). In this work we have developed a new LDHs with Ni^{++}, Cu^{++} and Co^{++} atoms incrusted. We have chosen those metals because they're well known to coordinate molecules. LDHs were produce by alkaline precipitation and confirmed by spectroscopic technics (XRD and IR). After materials were obtained, we decided to prove if their were capable of immobilize proteins. In order to do that, we produced an engineered 6xhis tag cathecol dioxygenase[3] enzyme from *Arthrobacter sp.* Protein was obtained by synthetic biology methods and overexpressed at *E. coli* strain. After several purification steps (nickel affinity and ionic exchange), we confront our purified enzyme with aforementioned HDLs. We found that our materials exhibit strong immobilization for the protein of interest (visualized by SDS PAGE). Immoblization was able to resist the presence of competitors such salts (1M), detergents (1%) and imidazole (1000 mM). These results suggest that our materials could be use for development of enzymatic biosensors.

Keywords: HDL; immobilization; genetic engineering; biosensors.

POLY(ETHYLCIANOACRYLATE-CO-ETHYLENGLICOL) NANOPARTICLES SYNTHETIZED BY SEMICONTINUOUS HETEROGENEOUS POLYMERIZATION FOR RELEASING ZERANOL

(Nanoparticulas de poli (etilcianoacrilato-co-etilenglicol) (PECA-PEG) por síntesis de polimerización semicontinuaheterogenea para la liberación de Zeranol)

María de Jesús Palacios Sánchez[a*+], Eduardo Mendizábal Mijares[a] y Maite Renteria Urquiza[a]

[a]Universidad de Guadalajara , Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Departamento de Química

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: marita._palaciios@hotmail.com

Área del Conocimiento: Biomateriales.

ABSTRACT
At present obtaining drug delivery systems with high specificity and activity at the site of application, without toxic effects is of great importance which it seeks to achieve through various investigations, such as the use of biodegradable polymers. According to this criterion, recently some new drug delivery systems like liposomes, nanoparticles, and microparticles, among others have been proposed as drug carriers for drug delivery. This work focused on the synthesis of nanoparticles by semi heterogeneous polymerization of poly (ethyl cyanoacrylate-co-ethylenglicol) (PECA-PEG) to be used to release the drug Zeranol. Zeranol is a natural anabolic used as a growth promoter in livestock. To carry out the polymerization, PEG is added to an aqueous solution of HCl (pH = 1.5) and the surfactant is added (Tween 80). Ethyl cyanoacrylate is added semi-continuously (every 15 minutes for 3 hours) under continuous stirring. The nanoparticles are purified by dialysis. Once purified and dry the polymer is characterized. Nanoparticles are charged with Zeranol by immersed in a zeranol solution. The release kinetics are determined by introducing the nanoparticles in aqueous solution and the amount remaining in the solution is determined by UV-visible spectroscopy.

Keywords: Nanoparticles 1; PECA-PEG 2; Zeranol3; Drugrelease 4.

(Hace falta el Resumen y las palabras clave en español)

INTRODUCCIÓN

(Hace falta reemplazar los indicadores de cita estilo binomial "Autor, año" por el estilo numérico entre corchetes)

En la actualidad el empleo de sistemas de liberación de medicamentos con alta especificidad y actividad en el lugar de aplicación, sin efectos tóxicos (*Katime et al., 2004),* es un modelo ideal que se intenta alcanzar por medio de varias investigaciones, como los polímeros biodegradables.

Existen varios tipos de partículas poliméricas utilizadas en la administración de medicamentos. En función de su tamaño, se pueden clasificar en micro- y nanopartículas. Las micropartículas son partículas poliméricas esféricas con tamaños que oscilan desde 1 a 250 µm (idealmente con diámetros < 125 µm). Las nanopartículas son sistemas poliméricos submicrónicos (< 1 µm) (Rollot et al., 1986).

Se pueden manejar diversos procesos en la preparación de micro- y nanopartículas, entre los que se encuentran: la evaporación del disolvente, separación de la fase orgánica, polimerización interfacial, polimerización en emulsión ó microemulsión y secado por spray (*Ramos et al., 2001*).

Se han realizado investigaciones centradas en sus características fisicoquímicas, especialmente en disolventes orgánicos (Chu et al., 1995). Pero también relacionado con la química de polímeros anfifílicos, ahora existen micelas poliméricas solubles en agua, biocompatibles y biodegradables. Algunos de los usos de estos polímeros son la liberación controlada de fármacos (*Katime et al., 2004)*.

Se tiene que tomar en cuenta estas consideraciones farmacéuticas en el desarrollo de estos sistemas de liberación controlada: 1. Tipo de material, 2. Ruta de preparación, 3. Tamaño de las partículas, 4. Cantidad de fármaco incorporado, 5. Carga, 6. Fármaco liberado (in vitro e in vivo), 7. Estabilidad del fármaco, 8. Estabilidad del sistema de liberación, 9. Efecto del almacenamiento, 10. Propiedades de la superficie, 11. Presentación, 12. Antigenicidad, 13. Biofase y toxicidad del sistema de liberación y 14. Fármaco y biocinética del sistema de liberación.

METODOLOGÍA

Se desarrollo una microemulción, la cual consiste en fabricar una solución de agua y tensoactivó a la concentración deseada.

Se obtuvo un polímero de PECA-PEG, el cual se espero que su polimerización fuese por ataque nucleofílico como se puede observar en el mecanismo de reacción que se estimó para esta polimerización.

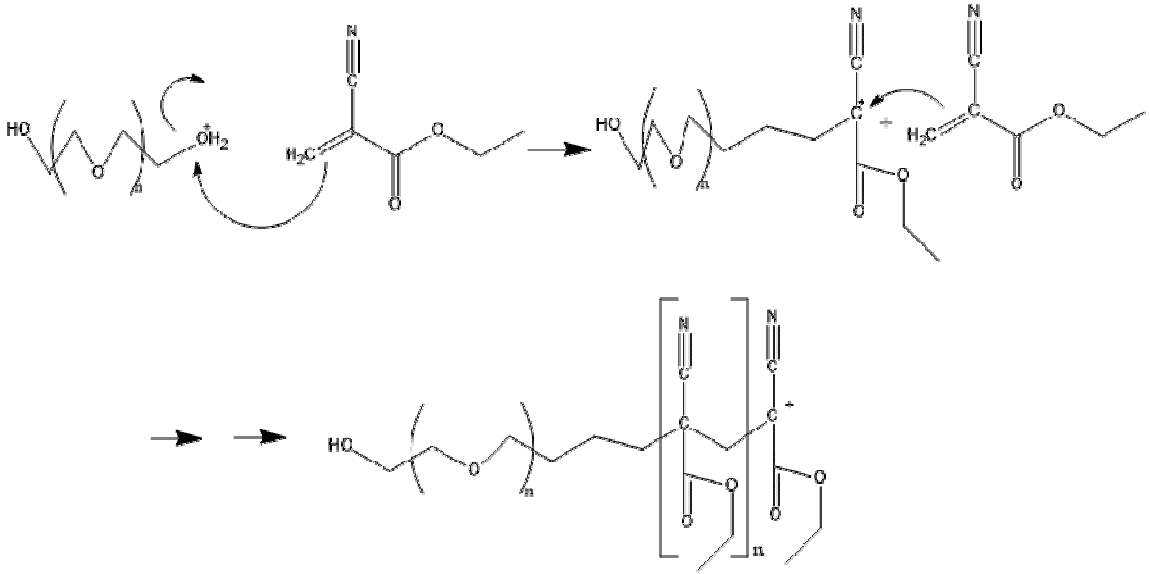


Figura 1. Mecanismo propuesto de

(Hace falta unificar la nomenclatura de los elementos auxiliares: Todos son Figuras inclusive los gráficos; por ello hay que asignarles numeración consecutiva. Finalmente, favor de escribir los pies de figura en renglones debajo de las figuras y no dentro de cuadros de texto)

Una vez quese tiene la solución de emulsión se anexo el PEG y se procedio agregar el monómero (ECA). La adición del ECA será en semi-continuo (cada 15 min. durante 3 horas). Se dejo en agitación durante 2 para lograr que todos los compuestos reaccionen y forme una solución heterogenea; como lo muestra en la figura 2.

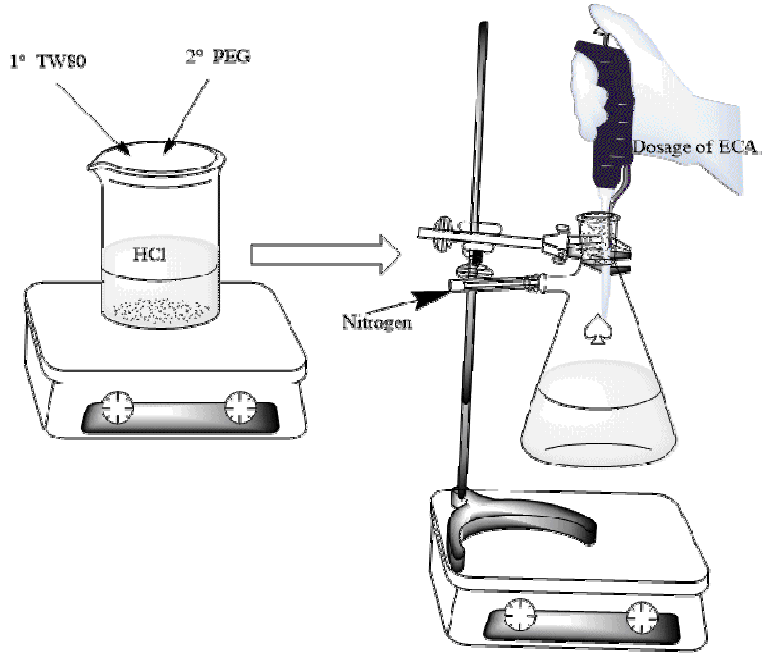


Figura 2. Metodología de la síntesis de PECA-PEG.

Después de formar el polímero, se agrego metanol y se paso a la centrifuga para precipitar. Une vez precipitado se puso a secar y se determino la conversión. Luego una parte del polímero se utilizo para realizar su caracterización: tamaño de particula mediante microscopía electrónica de transmición (TEM) y dispersion cuasielastica de luz (QLS); peso molecular mediante cromatografía de permeación en gel (GPC), composición química mediante espectroscopía de infrarojo (FTIR) y resonancia magnética nuclear (RMN), propiedades térmicas mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) y la otra parte se utilizo para cargar y liberar el fármaco (Zeranol).

Se introdujo el fármaco en el polímero por un método físico de adicción (*Katime et al., 2004)*. Se preparará una solución de agua-etanol, para la disolución del zeranol y el polímero, después se le coloco las cantidades necesarias de estos, y se dejo agitándose (Kwon et al., 1995) durante un determinado tiempo (12, 24, 36 ó 48hrs), posteriormente se le tomo lectura de IR para ver si efectivamente hubo una captación del fármaco.

Una vez cargadas las partículas se introducen en agua a un pH de alrededor de 7 y se determina su cinética de liberación. Para ello se toman muestras de la solución cada cierto tiempo y se determina el contenido de zeranol mediante espectroscopía de UV.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

A continuación se muestra una serie de gráficos los cuales explican y demuestran las caracterizaciones que se obtuvieron con el polímero que se desarrollo.

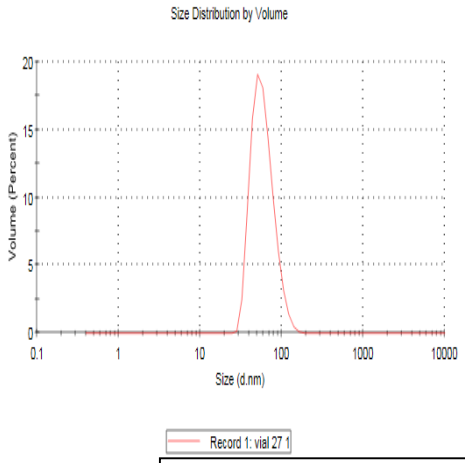


Grafico 1.-Tamaño de partícula en el QLS

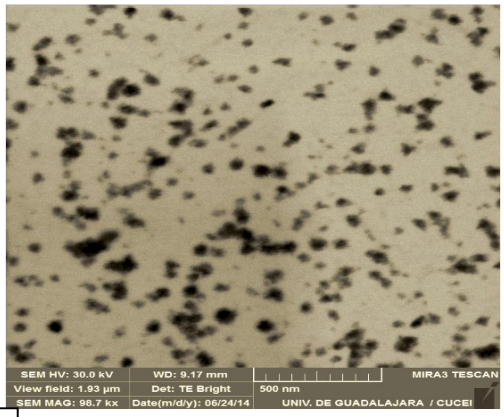


Figura 3.-Morfologia de partícula por SEM

En el grafico anterior podemos observar el tamaño de partícula el cual nos da alrededor de 60 nm, un tamaño muy pequeño el cual nos fusiono para que la cinética de liberación fuera más lenta. También vemos la morfología de la partícula por medio de SEM la cual nos da una idea del tamaño real de nuestro polímero. En esta imagen se puede ver que se aglomeraron las partículas por lo cual se necesito diluir la muestra para separar las partículas.

La comprobación de que era la que teníamos en nuestro polímero se demostró en base a IR, RAMAN y RMN, los cuales nos brindan muy buena información donde vemos los grupos funcionales que tenemos presentes en nuestro polímero y también podemos darnos una idea de cómo está la estructura molecular gracias a RMN.

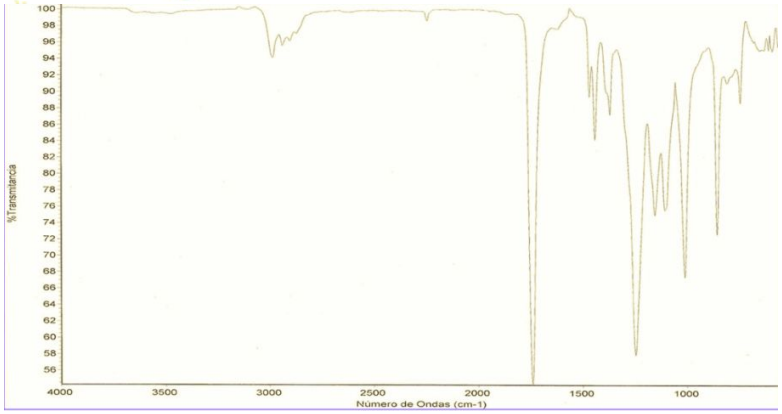


Grafico 2.- Nanopartículas de PECA-PEG en el FTIR

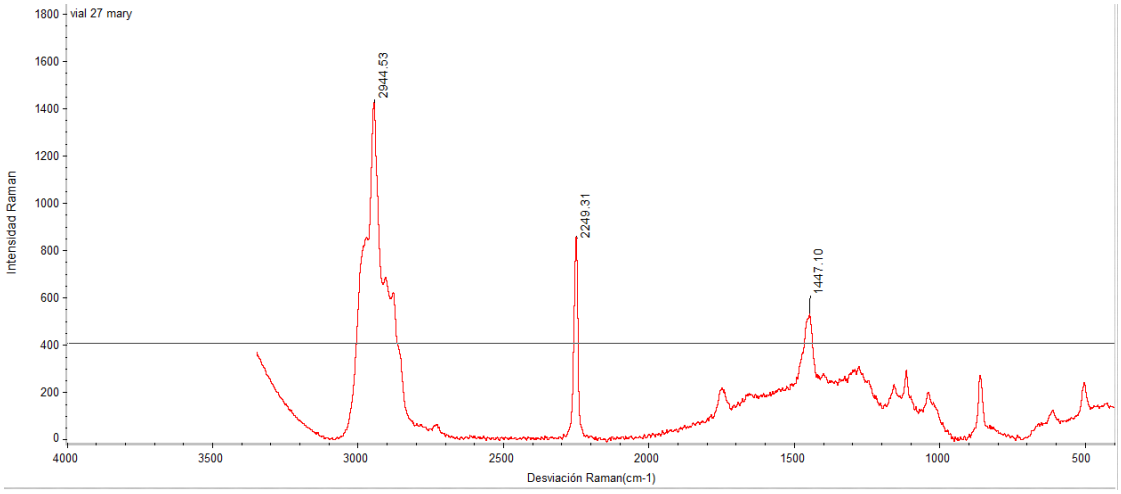


Grafico 3.- Espectro de PECA-PEG en RAMAN

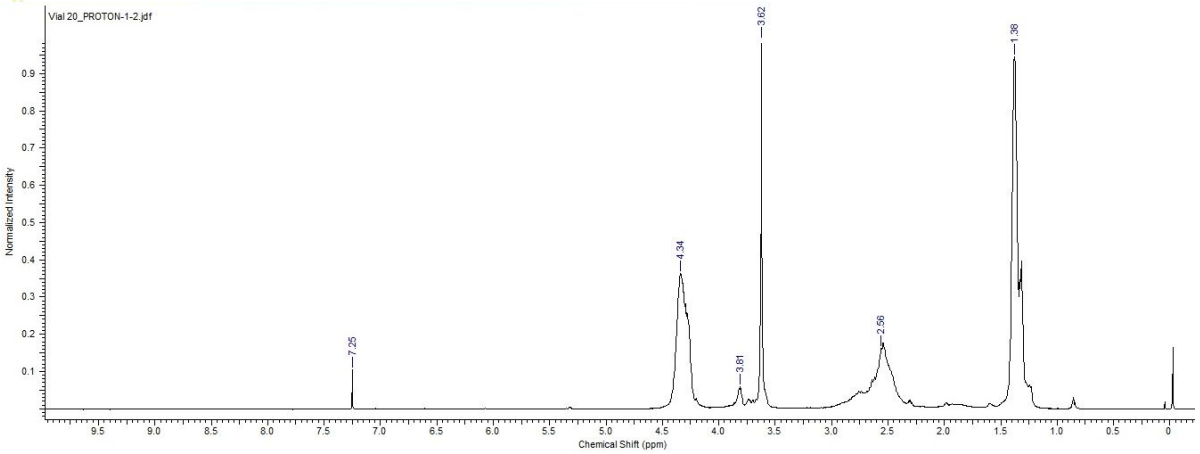


Grafico 4.-Espectro de las nanopartículas de PECA-PEG POR ^{1}H-

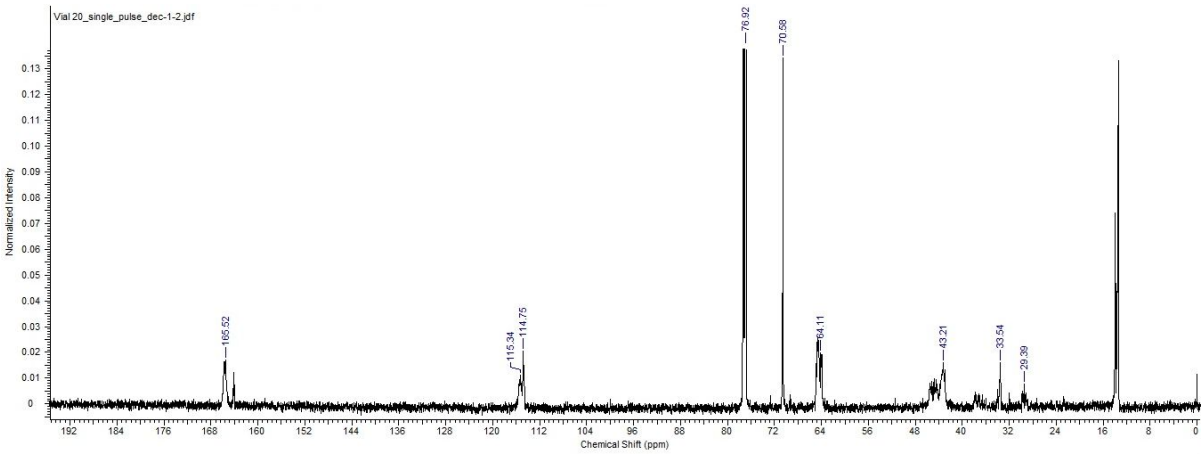


Grafico 5.- Espectro de las nanopartículas de PECA-PEG POR ^{13}C-

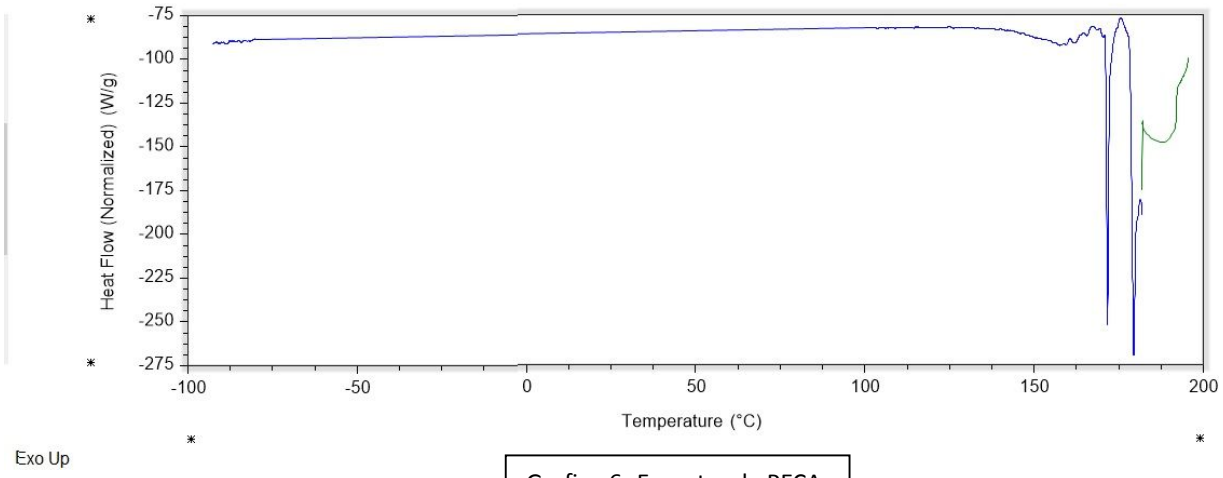


Grafico 6.-Espectro de PECA-PEG por DSC

Por último tenemos un grafico que nos dice las tgs de nuestros polímeros y afirmando que si se pudo obtener el polímero deseado.

Y por parte de la captación del fármaco el resultado que se obtuvo en la liberación fue la que se muestra a continuación en el siguiente grafico, donde podemos corroborar la que el Zeranol se libero lentamente.

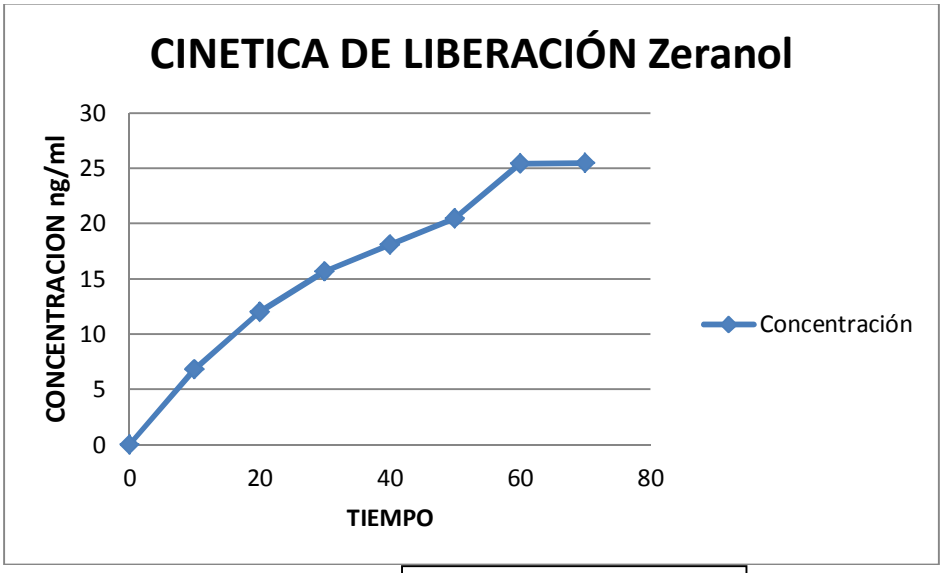


Grafico 6.-Cinetica de liberación de zeranol.

CONCLUSIONES

- Se logro sintetizar y caracterizar un vehículo bio-polimérico de poli (etilcianoacrilato-co-etilenglicol) (PECA-PEG), mediante polimerización semicontinua heterogénea, que permita la liberación controlada in vitro de Zeranol.
- Se llevo acabo síntetizar nanopartículas de PECA-PEG.
- Se Caracterizo las nanopartículas obtenidas [A) grupos funcionales presentes, por medio de ATR y RAMAN; B) tamaño promedio de partícula por medio de QLS y TEM; C) morfología, por medio de SEM; D) estructura molecular, por medio de RMN; F) análisis termoanalítico, por medio de DSC; G) peso molecular mediante GPC].
- Se llevo con gran éxito la captación del Zeranol en las nanopartículas PECA-PEG en una solución agua:etanol.
- Se obtuvieron excelentes resultados de las pruebas in vitro que evaluaron la liberación de Zeranol por medio de un perfil de disolución con un análisis en HPLC con detector de UV.
- Cabe mencionar que como conclusión final fue satisfactorio el desarrollo del vehículo polimérico para la liberación de Zeranol el cual se pudo obtener resultados, que no se habían presentado en las liberaciones controladas.

REFERENCIAS

- Bader, H., Ringsdorf, H., Schmidt, B., *Angew. Chem.*, 123/124 (1984) 457-485.
- *Bazile, D., Prud'homme, C., Bassoullet, M. T., Marlard, M., Spenlehauer, G. and Veillard, M. J. Pharmacol. Sci., 84, 493–498 (1995).*
- *Cardona, I., Iván y Sanclemente, L.*, Tesis Universidad Nacional sede Palmira. 1986.
- Chen, J. L., Cyr, G. N. en *Adhesive Biological Systems*, R. S., Manly (Ed), Academic Press, New York, London, 1970.
- Chu, B., Langmuir, 11 (1995) 414-421.
- Connor E, Kahl S, Elsasser T. July 21, 2002.
- *Donbrow,ed, M. Med- icine and Pharmacy,CRCPress, Boca Raton, Florida, 1992. 4. J. Kreuter, P. Buri and A. Gumma (eds.), Elsevier, Amsterdam, Nether- lands, 1985, p. 51.*
- Fumagalli, A. Verde, L. S. Moore C. P. and Fernández H. M. J. Anita. Sci. 1989. 67:3397-3409.
- Gámez AL. Tesis licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo 2006.
- González-Iñiguez José C., Víctor M. Ovando-Medina, Carlos F. Jasso-Gastinel, Dora A. González, Jorge E. Puig, Eduardo Mendizábal. Colloid Polymer Science Volume:292, Issue:6, Pages:1269-1275, DOI:10.1007/s00396-014-3177-0, 2014
- González Dora, Balleño Augusto, Katime Issa, Lopez Raul, Saade Hened, Mendizabal Eduardo, Memorias del XXXV encuentro nacional del AMIDIQ (2014).
- Gopinath R. Graduate Thesis. Doctor of Philosophy – PhD. University of British Columbia. 1983.
- *Illum, L., Jacobsen, L. O., Müller, R. H., Mak, R. and Davis, S. S. Biomaterials, 8, 113–117 (1987).*
- Katime I., Sáez V, Hernández E, y Sanz. *Revista Iberoamericana de Polímeros vol.5 (2004) 87-101.*
- Kavanov, A. V., Chekhonin, V. P., Alakhov, V. Y., Batrakova, E. V., Lebedev, A. S., Melik-Nubarov, N. S., Arzhakov, S. A., Levashov, A. V., Morozov, G. V., Severin, E. S., FEBS Lett., 258 (1989) 343-345.
- *Kreuter, J., Marcel Dekker, Inc.,NewYork, 1994, pp. 219–342.*
- Ledezma, R.; Treviño, M.E.; Elizalde L.E.; Perez-Carrillo, L.A.; Mendizábal, E.; Puig, J.E.; López, R.G. *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, 2007, *45*, 1463-1473.
- LIndsay D. G. Food Science Division, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Horseferry Road, London SWlP 2AD, England Great Britain. Fd Chem. Toxic.1985. Vol. 23, No. 8.
- Melik-Nubarov, N. S., Arzhakov, S. A., Levashov, A. V., Morozov, G. V., Severin, E. S., *FEBS Lett.*, 258 (1989) 343-345.
- Moore, G.R. and D.E. Kline. Society of Plastics Engineers. Inc. (1984)
- Odian, G., Wiley-Interscience, New York (1981)
- *Peracchia, M. T., Gref, R., Minamitake, Y., Domb, A. and Langer, R. Proc. Int. Symp. Contr. Rel. Bioact. Mat., 21, 513–514 (1994).*
- *Peracchia, M. T., Vauthier, C., Puisieux, F. and Couvreur, P. Journal of Biomedical Materials Research, Vol. 34, 317–326 (1997).*
- *Pérez, B., Sáez E, Martínez, GI., Gallardo, V and Arias, J.L., Ars Pharm 2010; 51.Suplemento 3: 171-176.*
- *Petrak, K., Rolland, A. (ed.), Marcel Dekker, Inc., New York, 1993, pp. 275–297.*
- Pratten, M. K., Lloyd, J. B., Hörpel, G., Ringsdorf, H., Makromol. Chem., 186 (1985) 725-733.

- Ramos Picos Diana, Gómez Carril Martha, Fernández Mena Dianelis., *Cubana Farm 2001; 35(2):126-35*.
- Rodriguez, F., McGraw Hill (1983).
- Rollot, J. M., Couvreur, P., Roblot-Treupel, L., Puisieux, F., J. Pharm. Sci, 75 (1986) 361-364.
- *Tröster, S. D., Wallis, K. H., Müller, R. H. and Kreuter, J., J. Control. Rel., 20, 247–260 (1992).*
- Yokohama, M., Inoue, S., Kataoka, K., Yui, N., Okano, T., *Makromol. Chem.*, 190 (1989) 2041-2054.
- Yokohama, M., Kwon, G., Okano, T., Sakurai, Y., Sato, T., Kataoka, K., Bioconj. Chem., 3 (1992) 295-301.
- Yokohama, M., Miyauchi, M., Yamada, N., Okano, T, Sakurai, Y., Kataoka, K., Inoue, S., *Cancer Res.*, 50 (1990) 1693-1700.
- Yokohama, M., Okano, T, Sakurai, Y., Ekimoto, H., Shibazaki, C., Kataoka, K., Cancer Res., 51 (1991) 3229-3236.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

PREFORMULATED EPOXY ADHESIVE STABLE TO ROOM TEMPERATURE AND UV CURABLE

(Adhesivo epoxico preformulado estable a temperatura ambiente y curable por UV)

Othon Sanchez R.[a]*, Victor Padilla F.[a], Tito E. Herrera L.[a+], Roberto Ibarra W.[b]

[a]Laboratorio Polytex, Departamento de Química, Universidad Autónoma de Guadalajara.
[b]Centro de Innovación en Manufactura Avanzada, CIMA de BC, S.A. de C.V.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: therrera@edu.uag.mx

Área del Conocimiento: Biomateriales.

ABSTRACT
Traditional epoxy adhesives are formulated immediately before use by mixing the two essential components; A bifunctional epoxy compound and a curing agent which is usually an amine, which may be difunctional or polyfunctional. Once the two components are mixed polymerization starts and takes few hours before the resin hardens completely. In the electronics industry preformulated epoxy adhesives are used for the die attach process and to prevent the curing reaction, they are transported and stored at -40 ° C which increases its cost. Before use, they are brought to room temperature and only has 48 hours to use. The material that is not used is discarded increasing the cost of the process. The objective of this work is tray a solution to this problem by functionalization the end groups of the epoxy component by vinyl groups so that it can polymerize without traditional curing agent, but by a radical polymerization initiated by UV light. This paper presents a methodology for functionalization of an epoxy compound, the characterization of the compound by FTIR spectroscopy and functionalized epoxy adhesive UV curable performance.

Palabras Clave: Adhesivos epóxicos, Polimerización iniciada por UV, Iniciadores UV, pegado de microcircuitos.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

GENERATION OF AN AMPEROMETRIC BIOSENSOR FOR TYPE 6X-HISTAG-DEHYDROGENAS ENZYMES IMMOBILIZED BY MODIFIED GOLD ELECTRODE AFFINITY

(Generación de un biosensor amperométrico para enzimas tipo 6x-histag-deshidrogenasas inmovilizadas por afinidad en electrodo modificado de oro)

Luis Octavio Ponce de León García [a]*, Erika Roxana Larios Duran [a], Gilberto Velázquez Juárez [b].

[a] Departamento de Ingeniería Química/CUCEI-Universidad de Guadalajara, Guadalajara Jal. México,
[b] Departamento de Química/CUCEI-Universidad de Guadalajara, Guadalajara Jal. México.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: lopg_92@hotmail.com

Área del Conocimiento: Biomateriales.

ABSTRACT
An electrochemical biosensor is a device that responds to a signal or stimulus of a determined specie to analyze, through a specific change in the potential or proportional electric current to the concentration of the component in its environment, usually is used as identifier and sensitive internal selector a known biochemical or biological element (enzymes, antibodies, nucleic acids, cells, fabrics, microorganisms). For the design of biosensors with enzymes, the immobilization of the enzyme can be effected in several ways: entrapment, adsorption, covalent bonding, crosslinking, and affinity. Affinity has two advantages: (1) to preserve the directionality of the active site of the enzyme to its optimum catalysis and (2) to prevent protein denaturation, as their conditions of immobilization are not extreme. To perform affinity enzymatic immobilization is required the presence of groups coordinating with Cu or Ni. This paper is showing the development of an electrochemical biosensor based in a modification performed by genetic engineering and heterologous expression of enzymes in optimized vectors for the inclusion of a 6 histidine tag. Once achieved the biological modification of the enzyme, a suitable holder containing Cu in which the protein will be coordinate, is needed. With a modified gold electrode, and embedding Cu in the entire wall in contact with a 100 mM $CuSO_4$ dissolved in a 100 mM NaCl solution, for a final concentration of 100mM, the enzyme will contact with the electrode producing affinity binding, using dehydrogenases: a family of enzymes catalyzing the oxidation or reduction of a substrate by adding or subtracting two hydrogen atoms (dehydrogenation) using a pair of coenzymes as electron and proton donors. Using the technique of cyclic voltammetry it was determined that the gold electrode modified responded when added and increased the concentration of phosphonates, important compounds in the agriculture.

Keywords: Biosensors; Modified enzymes; Affinity; Dehydrogenases

RESUMEN
Un biosensor electroquímico, es un dispositivo que responde a una señal o estímulo de una especie determinada a analizar. La respuesta se da mediante un cambio específico en el potencial o en la corriente eléctrica, la cual es proporcional a la concentración del componente en el medio. Generalmente se usa como identificador y selector interno sensible un elemento bioquímico o biológico conocido, típicamente enzimas, anticuerpos, ácidos nucleicos, células, tejidos o microorganismos. Para

el caso de los biosensores con enzimas, un paso crucial en el diseño es la inmovilización de la misma, la cual se puede llevar a cabo mediante varias formas. Los métodos de inmovilización más comunes son: atrapamiento, adsorción, unión covalente, entrecruzamiento y afinidad. Esta última presenta dos ventajas: (1) Permite conservar la direccionalidad del sitio activo de la enzima para que su catálisis sea óptima y (2) Evita la desnaturalización de la proteína ya que sus condiciones de inmovilización no son extremas. Para realizar la inmovilización enzimática por afinidad se requiere la presencia en la enzima de grupos necesarios para la coordinación con los metales Cu o Ni. En este trabajo se presenta el desarrollo de un biosensor electroquímico basado en una modificación que es realizada mediante ingeniería genética y expresión heteróloga de enzimas en vectores optimizados para la inclusión de una etiqueta de 6 histidinas. Una vez lograda la modificación biológica de la enzima, es necesario un soporte adecuado que posee el Cu en el cual se coordinará la proteína. Para ello se empleó un electrodo de oro modificado, depositando electroquímicamente Cu en toda la pared que está en contacto con una solución de $CuSO_4$ disuelto en 100 mM de NaCl. Posteriormente la enzima se puso en contacto con el electrodo para producir el enlazamiento generado por afinidad. En este trabajo se utilizaron las deshidrogenasas que son una familia de enzimas que canalizan la oxidación o reducción de un sustrato por sustracción o adición de dos átomos de hidrógeno (deshidrogenación), empleando un par de coenzimas que actúan como donadores de electrones y protones. Usando la técnica de voltamperometria cíclica se determinó que el electrodo de oro modificado responde cuando se incrementa la concentración de los fosfonatos, componentes importantes para la agricultura.

Palabras Clave: Biosensores; Enzimas modificadas; Afinidad; Deshidrogenasas

INTRODUCCIÓN

Un biosensor electroquímico, en general, es un dispositivo químico que responde hacia una señal o un estímulo de una especie determinada a analizar dado un cambio especifico en el potencial o en la corriente eléctrica proporcional a la concentración del componente en su medio, usando como identificador y selector interno sensible a un elemento bioquímico o biológico conocido (enzimas, anticuerpos, ácidos nucleicos, células, tejidos, microorganismos). [1]

Una de las principales características del material biológico empleado para la fabricación de biosensores es su alta selectividad, permitiendo diferencial en algunos casos, isómeros de una misma molécula. Esta particularidad hace que estos componentes sean de gran interés en su aplicación como receptores en la fabricación de sensores.

Los biosensores, sobre todo los electroquímicos, son uno de los campos que más ha avanzado en cuanto a investigación en los últimos años. [2]

La inmovilización de enzimas puede realizarse mediante diversas estrategias, como el atrapamiento, adsorción, unión covalente, entrecruzamiento y afinidad. Cada una de estas opciones presenta ventajas y desventajas para la fijación enzimática; sin embargo, el método de inmovilización por afinidad posee dos atributos excepcionales: permite conservar la direccionalidad del sitio activo de la enzima (en una orientación adecuada para su óptima catálisis) y evita la desnaturalización de la proteína (puesto que no requisita de condiciones extremas para la inmovilización). [3]

METODOLOGÍA

La enzima (fosfonato deshidrogenasa) fue genéticamente modificada mediante herramientas de biología molecular (clonación y ligación en un vector pCOLD) para posteriormente ser sobre expresada en una cepa no patogénica de E. coli.

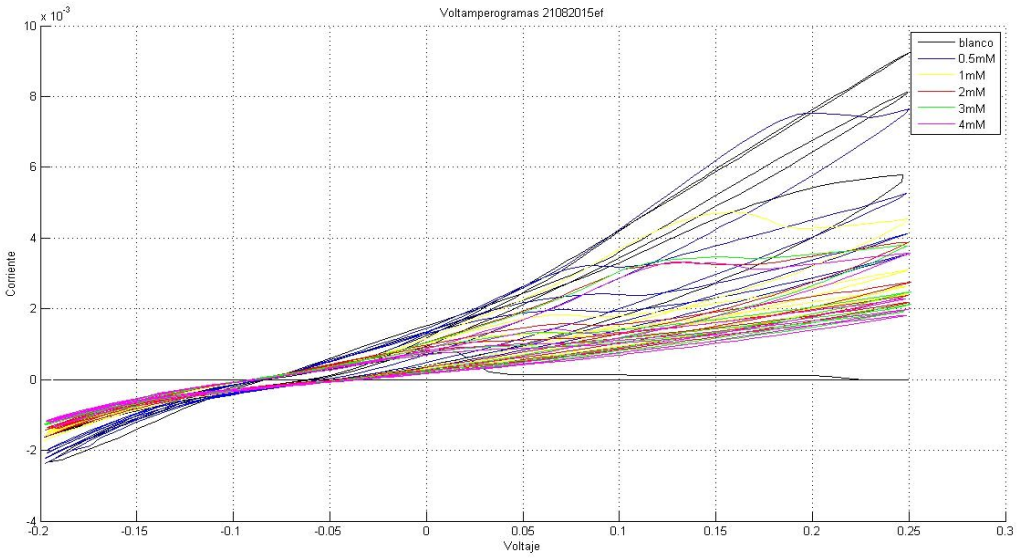
Para la preparación de los electrodos primero se prepara una solución 100mM de NaCl en la que se disolverá $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$ hasta una concentración final de 100mM y el electrodo de oro se sumerge en la solución y con ayuda de un potenciostato se somete a una diferencia de potencial de -0.3 volts por 5 minutos para incrustar cobre en toda la pared del electrodo.

Una vez incrustado el cobre se deja en contacto con la enzima por otros 5 minutos para que se lleve a cabo la inmovilización por afinidad en el electrodo; el electrodo se lava en solución de PBS 1X y se procede a construir una celda de 3 electrodos.

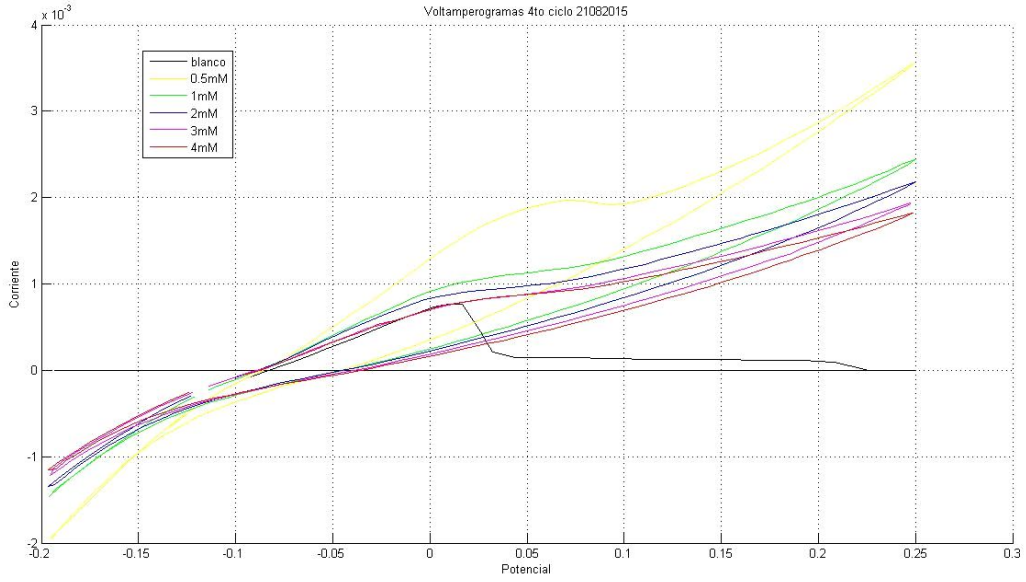
Como electrodo de trabajo se empleara el electrodo de oro modificado con cobre y la enzima, como electrodo de referencia se usará uno de calomel saturado, y finalmente, como contra electrodo se emplea un electrodo de platino.

La solución en la que se determinará el funcionamiento del electrodo es una solución de PBS 1X aproximadamente 25 ml, 250 micro litros de NAD+ 50mM, 100microlitros de PMS 50mM este será nuestro blanco, se procede a realizar voltamperometria cíclica a una velocidad de 50mV/s por 3 ciclos en un rango de -0.2 a 0.25 volts vs. Electrodo de referencia y finalmente se procede a adicionar diferentes concentraciones de Phi desde 0.5mM hasta 4mM para obtener los voltamperogramas correspondientes.

RESULTADOS



En la anterior imagen se pueden apreciar los voltamperogramas cíclicos tanto sin phi como con diferentes concentraciones del mismo desde 0.5mM hasta 4mM y como se nota un decremento en la corriente según se incrementa la concentración.



Tomando únicamente el cuarto ciclo del voltamperograma se puede observar de una manera menos saturada el comportamiento de nuestro biosensor modificado y además como después de someterse a la corriente por cuarta vez, sigue dando una respuesta en el pico de oxidación, decreciendo conforme la

concentración aumenta al igual que en la imagen posterior, el blanco está en la posición más baja del voltamperograma, comprobando que no hay respuesta de ninguna especie.

CONCLUSIONES

Se logro generar el electrodo modificado de oro incrustando Cu en la pared del mismo para que las moléculas se pudieran coordinar con nuestra enzima fosfito deshidrogenasa. Los voltamperogramas que hemos obtenido han lanzado resultados favorables pero creemos que se pueden obtener algunos aun mejores, actualmente trabajamos en diferentes estrategias para la caracterización del electrodo, determinar su durabilidad, su linealidad, su reusabilidad y su rango de trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Dra. Erika Roxana Larios Duran (CUCEI-Universidad de Guadalajara) e Ing. Omar Alejandro González Meza (CUCEI-Universidad de Guadalajara).

REFERENCIAS

[1] Baeza, Alejandro. (2010) Sensores y Biosensores Electroquímicos, Departamento de Química Analítica, UNAM.

[2] Gonzalo Ruiz, Javier (2006) Universidad Autónoma de Barcelona.

[3] Ayako Koto, Saki Taniya, Hiroaki Sakamoto, Takenori Satomura, Haruhiko Sakuraba, Toshihisa Ohshima and Shin-ichiro Suye. “Efficient Direct Electron Transfer for a Highly Oriented PQQ-GDH Immobilized Electrode for Bioanode”

[4] Rosa Ma. Claramunt Vallespí, Ma. de los Ángeles Farrán Morales, Concepción López García, Marta Pérez Torralba, Dolores Santa María Gutiérrez. Química Bioorgánica y Productos Naturales, Universidad Nacional de Educación a Distancia, Madrid.

EGGSHELLS AND MEMBRANES FOR REMOVAL OF Cr (VI) FROM AQUEOUS SOLUTIONS

(Cascarones de huevo y sus membranas para remoción de Cr (VI) de soluciones acuosas)

Jessica Badillo-Camacho[a]*, Sergio Gómez-Salazar[b+]

[a] Departamento de Química, Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías
[b] Departamento de Ingeniería Química, Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: sergio.gomez@cucei.udg.mx

Área del Conocimiento: Biomateriales.

ABSTRACT
The use of waste materials for the removal of metal ions is important from an environmental point of view. The eggshells are mainly calcite ($CaCO_3$) and membranes are composed primarily of proteins such as collagen. The objective of this work was to identify the material that has the highest adsorption of hexavalent chromium in aqueous solution, using as bioadsorbent the eggshells of birds such as chicken, ostrich, quail and duck and their membranes, considering the effect of pH on the dissolution of the shells. The biomaterials was washed, dried and sieved to an average diameter 1mm. The effect of pH was determinated using solutions of strong and weak acids. Hexavalent Cr determination was performed by a diphenylcarbazide method using a spectrophotometer. The use of shells for adsorption are favored to pH <3. The kinetic study shows that the membranes are greater capacity of adsorption of chromium (VI) from the solution at pH 5 to 25 ° C.

Keywords: Adsorption; Eggshell; Eggshell membranes; Hexavalent chromium; Bioadsorbent.

RESUMEN
El empleo de materiales de desecho para la eliminación de iones metálicos es importante desde el punto de vista ambiental. Las cáscaras de huevo son principalmente de calcita ($CaCO_3$) y las membranas se componen principalmente de proteínas como el colágeno . El objetivo de este trabajo fue identificar el material que tiene la mayor adsorción de cromo hexavalente en solución acuosa , utilizando como bioadsorbente las cáscaras de huevo de aves como el pollo , avestruz , codorniz y pato y sus membranas, teniendo en cuenta el efecto del pH en la disolución de los cascarones de huevo. Los biomateriales a emplear se lavan, se secan y se tamizan a través de una malla de 1 mm de diámetro. El efecto del pH se determinó utilizando soluciones de ácidos fuertes y débiles. El Cr hexavalente se determinó usando el método de la difenilcarbazida empleando un espectrofotómetro . El uso de cascarones como adsorbentes se favorece a pH > 3. El estudio cinético muestra que las membranas presentan una mayor capacidad de adsorción de cromo (VI) a partir de la solución a un pH de 5 a 25 ° C.

Palabras Clave: Adsorción; Cascarones de huevo; Membranas de Cascarones de huevo; Cromo Hexavalente; Bioadsorbente.

INTRODUCCIÓN

El rápido crecimiento industrial y la urbanización de los últimos años producen cantidades significativas de aguas residuales que contienen contaminantes tóxicos como metales pesados[1]. Por lo tanto, estos metales pesados deben ser removidos para evitar la toxicidad y el desequilibrio de los ecosistemas naturales[2]. Uno de los contaminantes primarios es el Cr que está presente en aguas superficiales y subterráneas, y que puede provenir de actividades como la galvanoplastia, limpieza de metales, el procesamiento de cuero y las descargas mineras [1]. Estudios epidemiológicos han demostrado que el Cr es causante de cáncer nasal y de pulmones [3], por lo que de acuerdo con la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARS) por sus siglas en inglés, el Cr (VI) ha sido catalogado como un elemento cancerígeno para el ser humano[4]. El Cr (VI) puede ser reducido intracelularmente por reductores biológicos como el Glutation y la glutatión reductasa. La actividad carcinogénica de los intermediarios de Cr (VI) está relacionado con su capacidad para producir daños en el DNA a través de aductos DNA-Cr o radicales libres[3].

La preocupación ambiental, ha sido un área primaria y de empuje para estudio en la mayoría de los campos de investigación científica y tecnológica[5]. La aplicación de materiales naturales de desecho como bioadsorbentes para la eliminación de metales pesados de efluentes líquidos, está adquiriendo cada vez mayor relevancia en el área medioambiental. La bioadsorción es considerada un método eficaz y de bajo costo comparada con técnicas convencionales[6] y su empleo para este propósito es importante debido a que tienen la propiedad de biodegradabilidad aunque pueden causar peligro ambiental cuando se depositan en grandes cantidades[7]. El estudio de la estructura de la cáscara de huevo de gallina, como una clase de materiales porosos naturales ha sido investigada en los últimos años, ya que han sido utilizadas, para remoción de metales pesados y compuestos orgánicos como colorantes y fenoles además de otras aplicaciones en la industria biomédica, síntesis de nanomateriales, catálisis y síntesis orgánica[8]. Pero además de los cascarones de huevo, las membranas también han sido utilizadas por considerarse un biomaterial único debido a sus extraordinarias propiedades adsorbentes.[9]

Particularmente en México, de acuerdo con el Compendio de Indicadores Económicos del Sector Avícola (2014), México fué uno de los principales países consumidores de huevo en 2012, con 20.8 Kg/persona y en 2013 el estado de Jalisco, fué uno de los principales productores de huevo de gallina seguido por Puebla y Sonora con 55, 15 y 8% respectivamente, de la producción Nacional, por lo que en 2013 se alcanzó una producción de 2 509,350 Ton de huevo.[10]. Debido a lo anterior, se considera que una gestión adecuada de estos materiales generados, es gran de relevancia en el medio ambiente actual, por lo que en este trabajo se aplicaron los casarones y membranas para la remoción de Cr (VI) de soluciones acuosas.

METODOLOGÍA

Se obtuvieron10 muestras de bioadsorbentes diferentes provenientes de cascarones de huevo blanco, rojo de gallina, de pato, de codorniz, de avestruz y sus membranas. Los cascarones de huevo a utilizar se sometieron a tratamientos físicos de lavado, secado, triturado y tamizado siguiendo la metodología propuesta por Ahmad M. et al.[11]. Por otra parte las membranas fueron obtenidas después del lavado de los cascarones, y una vez separadas del cascarón, se lavaron con agua desionizada y se secaron a 40°C durante tres horas. Transcurrido el tiempo se pulverizaron y tamizaron empleando sólo las muestras de tamaño de 650- 1000 micras[9]. La solución de Cr (VI), fue obtenida a partir de la sal

$K_2Cr_2O_7$ con una concentración de 100 ppm para obtener las concentraciones requeridas para los experimentos. El estudio del proceso de bioadsorción se realizó en dos etapas:

1. Efecto del pH:

Los biomateriales se pusieron en contacto con soluciones de pH 1,3,5,7,9. Del mismo modo los cascarones de las diferentes aves se pusieron en contacto con soluciones de ácidos fuertes y débiles, para verificar el efecto de disolución de los cascarones para lo cual se emplearon soluciones de HCl 0.1M,CH_3CO_2H 0.1M y H_3BO_3 0.1 M, y se mantuvieron a una temperatura controlada (25°C) en un termoagitador Thermo Scientific. Una vez transcurrido el tiempo se determinó la solubilidad del cascarón por pérdida de peso.

2. Cinética de adsorción: sirvió para evaluar el cambio de concentración de los iones de Cr (VI) a través del tiempo, una vez que estuvieron en contacto las membranas y los cascarones con las soluciones de Cr hexavalente. Para ello se pesó 0.5 g del material y se puso en contacto con 20 ml de solución de Cr (VI) de 10 ppm.

RESULTADOS Y DISCUSION

En la Figura1 se observa que los cascarones de las cinco especies de aves empleados presentan un porcentaje de disolución de más del 50% en peso en soluciones de pH<3, mientras que a pH´s superiores el porcentaje de disolución se mantiene constante y menor del 2 %, por lo que este material sólo podría emplearse para la remoción de Cr (VI) en soluciones con pH >3. Por otra parte, los porcentajes de disolución encontrados cuando se emplean las soluciones ácidos débiles (CH_3CO_2H y H_3BO_3) fueron 45% y 2% respectivamente, lo que nos indica para el caso del ácido acético que aunque sea un ácido débil el efecto de pH sobre la disolución de los cascarones se presenta a presenta a pH menor de 3. El estudio de la cinética de adsorción se muestra en la Figura 2, en la cuál se observan dos líneas que corresponden a la adsorción de Cr empleando sólo uno de los cascarones (el de pato en azul) y una de las membranas (la de avestruz en negro), ya que fueron éstos, los que mostraron la mayor captación respecto a los demás materiales del grupo (Figura 3). Con ello se observa que la mayor velocidad de adsorción del Cr (VI), se presenta durante los primeros 10 minutos del proceso, aunque posteriormente se observa que la variación de la concentración respecto del tiempo se mantiene sin cambios significativos.

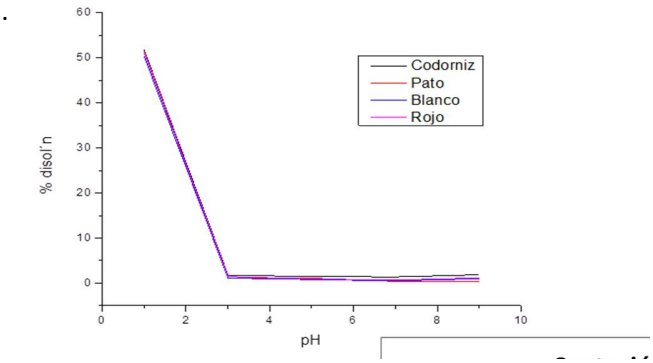


Figura 1. Porcentaje de disolución de los diferentes cascarones de huevo

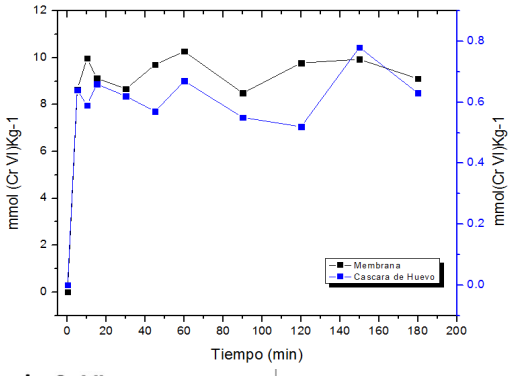


Figura 2. Captación de Cr VI de cada grupo de biomateriales

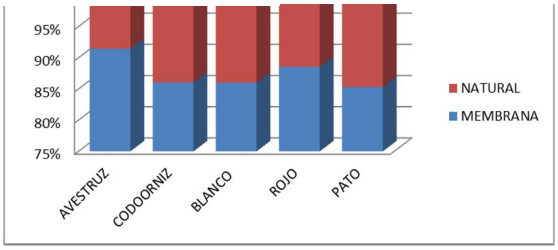


Figura 3. Captación de Cr VI de cada grupo de biomateriales

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos podemos concluir que:

1. A pH mayores a 3 es posible trabajar con la remoción de Cr empleando cascarones de huevo de las especies analizadas ya que aunque existe disolución de las muestras los porcentajes son menores del 2%
2. Que las membranas presentaron porcentajes de captación mayores que los cascarones (hasta cien veces más)
3. La membrana de avestruz pudo remover casi el doble de Cr (VI) que las otras membranas.
4. Que la captación máxima se observa dentro de los primeros 10 minutos en el caso de la membrana mientras que en el cascarón de pato fue hasta los 160 min.

AGRADECIMIENTOS

A Conacyt por el apoyo otorgado para la realización de este proyecto.

REFERENCIAS

[1] F. Fei, L. Lu, S. Yang, Y. Zhao, L. B. Sun, and S. G. Wang, "Individual and competitive adsorption of Cr(VI) and phosphate onto synthetic Fe-Al hydroxides," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 423, pp. 42–49, 2013.

[2] J. V. Flores-Cano, R. Leyva-Ramos, J. Mendoza-Barron, R. M. Guerrero-Coronado, A. Aragón-Piña, and G. J. Labrada-Delgado, "Sorption mechanism of Cd(II) from water solution onto chicken eggshell," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 276, pp. 682–690, 2013.

[3] F.-Y. Wua, W.-Y. Wua, H.-W. Kuoa, C.-S. Liub, R.-Y. Wangc, and Jim-Shoung Laia, "Effect of genotoxic exposure to chromium among electroplating workers in Taiwan," *Sci. Total Environ.*, vol. 279, pp. 21–28, 2001.

[4] B. Pesch, B. Kendzia, K. Hauptmann, R. Van Gelder, R. Stamm, J.-U. Hahn, W. Zschiesche, T. Behrens, T. Weiss, J. Siemiatycki, J. Lavoué, K.-H. Jöckel, and T. Brüning, "Airborne exposure to inhalable hexavalent chromium in welders and other occupations: Estimates from the German MEGA database," *Int. J. Hyg. Environ. Health*, vol. 218, no. 5, pp. 500–506, 2015.

[5] S. M. Shaheen, F. I. Eissa, K. M. Ghanem, H. M. Gamal El-Din, and F. S. Al Anany, "Heavy metals removal from aqueous solutions and wastewaters by using various byproducts," *J. Environ. Manage.*, vol. 128, pp. 514–521, 2013.

[6] K. Chojnacka, "Biosorption of Cr(III) ions by eggshells," *J. Hazard. Mater.*, vol. 121, no. February, pp. 167–173, 2005.

[7] L. Giraldo and J. C. Moreno-Piraján, "Study of adsorption of phenol on activated carbons obtained from eggshells," *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, vol. 106, pp. 41–47, 2014.

[8] P. S. Guru and S. Dash, "Sorption on eggshell waste - A review on ultrastructure, biomineralization and other applications," *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 209, pp. 49–67, 2014.

[9] M. Baláž, "Eggshell membrane biomaterial as a platform for applications in materials science," *Acta Biomater.*, vol. 10, pp. 3827–3843, 2014.

[10] U. N. de Avicultores, "No Title," *Compendio de Indicadores Económicos del Sector Avícola*, 2014. [Online]. Available: http://www.una.org.mx/index.php/component/content/article/2-uncategorised/19 .

[11] M. Ahmad, A. R. a Usman, S. S. Lee, S. C. Kim, J. H. Joo, J. E. Yang, and Y. S. Ok, "Eggshell and coral wastes as low cost sorbents for the removal of pb 2+, cd 2+ and cu 2+ from aqueous solutions," *J. Ind. Eng. Chem.*, vol. 18, no. 1, pp. 198–204, 2012.

PRODUCTION OF BIOPOLYESTERS FROM SUGAR BY FERMENTATION WITH *Burkholderia sacchari*

(Producción de biopoliésteres a partir de azúcar por fermentación con *Burkholderia sacchari*)

Erika Vianey Torres Tello[a*], Jorge Ramón Robledo Ortíz[b], Yolanda González García[b+], Eduardo Mendizábal Mijares[a].

[a] Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Guadalajara, Blvd. Gral. Marcelino García Barragán #1451, Guadalajara, Jalisco, 44430, México.
[b] Departamento de Madera, Celulosa y Papel, Universidad de Guadalajara, Carretera Guadalajara-Nogales km 15.5, Las Agujas, Zapopan, Jalisco, 45510, México.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: yolacea@yahoo.com

Área del Conocimiento: Biomateriales.

ABSTRACT
Biopolymers, in particular polyhydroxyalcanoates (PHAs) are being widely studied as biodegradable materials that can substitute the synthetic polymers. The main advantage of these materials is their biodegradable properties and the fact that can be produced from renewable carbon sources such as glucose, sucrose, xylose, etc. PHAs are synthesized by bacteria under unbalanced growth conditions such as the presence of excess carbon source and limitation of at least one essential nutrient such as phosphorous, nitrogen, sulphur, magnesium or oxygen. Bacteria accumulate the polymeric chains intracellularly as carbon and energy storage materials. The simplest and most widely produced polyester of the PHAs family is polyhydroxybutyrate (PHB), which presents similar properties to polypropylene and is completely biodegradable. The main disadvantage of this material is its high production cost compared with that of the petrochemical-based plastics. For this reason is very important to use a low cost carbon source for the fermentation process. In this work the capacity of *B. sacchari* to produce PHB by fermentation using sucrose and corn syrup as low cost carbon sources was studied. A 7 L bioreactor was used and the following conditions were maintained during the culture: temperature, 32°C; agitation, 200 rpm; and pH, 7. In order to stimulate PHB synthesis, nitrogen limitation was applied. The best results was obtained when sucrose was used as the carbon source obtaining a final biomass concentration of 17.5 g/L with PHB accumulation of 23%, while, when corn syrup was used the final biomass was 8.4 g/L with PHB accumulation of 5.8%. Finally the molecular weight of PHB produced from sucrose was $6X10^5$ Da. It can be concluded that sucrose was a better substrate than syrup for PHB accumulation and the biopolymer properties were similar to those presented by the commercial PHB.

Keywords: *Burkholderia sacchari;* biopolymers; polyhydroxyalkanoates; polyhydroxybutyrate.

RESUMEN
Los biopolímeros, en particular los polihidroxialcanoatos (PHAs) están siendo ampliamente estudiados como materiales biodegradables que puedan sustituir a los polímeros sintéticos. La principal ventaja de estos materiales son sus propiedades biodegradables y el hecho de que pueden producirse a partir de fuentes de carbono renovables como glucosa, sacarosa, xilosa, etc. Los PHAs son sintetizados por

bacterias bajo condiciones de crecimiento desequilibrado tales como la presencia en exceso de la fuente de carbono y la limitación de al menos un nutriente esencial tal como fosforo, nitrógeno, azufre, magnesio u oxígeno. Las bacterias acumulan las cadenas de polímero intracelularmente como carbono y material de reserva de energía. El poliéster más simple y ampliamente producido de la familia de los PHAs es el polihidroxibutirato (PHB), el cual presenta propiedades similares a las del polipropileno y es completamente biodegradable. La principal desventaja de este material es su alto costo de producción comparado con los plásticos a base de petróleo. Por esta razón es muy importante el uso de una fuente de carbono de bajo costo para el proceso de fermentación. En este trabajo la capacidad de *B. sacchari* de producir PHB por fermentación utilizando sacarosa y jarabe de maíz como fuentes de carbono de bajo costo fue estudiada. Se utilizó un biorreactor de 7 L y las siguientes condiciones se mantuvieron durante el cultivo: temperatura, 32°C; agitación, 200 rpm; pH, 7. Con el fin de estimular la síntesis de PHB, la limitación de nitrógeno fue implementada. El mejor resultado se obtuvo cuando se utilizó sacarosa como fuente de carbono obteniendo una concentración final de biomasa de 17.5 g/L con una acumulación del 23% de PHB, mientras, cuando se usó jarabe de maíz la biomasa final fue de 8.4 g/L con una acumulación de PHB del 5.8%. Finalmente el peso molecular del PHB producido con sacarosa fue de $6X10^5$ Da. Se puede concluir que la sacarosa fue mejor sustrato que el jarabe de maíz para la acumulación de PHB y que las propiedades del biopolímero fueron similares a aquellas presentadas por el PHB comercial.

Palabras Clave: *Burkholderia sacchari;* biopolímeros; polihidroxialcanoatos, polihidroxibutirato.

INTRODUCCIÓN

El uso de polímeros sintéticos representa en la actualidad un problema de contaminación ambiental debido a que la gran mayoría no son biodegradables. La organización Plastic Europe estimó que la producción mundial total de polímeros sintéticos en 2013 fue de 299 millones de toneladas [1]. Por esta razón diversos países han promovido la investigación para el desarrollo de nuevos materiales de uso común que se puedan eliminar fácilmente de la biosfera. Los polihidroxialcanoatos (PHAs) son polímeros producidos por un amplio número de bacterias, con propiedades similares a los polímeros sintéticos además de ser biodegradables y biocompatibles [2–5]. Estos biopolímeros son acumulados intracelularmente como material de reserva que les permite a los microorganismos sobrevivir bajo condiciones de estrés [6]. Otra de las ventajas es que algunos microrganismos pueden utilizar como materia prima para la producción de biopolímeros fuentes de carbono renovables, derivados de la agricultura e incluso de los desechos industriales [7]. El polihidroxibutirato (PHB) es el polímero más sencillo de la familia de los PHAs, con propiedades similares al polipropileno, aunque con una mayor rigidez y cristalinidad, por lo que sus aplicaciones son más limitadas [8]. Sin embargo, el principal problema para su desarrollo a nivel industrial es su costo de producción ya que es mucho mayor al de aquellos producidos a partir de petróleo [9]. Una disminución en los costos de producción es posible ya sea implementando nuevas estrategias fermentativas, nuevos procesos de recuperación y purificación del polímero, usando microorganismos capaces de sintetizar y acumular PHAs en altas concentraciones o utilizando fuentes de carbono de menor costo, ya que esta representa aproximadamente el 50% del costo total de producción [2, 3]. Teniendo en cuenta estos factores, el objetivo de este trabajo fue evaluar el crecimiento y acumulación de biopolímero (PHB) con *B. sacchari* empleando dos fuentes de carbono de bajo costo como lo son la sacarosa y el jarabe de maíz.

METODOLOGÍA

Microorganismo y condiciones de crecimiento.

La cepa empleada para la producción de PHB fue *Burkholderia sacchari*. Para su conservación y mantenimiento se emplearon cajas Petri con el medio de cultivo indicado en la Tabla 1, solidificado con 15 g/L de agar y como fuente de carbono sacarosa. El inóculo para las fermentaciones se preparó, tomando una asada de colonias de *B. sacchari* cultivadas en medio sólido y transfiriéndola a matraces con medio líquido, cuya composición fue igual a la utilizada para el medio sólido, los cuales se incubaron a 30°C y 150 rpm, durante 48 h.

Tabla 1. Composición del medio para el cultivo de *B. sacchari.*

Compuesto	**Concentración (g/L)**
Na_2HPO_4	5.5
KH_2PO_4	2.25
$[NH_4]_2SO_4$	3.0
$MgSO_4 \bullet 7H_2O$	0.5
$CaCl_2 \bullet H_2O$	0.02
Citrato de amonio férrico	0.1
Peptona	1
Extracto de levadura	1
Elementos traza	1 ml/L
Sacarosa o jarabe de maíz	20 o 5
pH	≈7.0±0.2

Producción de PHB

Las fermentaciones se llevaron a cabo en un biorreactor Applikon de 7 L con control automático de pH, temperatura, agitación y espuma mediante el uso del módulo de control ADI 1035. Las fuentes de carbono utilizadas fueron sacarosa comercial y jarabe de maíz proporcionado por la empresa IMSA. Para iniciar la fermentación se agregó el 10% de inóculo respecto al volumen de medio utilizado, se mantuvo a una temperatura de 30°C mediante un sistema de recirculación de agua, con una agitación de 200 rpm y un flujo de aire de 1 VVM. El sistema de cultivo por lote alimentado se realizó en dos fases: Fase1. Producción de biomasa en condiciones nutrimentales sin limitación; Fase 2. Acumulación de PHB en condiciones de limitación de fuente de nitrógeno. Con este fin, cada vez que la cantidad de azúcares presentes en el medio se agotaba o disminuía a valores por debajo de 5 g/L se agregaban pulsos de una solución de 700 g/L de sacarosa. Debido a que el pH en este tipo de fermentación tiende a acidificarse de manera importante, este fue mantenido entre 6.5 y 7.4 mediante la adición automática de solución de NH_4OH (durante la fase de producción de biomasa) o solución de NaOH (durante la fase de acumulación de PHB). El monitoreo de la cinética de crecimiento se llevó a cabo mediante la extracción periódica de muestras a las cuales se les determinaron los siguientes parámetros: azúcares totales, nitrógeno amoniacal y biomasa.

Extracción del PHB.

La biomasa final obtenida de la fermentación fue sometida a una serie de lavados inicialmente con agua destilada, después con etanol y por último con cloroformo para extraer el biopolímero. Para retirar las células de la solución de cloroformo se empleó papel filtro y un embudo Buchner para llevar a cabo el filtrado de la misma. Por último, para precipitar el biopolímero disuelto en el cloroformo se agregó metanol en una relación 1:5 y la mezcla se centrifugó a 4000 rpm por 15 minutos. Finalmente la mezcla de cloroformo/metanol fue separada por decantación. Por último para comprobar de manera cualitativa que el biopolímero obtenido era PHB, se empleó la técnica de espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (FTIR-ATR) en un espectrofotómetro infrarrojo marca Perkin Elmer modelo Spectrum 100.

Determinación del peso molecular.

El peso molecular del biopolímero se determinó por cromatografía de permeación en gel (GPC, por sus siglas en inglés) utilizando un cromatógrafo de líquidos (HPLC) marca Waters equipado con un controlador modelo 600, detector de índice de refracción modelo 2414, automuestreador modelo 717 plus y un módulo de bombas cuaternarias modelo 60F utilizando columnas Waters Styragel de diferentes intervalos de peso molecular conectadas en serie en un horno manteniendo la temperatura a 40°C. Se preparó una solución de 1mg de polímero por mL de dimetilformamida y se puso en un baño de agua a una temperatura de 90 °C durante 30 minutos. Finalmente la solución fue filtrada con ayuda de un acrodisco con una membrana de politetrafluoroetileno de 0.20 µm y se inyectaron 20 µL de muestra. Como fase móvil se utilizó dimetilformamida a un flujo de 1 mL/min. Para conocer el peso molecular de las muestras, previamente se elaboró una curva de calibración con estándares de poliestireno de baja polidisperdidad de pesos moleculares entre 484 y 2,530,000 Da (Fluka 84134).

RESULTADOS

Las fermentaciones se llevaron a cabo empleando dos fuentes de carbono diferentes, en este caso, sacarosa comercial y jarabe de maíz. Los resultados se muestran en la Tabla 2, donde se puede apreciar que los mejores resultados, tanto de crecimiento como de acumulación de PHB se obtuvieron cuando se empleó sacarosa como fuente de carbono. Durante la fermentación se verificó la acumulación del polímero mediante la técnica de tinción con rojo nilo, por medio de la cual es posible teñir los gránulos lipídicos que presentan fluorescencia (color naranja-rojo) al ser observados con ayuda de un microscopio de fluorescencia como se muestran en la Figura 1.

Tabla 2. Producción de biomasa y acumulación de PHB por *B. sacchari* utilizando diferentes fuentes de carbono.

Fermentación	**Sustrato**	**Biomasa (g/L)**	**PHB (g/L)**	**$Y_{x/s}$**	**$Y_{p/s}$**	**Acumulación de PHB (%)**
1	Sacarosa	10.5	2.8	0.26	0.07	26.2
2	Sacarosa	17.8	4.1	0.25	0.06	23.2
3	Jarabe	8.4	0.7	0.16	0.01	5.8
4	Jarabe	6.1	0.4	0.12	0.01	5.7

$Y_{x/s}$ = g de biomasa producida por g de fuente de carbono consumida
$Y_{p/s}$= g de PHB producido por g de fuente de carbono consumida

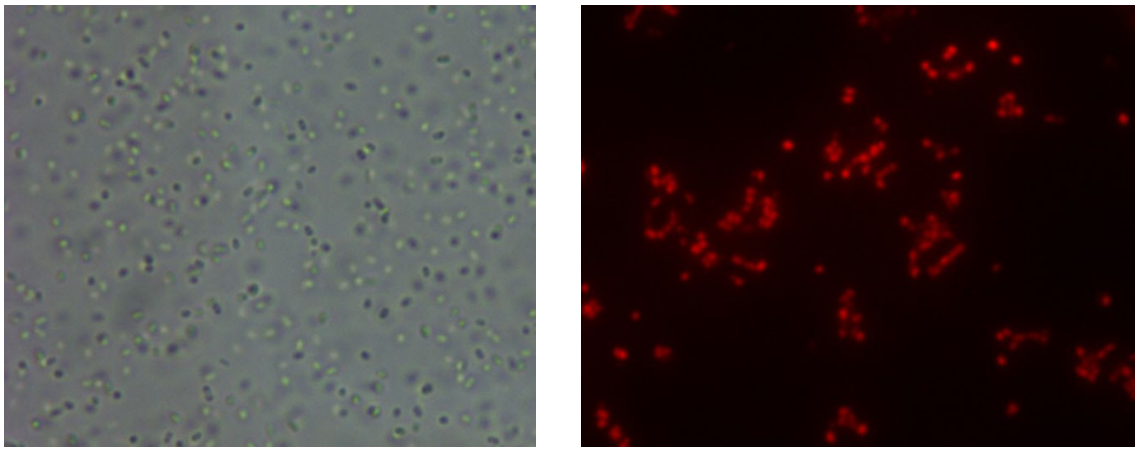


Figura 1. Células de *B. sacchari* (100 X) sin teñir (lado izquierdo) y teñidas con Rojo Nilo (lado derecho).

Una vez extraído, el PHB producido por *B. sacchari* se llevó a cabo un análisis con FTIR-ATR para comprobar de manera cualitativa que el biopolímero obtenido fuera el esperado. Los espectros obtenidos se muestran en la Figura 2 en los cuales se ve un pico característico en 1720 cm^{-1} que indica la presencia del grupo carbonilo (C=O) del PHB y también se observan una serie de bandas entre 1300 y 1000 cm^{-1} correspondientes al estiramiento del enlace C-O del grupo éster. En 1380 aparece una banda correspondiente al estiramiento del enlace C-H de grupos metilos y otra de menor intensidad a 1450 cm^{-1} debida a la deformación asimétrica del enlace C-H de los grupos metilenos. Con este espectro fue posible confirmar que el polímero obtenido a partir de fermentación con *B. sacchari* corresponde al polihidroxibutirato ya que el espectro obtenido de la muestra presenta los mismos picos que el de referencia.
Por último, se determinó el peso molecular del polímero obtenido y además se comparó con el peso molecular de PHB comercial. En la Tabla 3 se muestran los resultados.

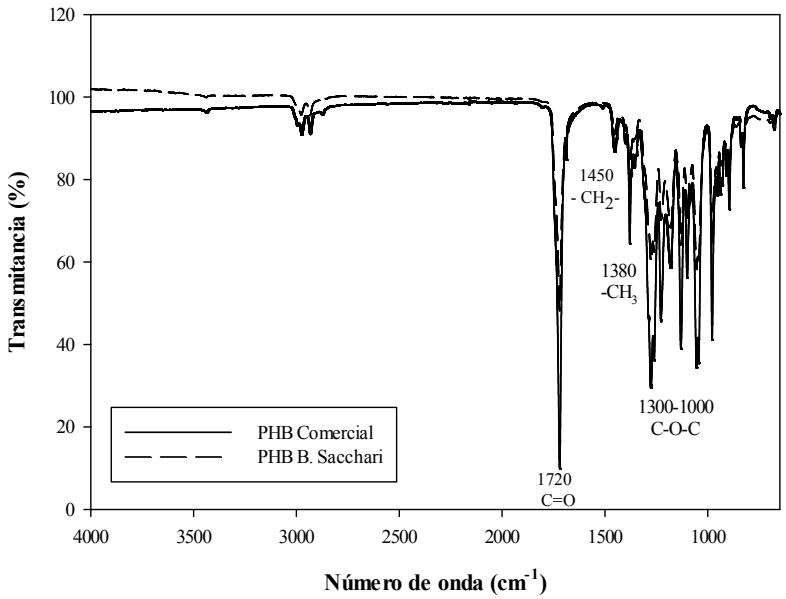


Figura 2. Espectro FTIR-ATR del PHB comercial y del obtenido con *B. sacchari*.

Tabla 3. Tiempos de retención y pesos moleculares de los biopolímeros

Biopolímero	**Tiempo de retención**	**Peso molecular (Da)**
PHB (*B. sacchari)*	6.33	626,988
PHB comercial	6.46	556,969

DISCUSIONES

En los resultados obtenidos se observa que tanto el crecimiento como la acumulación de polímero se ven favorecidos al emplear como fuente de carbono sacarosa. El crecimiento lento y por lo tanto baja producción de biomasa, rendimientos y acumulación de polímero presentado al emplear jarabe de maíz puede deberse a que esta fuente de carbono pudiera contener impurezas o productos de degradación de azúcares debido al procesamiento térmico para la obtención del jarabe (Reacción de Maillard). Es conocido que en otras bacterias estos compuestos inhiben el crecimiento microbiano [10]. Otra posibilidad es que las fuentes de carbono presentes en el jarabe fueran utilizadas por el microorganismo para producir otros metabolitos tales como ácidos orgánicos lo cual es común en muchas otras bacterias. Por otra parte, el peso molecular del PHB obtenido por medio de la fermentación es similar al presentado por el PHB comercial, lo cual resulta de gran importancia ya que el peso molecular de los PHAs depende de varios factores entre los que se encuentran el microorganismo y la fuente de carbono empleada y varía de $5x10^4$ hasta $2x10^6$ Da [3].

CONCLUSIONES

La producción de PHB a partir de fermentación con *B. sacchari* es posible con ambas fuentes de carbono, obteniendo mejores resultados cuando se emplea sacarosa como fuente de carbono. Además el peso molecular del polímero obtenido con esta bacteria resultó ser similar al obtenido de manera comercial.

AGRADECIMIENTOS

A CONACyT por el apoyo otorgado a través de la beca **249206**.

REFERENCIAS

[1] Plastic Europe, "Plastics – the facts 2014/2015," 2015. http://www.plasticseurope.org/documents/document/20150227150049-final_plastics_the_facts_2014_2015_260215.pdf.

[2] Bosco, F., Chiampo, F. (2010) "Production of polyhydroxyalcanoates (PHAs) using milk whey and dairy wastewater activated sludge. Production of bioplastics using dairy residues," *Journal of Bioscience Bioengineering*, 109 (4): 418–421.

[3] Cesário, M. T., Raposo, R. S., de Almeida, M. C. M. D., van Keulen, F., Ferreira, B. S., da Fonseca, M. M. R. (2014) "Enhanced bioproduction of poly-3-hydroxybutyrate from wheat straw lignocellulosic hydrolysates.," *New Biotechnology*, 31 (1): 104–13.

[4] Silva, L. F., Taciro, M.K., Michelin Ramos, M. E., Carter, J. M., Pradella, J. G. C., Gomez, J. G. C. (2004) "Poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) production by bacteria from xylose, glucose and sugarcane bagasse hydrolysate.," *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 31 (6): 245–54.

[5] Prabisha, T. P., Sindhu, R., Binod, P., Sankar, V., Raghu, K. G., Pandey, A. (2015) "Production and characterization of PHB from a novel isolate Comamonas sp. from a dairy effluent sample and its application in cell culture," *Biochemical Engineering Journal*, 101: 150–159.

[6] Luengo, J. M., García, B., Sandoval, A., Naharro, G., Olivera, E. R. (2003) "Bioplastics from microorganisms," *Current Opinion in Microbiology*, 6 (3): 251–260.

[7] Braunegg, G., Lefebvre, G., Genser, K. F. (1998) "Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: physiological and engineering aspects.," *Journal of Biotechnology*, 65 (2–3): 127–61.

[8] Keenan, T. M., Tanenbaum, S. W., Stipanovic, A. J., Nakas, J. P. (2004) "Production and characterization of poly-beta-hydroxyalkanoate copolymers from Burkholderia cepacia utilizing xylose and levulinic acid.," *Biotechnology Progress*,20 (6): 1697–1704.

[9] Pradella, J. G. D. C., Taciro, M. K., Mateus, A. Y. P. (2010) "High-cell-density poly (3-hydroxybutyrate) production from sucrose using Burkholderia sacchari culture in airlift bioreactor," *Bioresource Technology*, 101 (21): 8355–8360.

[10] Einarsson, H., Snygg, B. G., Eriksson, C. (1983) "Inhibition of bacterial growth by Maillard reaction products," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 31 (5): 1043–1047.

COMPARISON OF LEAD REMOVAL EFFICIENCY BY *Scirpus americanus* PLANTS TRANSFORMED GENETICALLY AND NOT TRANSFORMED

(Comparación de la eficiencia de remoción de plomo por plantas de *Scirpus americanus* (tule) transformadas genéticamente y no transformadas)

Roberto Carlos Martínez-Hernández[a]*, Ma. Del Socorro Santos-Díaz[a+]

[a] Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luís Potosí.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: ssantos@uaslp.mx

Área del conocimiento: Biorremediación.

ABSTRACT
Phytoremediation is recognized as an alternative to remove heavy metals form water and soil. Previous studies in our laboratory show that *in vitro* root cultures of *Scirpus americanus* transformed with *Agrobacterium rhizogenes* (line T12), and not transformed roots, removed Pb from culture medium. Plants were regenerated from the *in vitro* root cultures but their capacity to uptake Pb has not been analyzed. A greater efficiency is expected in line T12 because it has major absorption area due to its hairy roots. Therefore, the objective of this research was to compare the efficiency of *S. americanus* plants non transformed (control) vs line T12. The plants were cultivated in ½ MS medium without sucrose and containing 0, 60, 90, 120 or 150 µg/L Pb. Chlorophyll a, chlorophyll b and total chlorophyll content were measured to verify the cellular integrity of plants in presence of Pb. Four ml of medium were collected each 2 days during 8 days, and the concentration of Pb was quantified by Atomic Absorption Spectrometry. The results show that there were not apparent effects of toxicity in control plants and in the T12 line. Also, the levels of chlorophyll (a, b and total) were not statistically different ($p>0.05$) in plants cultivated with or without metal. The control plants and the line T12 continued removing the metal at all concentrations tested. Nevertheless, the metal uptake was faster in the line T12 in comparison to control plants. At the end of the experiment, the Pb uptake in the line T12 ranged between 75 to 87%, while in the control plants ranged between 66 to 77%. The results show a higher efficiency in a line T12, however both lines can be cultivate increasing concentrations of Pb.

Keywords: lead; phytoremediation; normal plant; transformed plant.

RESUMEN
La fitorremediación es conocida como una alternativa para remover metales pesados de agua y suelo. Estudios previos en nuestro laboratorio mostraron que cultivos *in vitro* de raíces de *Scirpus americanus* transformadas con *Agrobacterium rhizogenes* (línea T12) y no transformadas remueven Pb del medio de cultivo. Plantas completas fueron regeneradas a partir de los cultivos *in vitro* de raíces pero su capacidad para remover Pb aún no ha sido estudiada. Se espera una mayor eficiencia de remoción en la línea T12, ya que presenta raíces pilosas aumentando con ello la superficie de absorción. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue comparar la eficiencia de remoción de Pb de plantas de *S. americanus* no transformadas (control) vs la línea T12. Para ello, las plantas fueron cultivadas en medio ½ MS sin

sacarosa adicionando 0, 60, 90, 120 o 150 µg/L Pb. Los niveles de clorofila a, clorofila b y clorofila total fueron cuantificados para verificar la integridad celular en presencia de Pb. Se colectaron 4 mL de medio de cultivo cada dos días durante ocho días, y la concentración de Pb fue cuantificada por absorción atómica. Los resultados muestran que aparentemente no hay efectos de toxicidad en las plantas control ni en la línea T12. Además los niveles de clorofila (a, b y total) no son estadísticamente diferentes ($p>0.05$) en las plantas cultivadas con o sin metal. Las plantas control y la línea T12 siguen removiendo el metal en todas las concentraciones probadas. Sin embargo, la remoción es más rápida en la línea T12 en comparación con las plantas control. Al final del experimento, el Pb fue removido por la línea T12 en un 75 a 87% mientras que por las plantas control en un 66 a 77%. Los resultados muestran una mayor eficiencia de remoción por la línea T12, sin embargo, ambas líneas pueden ser cultivadas en concentraciones de Pb cada vez mayores.

Palabras Clave: plomo; fitorremediación; planta normal; planta transformada.

INTRODUCCIÓN

El plomo se encuentra entre los principales contaminantes del medio ambiente y se considera una amenaza para la flora y fauna por su persistencia a largo plazo y por su toxicidad. Ésta se debe a su capacidad para unirse a moléculas orgánicas a través de ligandos, como grupos sulfidrilo, radicales amino, fosfato, carboxilo e hidroxilo. Por su tamaño y carga, puede reemplazar al calcio y acumularse en el tejido óseo o desplazar metales esenciales produciendo efectos de deficiencia nutrimental. El plomo al igual que otros metales pesados genera especies reactivas de oxigeno (EOR) o radicales libres que provocan estrés oxidativo. El daño de los radicales libres se presenta a distintos niveles, destacando la inactivación de proteínas y enzimas, por la oxidación de los grupos sulfidrilo; la peroxidación lipídica de membranas, causando rupturas y subproductos de las cadenas hidrocarbonadas; alteraciones en el ADN generando mutaciones, aberraciones cromosómicas, e inhibiendo la síntesis y reparación de las bases dañadas [1].

Una alternativa para remediar ambientes contaminados con plomo es la fitorremediación, la cual se refiere al uso de plantas o partes de plantas para reducir, mineralizar, degradar, volatilizar, secuestrar y/o estabilizar contaminantes orgánicos e inorgánicos. Esta técnica evita la necesidad de transportar o excavar suelos, causa menor daño al ecosistema que la remediación química y física, y es más barata. Actualmente, se conocen más de 400 especies de plantas con capacidad para captar metales de por lo menos 45 especies [2,3]. También se pueden usar cultivos *in vitro* para procesos de remediación de suelos y aguas contaminados con metales. Por ejemplo, las raíces *in vitro* de *Rubia tinctorum* captaron Ag, As, Cd, Cu, Ca, Hg, In, Ni, Pb, Pd, Se, y Zn; los cultivos de *Calystegia sepium, Solanum nigrum* y *Thlaspi caerulescens* removieron Cd y los de *Brassica juncea* y *Chenopodium amaranticolor* captaron uranio [4].

Estudios previos de nuestro laboratorio mostraron que los cultivos *in vitro* de raíces de *Scirpus americanus* (tule) tienen la capacidad para remover Pb, Cr y Mn del medio de cultivo [5]. Con la finalidad de incrementar la biomasa, las raíces se transformaron genéticamente con la bacteria *Agrobacterium rhizogenes* generándose la línea de raíces T12. Estas raíces, de fenotipo piloso, removieron 3.8 veces más Pb y 1.2 veces más Cr que las raíces no transformadas [6]. Debido a la alta capacidad regenerativa de estas raíces, fue posible obtener las plantas completas transformadas. Con el fin de estudiar el potencial de éstas plantas en procesos de fitorremediación de aguas contaminadas con plomo, el presente trabajo se enfocó a establecer los cultivos de plantas de tule control y de la línea T12 en medios líquidos, cultivar las plantas en medios con diferentes concentraciones de plomo y comparar su capacidad de remoción de plomo.

METODOLOGÍA

Para iniciar los estudios se usaron plántulas transformadas cultivadas en cajas de Petri con medio de Murashige y Skoog a la mitad de la concentración de sus sales (½ MS) semisólido, sin sacarosa y pH 5.7 [7]. Para establecer los cultivos líquidos las plantas transformadas y plantas *in vitro* control se transfirieron a matraces Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 100 mL de ½ MS líquido, con agitación constante a 135 rpm, en condiciones de fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de obscuridad. Cuando las plantas de tule transformadas y no transformadas alcanzaron 10-20 cm de altura se colocaron en 100 mL del mismo medio al que se le agregaron 60, 90, 120 o 150 µL de una solución stock de plomo de 100 mg/L para tener una concentración final de 60, 90, 120 y 150 µg/L de plomo. Como medio control se usó el mismo medio sin metal. Cada dos días se colectaron 4 mL de medio de cada tratamiento hasta el octavo día. El medio se acidificó con 3 µl/mL de HNO_3 0.02 N, se filtró a través de un Swinnex que contenía una membrana con tamaño de poro de 0.22 µm y el filtrado se colocó en frascos HDPE de 15 o 25 mL. El análisis del metal se realizó por absorción atómica usando horno de grafito (Perkin Elmer, modelo 3110 y horno de grafito 600).

Para determinar la integridad celular se cuantificó el contenido de clorofila siguiendo la técnica descrita por Bruinsma [8]. Brevemente, 100 mg de tejido se maceraron con 2.5 mL de acetona al 80% v/v y se centrifugó a 2500 rpm por 5 min. El sobrenadante se aforó a 5 mL con acetona al 80% y se midió la absorbencia a 663, 645 y 652 nm por espectrometría UV-Vis (NanoDrop 2000) para cuantificar clorofila a, b y clorofila total, respectivamente.

RESULTADOS

Las plantas regeneradas *in vitro* y la línea T12 se adaptaron fácilmente al medio líquido lográndose la obtención de plantas de 10-20 cm en un periodo de 15 días. Posteriormente, las plantas se expusieron a diferentes concentraciones de plomo. Las cinéticas de remoción (Figura 1) mostraron que las plantas control y la línea T12 fueron capaces de captar el metal aún a las concentraciones más altas probadas. En los medios con 60, 90, 120 y 150 µg/L de Pb el contenido del metal en el medio con las plantas control se redujo a 15.93, 29.69, 41.05 y 46.89 µg/L, respectivamente, y a 7.81, 15.13, 30.73 y 26.81 µg/L en los cultivos con la línea T12. Estos datos indican que la línea T12 fue más eficiente en la captación del metal que las plantas control.

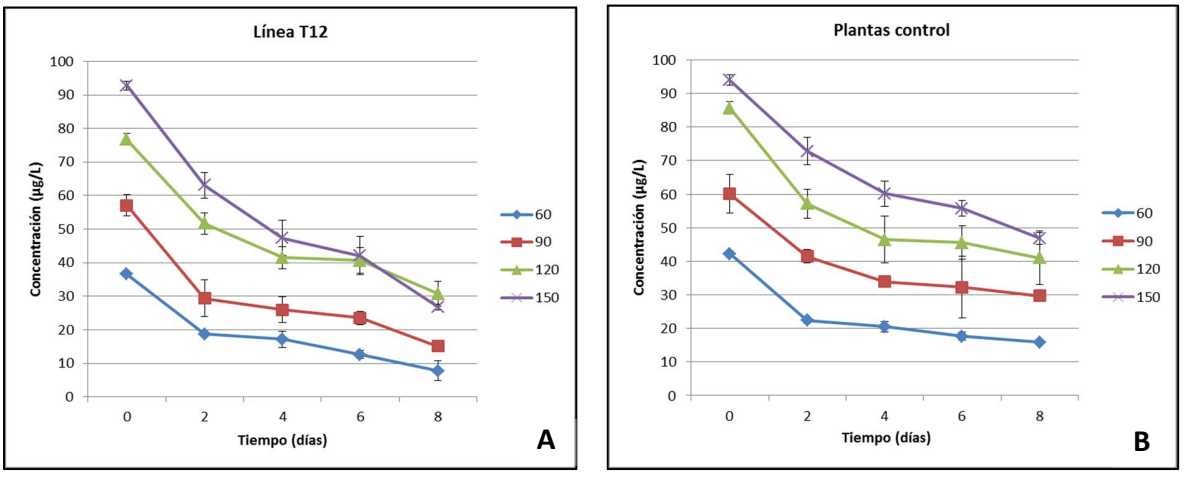


Figura 1. Cinética de remoción de plomo. A) Línea T12 y B) plantas normales (n=3)

La Figura 2 muestra los datos en porcentaje observándose que la línea T12 removió el metal de forma sostenida en tanto que las plantas control presentaron una tendencia a la saturación.

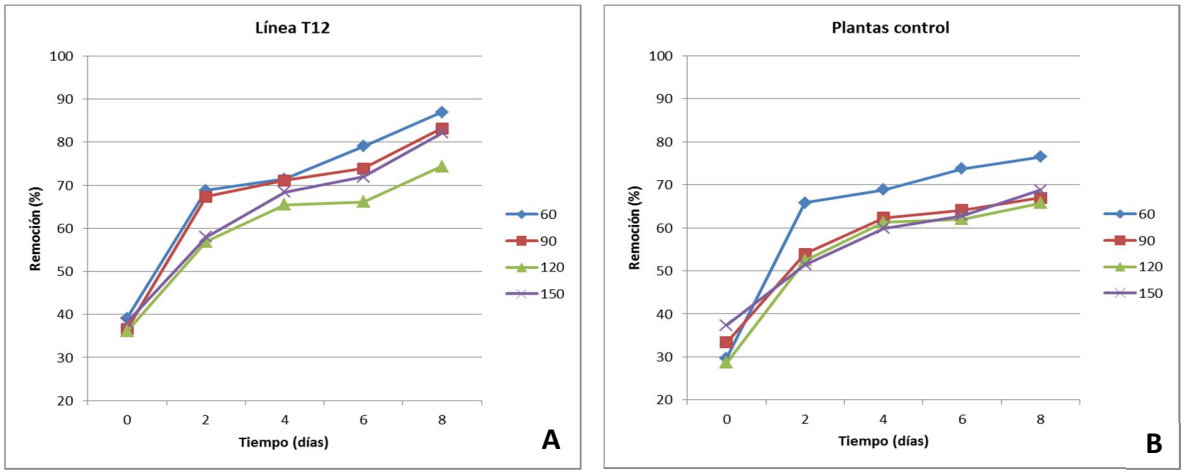


Figura 2. Porcentaje de remoción de plomo. A) Línea T12 y B) plantas normales (n=3)

En la Figura 3 se muestra el aspecto físico de las plantas T12 y normal expuestas a plomo, en donde se observa que aparentemente no hay efectos de toxicidad.

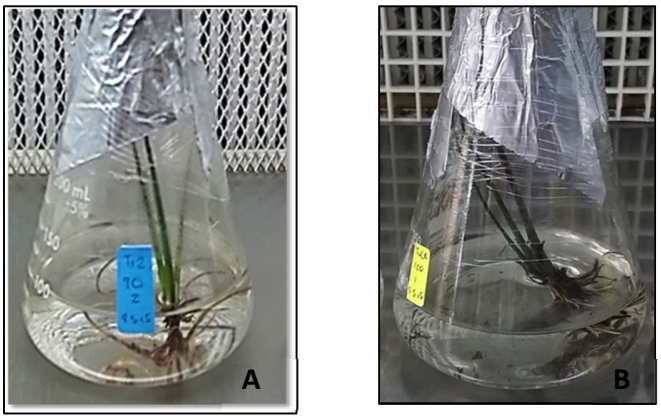


Figura 3. Aspecto de la línea T12 (A) y línea normal (B) en medio con plomo.

Para asegurar que el plomo no estaba generando daños a nivel celular se cuantificó el contenido de clorofila a, clorofila b y clorofila total en las plantas control y transformadas. Se conoce que la clorofila A en las plantas es la más abundante y actúa como pigmento antena durante el proceso de la fotosíntesis.

La clorofila B está relacionada con los pigmentos de tipo carotenoide y su función es de fotoprotección. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 4.

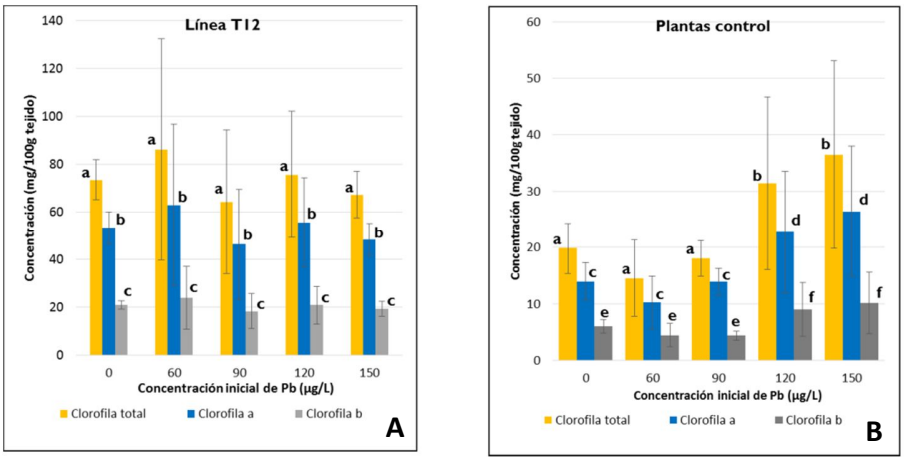


Figura 4. Cuantificación de clorofila en la línea T12 (A) y plantas normales (B) (n= 9)
* Valores con la misma letra no difieren significativamente (p>0.5)

Los datos mostraron que la exposición de las plantas de tule al plomo no afectó su aparto fotosintético ya que el contenido de clorofila no fue estadísticamente diferente en medios con y sin metal a excepción de los tratamientos con 120 y 150 µg/L de Pb en la línea normal, en donde los niveles son mayores, pudiendo deberse al mejor estado inicial de las plantas. En general las plantas transformadas presentaron entre 1.5 y 2 veces más clorofila que las plantas control.

DISCUSIÓN

Mediante el uso de las técnicas de ingeniería genética se ha podido incrementar la resistencia de varias especies vegetales a metales pesados. La transformación con *A. rhizogenes* genera plantas más eficientes para remover contaminantes debido a que se forman raíces con fenotipo piloso con mayor superficie de absorción. Por ello, en nuestro laboratorio se generaron plantas de tule transformadas con *A. rhizogenes* (línea T12). Los resultados mostraron que línea T12 fue más eficiente para remover el Pb del medio, que las plantas normales. Las plantas transformadas removieron el metal de forma continua y más rápidamente que las plantas control, las cuales presentaron una tendencia a la saturación sobre todo a las concentraciones de metal más altas probadas. La rápida remoción de plomo por la línea T12 podría estar relacionada a la presencia de transportadores específicos en la membrana que internalizan el metal. Por ejemplo, se ha descrito la presencia de transportadores tipo ABC (AtPDR12) en *Arabidopsis* [9] y NtCBP4 [10] en tabaco que internalizan el plomo.

Otro mecanismo de tolerancia al plomo descrita en la literatura es la quelación del metal por fitoquelatinas y la disminución del estrés oxidativo por glutatión. Se ha descrito un aumento importante de cisteína, glutatión y fitoquelatinas en *Euglea gracilis* en respuesta al plomo [11]; plantas tansgénicas de *Brassica juncea,* que acumularon 2-3 veces más plomo que las plantas normales, presentaron una sobreexpresión de la enzima γ glutamil-cistein sintetasa involucrada en la síntesis de glutatión [12]; y en plantas de vetiver expuestas a plomo se detectó la formación de complejos plomo-fitoquelatinas [13]. Es posible que las plantas de tule exhiban algún mecanismo de quelación, dado que no se observaron

efectos en la morfología de las plantas y tampoco a nivel del aparato fotosintético, pues el contenido de clorofila no se modificó por exposición al metal, sino que incluso fue superior al de las plantas control.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se demostró que las plantas de tule normales y la línea T12 removieron el metal aún a la concentración de 150 µg/L. La línea T12 fue más eficiente para captar el metal que las plantas control y por lo tanto es posible que pueda tolerar concentraciones superiores a 150 µg/L de plomo. Estas plantas podrían usarse para procesos de fitorremediación de aguas industriales contaminadas con metales. Se requerirán estudios posteriores para dilucidar el mecanismo bioquímico de tolerancia presente en las plantas transformadas.

AGRADECIMIENTOS

A la doctora María del Socorro Santos Díaz por permitirme trabajar bajo su dirección y por todo el apoyo brindado a lo largo del desarrollo de este proyecto.
Al equipo del laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Facultad de Ciencias Químicas (UASLP) por su valiosa colaboración y apoyo.

REFERENCIAS

[1] Hong-yun, P., Sheng-ke, T., Xiao-e, Y. (2005), "Changes of root morphology and Pb uptake by two species of *Elsholtzia* under Pb toxicity", Journal of Zhejiang University Science, 6B (6): 546-552.

[2] Ghosh, M., Singh, S. P. (2005), "A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of its products", Applied Ecology and Environmental Research, 3(1): 1-18.

[3] Doran, P. M. (2009), "Application of plant tissue culture in phytoremediation research: incentives and limitations", Biotechnology and Bioengineering, 103:60-76.

[4] Santos-Díaz, M.S. (2013), "Metal remediation via *in vitro* root cultures" in Plant Based Remediation Processes, Soil Biology 35, Chapter VI, (Gupta, D. K. Ed.), Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 101-115.

[5] Santos-Díaz, M.S., Barrón-Cruz, M.C. (2011), "Lead, chromium and manganese removal by *in vitro* root culture of two aquatic macrophytes especies: *Typha latifolia* L. and *Scirpus americanus* pers", International Journal of Phytoremediation, 13: 538-551.

[6] Alfaro Saldaña, E. (2013), Transformación de raíces de *Scirpus amer*icanus (tule) por *Agrobacterium rhizogenes* y estudio de su capacidad para remover Pb y Cr. (Tesis de maestría, UASLP): 50-69

[7] Murashige, T., Skoog, F. (1962), "A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures", Physiologia Plantarum, 15:473-497.

[8] Bruinsma, I. (1961), "A comment on the spectrophotometric determination of clorophyll", Biochimica et Biophysica Acta, 52:576-578.

[9] Lee, M., Lee, K., Lee, J., Noh, E.W., Lee, Y. (2005), "AtPDR12 contributes to lead resistance in *Arabidopsis"*, Plant Physiology, 138:827–836.

[10] Arazi, T., Sunkar, R., Kaplan, B., Fromm, H. (1999), "A tobacco plasma membrane calmodulin-binding transporter confers Ni^{2+} tolerance and Pb^{2+} hypersensitivity in transgenic plants", Plant Journal, 20(2): 171–182.

[11] Mendoza-Cózatl, D.G., Rangel-*González,* E., Moreno-Sánchez, R. (2006), "Simultaneous Cd^{2+}, Zn^{2+} and Pb^{2+} uptake and accumulation by photosynthetic *Euglena gracilis"*, Environmental Contamination and Toxicology, 51: 521–528.

[12] Bennett, L.E., Jason, L., Burkhead, J.L., Hale, K.L., Terry, N., Pilon, M., Pilon-Smits, E.A.H. (2003), "Analysis of transgenic Indian mustard plants for phytoremediation of metal-contaminated mine tailings", Journal of Environmental Quality, 32:432–440.

[13] Andra, S.S., Datta, R., Sarkar, D., Makris, K.C., Mullens, C.P., Sahi, S.V., Bach, S.B.H. (2009), "Induction of lead binding phytochelatins in vetiver grass (*Vetiver zizanioides* L.)". Journal of Environmental Quality, 38:868–877.

BIODEGRADATION IN TWO STAGES OF BLACK REACTIVE 5 DYE BY *Halomonas sp*. AT ALKALINE AND HIGH SALINITY CONDITIONS

(Biodegradación en dos etapas del colorante Negro Reactivo 5 por *Halomonas* sp. en condiciones alcalinas y de alta salinidad)

Brenda Montañez Barragán[a], Paulina Gutiérrez Macías*[b], Lourdes Hernández De Jesús[b], Blanca Estela Barragán Huerta[b+]

[a] Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología-Instituto Politécnico Nacional
[b] Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-Instituto Politécnico Nacional

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: bbarraga59@hotmail.com

Área del Conocimiento: Biodegradación

ABSTRACT
The azoic dyes (-N=N-) are the chemical class of pigments most frequently discharged in the textile effluents. An alternative to the treatment of these contaminated effluents are the biological processes, nevertheless, thus to the recalcitrance of the azoic compounds and the high concentrations of salt in the dying bath (6-10%), these compounds cannot be removed by conventional wastewater biological treatments. In general, biodegradation is less efficient or non-efficient at all when salinity increases. In this work, the aim was to determine if the agitation, aeration, medium composition, pH and salinity affected the production of biomass and discoloration of the azo-colorant Reactive Black 5 (RB5) by the strain *Halomonas sp.* It was determine that the discoloration of RB5 requires a first stage for biomass production, in which the highest growth was attained at 38 °C in aerobic conditions and agitation (120 rpm) in a nutritive medium. To eliminate the colorant a second microaerophilic (static) stage was required afterwards. The obtained removal percentage of the RB5 was 92% at 24h, but maximum removal of 99.6% was achieving at 72h under microaerophilic conditions. Once the culture conditions were established several assays with different concentrations of NaCl (0, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10%) were performed, obtaining higher discoloration rates in the treatments with salt (84-91%) compared to the treatment without salt (75%). It was observed that at pH 4 and 5 the discoloration was inhibited (17.5%) although at pH values from 6 to 11 the discoloration was higher than 85% at 24h.

Keywords: Biodegradation, Black reactive 5, two stage, halophile.

RESUMEN
Los colorantes textiles de la clase química azo (-N=N-), son los más descargados en los efluentes de la industria textil. Una alternativa para el tratamiento de los efluentes con estos contaminantes son los procesos biológicos, sin embargo, debido a la recalcitrancia de estos compuestos y a la presencia de altas concentraciones de sal en los baños de teñido (6-10%), éstos no son removidos con los procesos convencionales de tratamiento biológico de aguas residuales. En general la biodegradación de contaminantes es menos eficiente o no funciona cuando la salinidad se incrementa. En este trabajo se decidió determinar si la agitación, aireación, composición del medio, pH y salinidad afectaban la

producción de biomasa y la decoloración del azo-colorante Negro Reactivo 5 por la cepa *Halomonas* sp. Se determinó que el proceso de decoloración del NR5 requiere de una etapa de producción de biomasa, en la cual se obtuvo el mayor crecimiento celular a 38 °C, en condiciones aerobias y agitación (120 rpm) en medio nutritivo; posteriormente para la eliminación del colorante se requiere una segunda etapa en condiciones microaerofílicas (estático). El porcentaje de remoción de NR5 obtenido fue de 92% a las 24h alcanzando un máximo de remoción del 99.6% después de 72h en condiciones microarofílicas. Una vez establecidas las condiciones de cultivo se realizaron tratamientos con diferentes cantidades de NaCl (0, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10%) obteniendo mayor decoloración en los tratamientos con sal (84-91%) respecto al tratamiento si sal (75%). Se observó que a pHs de 4 y 5 la decoloración es inhibida (17.5%) pero a valores de pH de 6 a 11, la decoloración fue superior al 85% a las 24h de la fase microaerofílica.

Palabras Clave: Biodegradación, Negro Reactivo 5, dos fases, halófila.

INTRODUCCIÓN

Los colorantes sintéticos son ampliamente utilizados en diferentes giros industriales, siendo la industria textil la que abarca un mayor uso de éstos. La cantidad de pigmento eliminado durante los procesos de teñido varía desde el 2%, cuando se usan colorantes básicos, hasta un 50% cuando se usan colorantes reactivos [1]. Durante el proceso de teñido se emplea una gran cantidad de sales y diversos aditivos para fijar el color, produciendo un efluente con una alta concentración de sólidos, sales y típicamente un pH alcalino; estos efluentes al ser descargados provocan un gran daño, tanto a la salud como a los ecosistemas ya que son considerados como residuos peligrosos tóxicos y de naturaleza potencialmente carcinogénica [2].

Los colorantes de la clase química azo (-N=N-), como por ejemplo el Negro Reactivo 5, son los más utilizados en la industria textil; una alternativa para tratar estos efluentes son los tratamientos biológicos, sin embargo, debido a su recalcitrancia y a la presencia de altas concentraciones de sal en los baños de teñido (6-10%) éstos no son removidos aplicando los procesos convencionales de tratamiento biológico de aguas residuales, ya que en general la biodegradación de contaminantes es menos eficiente o no funciona cuando la salinidad se incrementa [3].

Los azocolorantes pueden ser reducidos a sus correspondientes aminas por microorganismos en condiciones anaerobias, sin embargo las aminas generadas son difíciles de degradar en condiciones aerobias. Para lograr la degradación total de éstos compuestos se pueden implementar tratamientos secuenciales anaerobios-aerobios [4].
Varios estudios han sido realizados sobre las condiciones de cultivo para diferentes colorantes, Otukar et al. [4] estudiaron la eficiencia de la degradación del colorante Rojo Reactivo 120 en presencia de NaCl a concentraciones entre 0.5 a 5%, encontrando que la mayor tasa de degradación se obtuvo con 1% de NaCl, sin embargo debido a la naturaleza de los efluentes textiles, la degradación de estos colorantes se debe llevar a cabo en presencia de concentraciones inclusive mayores de sal (6-10%).

METODOLOGÍA

Selección del medio de cultivo para mayor producción de biomasa

Se seleccionó el medio de cultivo para obtener la mayor producción de biomasa de *Halomona*s sp., la composición de los medios empleados se muestra en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**. Los diferentes tratamientos se prepararon con un 10% de NaCl, 50 ppm de NR5 y se ajustó a pH de 6.5. Se colocaron 22.5 mL del medio en matraces y se inocularon con 2.5 mL de suspensión de la cepa con Abs_{600nm}=1.0 y se incubaron durante 24 h a 38 °C y 120 rpm.
Para la determinación de la cantidad de biomasa y remoción del color se tomó una alícuota de 1.5 mL del medio en un tubo Eppenrdorf y se centrifugó a 10,000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante se guardó para la lectura de color a 586nm; la biomasa se resuspendió en NaCl al 10%, se homogenizó en vortex y se leyó absorbancia a λ=600nm. La decoloración del NR5 se calculó empleando la Ecuación 1.

Ecuación 1. $$\text{Decoloración (\%)} = \frac{(\text{Concentración inicial} - \text{Concentración final NR5}) * 100}{\text{Concentración inicial NR5}}$$

Tabla 1. Composición de los medios de cultivo empleados para el crecimiento de *Halomonas* sp.

Tratamiento	Peptona (g/L)	Extracto de carne (g/L)
A	10	3
B	5	1.5
C	2.5	0.75
D	1.25	0.375

Análisis de la producción de biomasa y de la eficiencia de decoloración en condiciones aerobias y de microaerofilia.

Se realizó primeramente una cinética de crecimiento y decoloración durante 48 h en condiciones aerobias (38 °C y 120 rpm) con el fin de determinar el tiempo en la cual se obtiene la mayor producción de biomasa. Seleccionado el tiempo de mayor producción de biomasa, se realizó un segundo experimento que constó de 2 etapas, la primera en condiciones aerobias durante el tiempo establecido en la cinética previa y la segunda en condiciones de microaerofilia (38 °C en condiciones estáticas). Durante los experimentos, se tomaron alícuotas de 1.5 mL del medio en un tubo Eppendorf cada 2 horas durante 24 h, se centrifugaron a 10,000 rpm durante 20 min. El sobrenadante se guardó para la lectura de color (586nm) y la biomasa se resuspendió en NaCl al 10%, se homogenizó en vortex y se leyó absorbancia a 600nm. La decoloración del NR5 se calculó empleando la Ecuación 1

Evaluación del efecto de la concentración de sal en la decoloración de NR5.

Con la composición del medio de cultivo seleccionado previamente, se varió la concentración de NaCl (0, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8,9 y 10%) se adicionó con 50 ppm de NR5 a pH 6.5 en todos los tratamientos. Se colocaron 22.5 mL del medio en matraces y se inocularon con 2.5 mL de suspensión de la cepa con Abs_{600nm}=1.0, se incubó durante 24 h a 38 °C y 120 rpm para la fase aerobia y durante 24 h a 38 °C en estático para la fase microaerofílica. Al término de ambas fases se determinó la decoloración y la biomasa. Se tomaron alícuotas de 1.5 mL del medio en un tubo Eppendorf, se centrifugaron a 10,000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante se guardó para la lectura de color (586nm) y la biomasa se resuspendió en NaCl al 10%, se homogenizó en vortex y se leyó absorbancia a 600nm. La decoloración del NR5 se calculó empleando la Ecuación 1.

Evaluación del efecto del pH en la decoloración de NR5.

Con la composición del medio de cultivo seleccionado previamente, se varió el pH del medio (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11) se adicionó con 50 ppm de NR5 y 5% de NaCl. Se colocaron 22.5 mL del medio en matraces y se inocularon con 2.5 mL de suspensión de la cepa con Abs_{600nm}=1.0, se incubaron durante 24 h. a 38 °C y 120 rpm para la fase aerobia y durante 24 h a 38 °C en estático para la fase microaerofílica. Al término de ambas fases se determinó la decoloración y biomasa. Se tomó una alícuota de 1.5 mL del medio en un tubo Eppenrdorf y se centrifugó a 10,000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante se guardó para la lectura de color (586nm) y la biomasa se resuspendió en NaCl al 10%, se homogenizó en vortex y se leyó absorbancia a 600nm. La decoloración del NR5 se calculó empleando la Ecuación 1.

RESULTADOS

Los valores de biomasa obtenida (como unidades de A_{600nm}), al cabo de 24 h de cultivo con los diferentes medios fue la siguiente: (A) 1.195, (B) 0.992, (C) 0.681, (D) 0.408, por lo cual se seleccionó el medio de cultivo "A" (10 g de peptona, 3 g de extracto de carne) para obtener la mayor producción de biomasa. Las constantes cinéticas obtenidas para *Halomonas* sp. fueron de 0.0916 h^{-1} para la velocidad máxima específica de crecimiento ($\mu_{máx}$) y de 6.48 g/L para la constante de saturación (ks).

Las cinéticas de crecimiento y decoloración muestran que la decoloración del NR5 no está asociada al crecimiento del microorganismo; ya que durante la fase exponencial de crecimiento únicamente se obtuvo el 12% de remoción del colorante y consecutivamente durante la fase microaerofílica en la cual se obtiene el 90% de decoloración a las 24h, la biomasa se incrementa únicamente el 7% (de 1.195 a 1.296) como se puede observar en la Figura 1. Con ambas cinéticas se definió que la duración de las fases aerobia y microaerofílica fuera de 24 h en ambos casos.

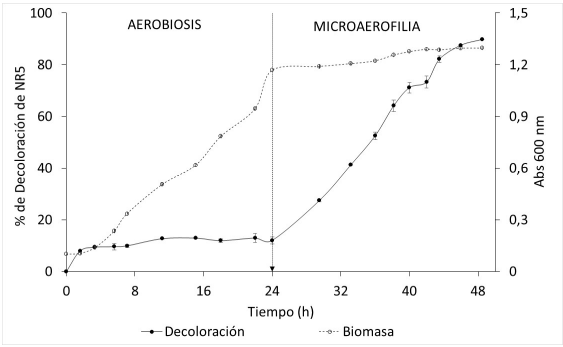


Figura 1. Cinética de crecimiento y decoloración de NR5 en condiciones aerobias y microaerofílicas

La decoloración del NR5 en función de la concentración de sal presente en el medio, muestra que se tiene una mayor remoción del colorante en los tratamientos con sal en comparación del tratamiento sin sal. En el tratamiento sin sal se obtuvo una remoción del 74% del colorante, y a medida que se incrementó la concentración de sal en el medio la remoción del colorante aumentó o se mantuvo

contante. Los porcentajes de remoción obtenidos para los tratamientos con NaCl al 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10% fueron 84.9, 86.8, 89.7, 90.12, 90.88, 90.68, 89.23, 89.19 y 89.6 % respectivamente.

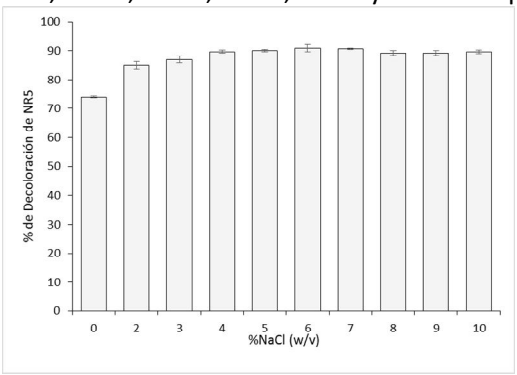


Figura 2. Efecto de la salinidad en la decoloración del NR5 a 24h de la fase microaerofílica.

A valores de pH 4 y 5 se mostró la inhibición de la decoloración del NR5 obteniendose únicamente un 17.5% de remoción del color; sin embargo la remoción del colorante entre los pH de 6 a 11 presentó valores mayores al 85%.

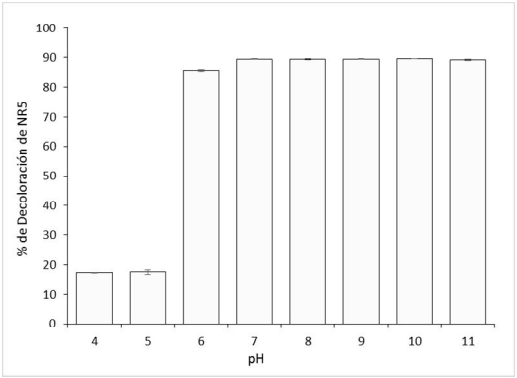


Figura 3. Efecto del pH en la decoloración del NR5 a 24h de la fase microaerofílica.

DISCUSIÓN

Las cinéticas de crecimiento y decoloración obtenidas en el presente trabajo mostraron que no existe una relación entre el crecimiento de *Halomonas* sp. y la decoloración del NR5, así mismo mostró que ambas etapas (aerobia y microaerofílica) son necesarias para la remoción del azocolorante. La decoloración del azo solo puede ser obtenida en condiciones microaerofílicas o anaerobias sin embargo la cepa precisa de condiciones aerobias para su crecimiento. En los últimos años se han aislados diversas cepas capaces de decolorar los azocolorantes tanto en condiciones aerobias como anaerobias, sin embargo al igual que *Halomonas* sp. requieren de una fuente de carbono orgánica (como la peptona o la glucosa) por lo cual presumiblemente no pueden emplear al colorante como sustrato de crecimiento. [5]

Aunque la salinidad es un factor muy importante en la degradación de los efluentes textiles, la mayoría de los microorganismos estudiados por otros autores para la remoción de los compuestos azo no tienen

actividad en condiciones superiores al 2% de salinidad [6]. Los resultados obtenidos muestran que el aumento de la salinidad en el medio (2-10%) no presentan una disminución en la decoloración del NR5 por *Halomonas* sp. ya que los porcentajes de decoloración se mantuvieron idénticos en todos los caso inclusive en los tratamientos con más del 5% de sal, la cual es la mayor cantidad reportada en donde la decoloración no se ve ampliamente afectada [7,8]. Sin embargo la ausencia de sal en el medio disminuyó notablemente la remoción del colorante esto puede ser debido a que la presencia de cloruro de sodio puede influenciar tanto la actividad enzimática o el transporte intracelular del colorante [9].

El pH es otro factor que influye en la decoloración de los compuestos azo, los resultados obtenidos corresponden a lo reportado por diferentes autores[6,7,9] quienes obtuvieron valores óptimos de decoloración (70-90%) entre pH 6-9. En la presente investigación a valores de pH entre 6-11, se obtuvo un porcentaje de decoloración en el rango del 85%- 90% en 24h, mostrando que el aumento en la alcalinidad no afectaba la decoloración del NR5; sin embargo a pH de 4 y 5 se mostró una alta inhibición de la decoloración (17.5%); se sabe que el efecto del pH puede estar relacionado al transporte de las moléculas del colorante a través de la membrana celular, lo cual es considerado como el paso limitante para la decoloración [9].

CONCLUSIONES

Halomonas sp. demostró poseer una alta capacidad para decolorar el azo-colorante NR5 en un intervalo de pH de 6 a 11 y con un contenido de sal desde el 2 al 10% presentando poca variación en las eficiencias de decoloración, esto representa una ventaja en el tratamiento de efluentes textiles ya que puede emplearse a la cepa en efluentes con una alta salinidad y alcalinidad.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó con el financiamiento del proyecto SIP-20151298 y CONACYT No. CB-2011-01-169779. Gutiérrez-Macías agradece la beca otorgada por CONACYT.

REFERENCIAS

[1] O'Neill C., Hawkes, F.R., Hawkes, D.L., Lourenco, N.D., Pinheiro, H.M., Delee, W. (1999), Colour in textile effluents–sources, measurement, discharge consents and simulation: a review**,** J. Chem. Technol. Biotechnol., 74:1009–1018.

[2] Nethaji, S., Sivasamya, A., Thennarasua, G., Saravanan, S. (2010), Adsorption of Malachite Green dye onto activated carbon derived from *Borassus aethiopum* flower biomass, J. Hazard. Mater., 181, 271–280.

[3] Veenagayathri, K., Vasudevan, N. (2010), Biodegradation of formaldehyde under saline conditions by a moderately halophilic bacterial consortium, Curr. World Environ., 5 (1):31-38.

[4] Oturkar, C.C., Nemade, H.N., Mulik, P.M., Patole, M.S., Hawaldar,R.R., Gawai, K.R. (2011), Mechanistic investigation of decolorization and degradation of reactive red 120 by *Bacillus lentus* BI377, Bioresour. Technol., 102(2):758-64.

[5] Anjali, P., Poonam, S., Leela, I. (2007), Bacterial decolorization and degradation of azo dyes, Int. Biodeterior. Biodegrad., 59:73–84.

[6] Guo, J., Zhou, J., Wang, Z., Yang, L., Li, Z. (2008), The new incorporation bio-treatment technology of bromoamine acid and azo dyes wastewaters under high-salt conditions, Biodegradation 19 (1):93-98.

[7 Dafalea, N., Raoa,N., Meshramb,S., Watea, S.(2008), Decolorization of azo dyes and simulated dye bath wastewater using acclimatized microbial consortium–Biostimulation and halo tolerance, Bioresour, Technol., 99 (7): 2552-2558.

[8] Khalid, A., Kausar, F., Arshad, M., Mahmood, T., Ahmed,I. (2012), Accelerated decolorization of reactive azo dyes under saline conditions by bacteria isolated from Arabian seawater sediment, Environ. Biotech., 96(6):1599-1606.

[9] Chang, J. S., C. Chou, Y. Lin, J. Ho, and T. L. Hu, (2001), Kinetic characteristics of bacterial azodye decolorization by *Pseudomonas luteola*, Water Res., 35: 2041.

EFFECT OF CO-INOCULATION OF ARBUSCULAR MYCORRHIZA AND PHOSPHATE SOLUBILIZING FUNGI ON THE ACCUMULATION OF CADMIUM (Cd^{2+}) IN *Phragmites australis*.

(Efecto de la co-inoculación de micorrizas arbusculares y hongos solubilizadores de fosfato en la acumulación de cadmio (Cd^{2+}) en *Phragmites australis*).

José Roberto Zúñiga-Silva[a*+], Octavio Loera-Corral[b], Ricardo Aguilar-López[a], Refugio Rodríguez-Vázquez[a]

[a] Departamento de Biotecnología y Bioingeniería; Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.
[b] Departamento de Biotecnología; Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: zuniga_jr@me.com

Área del Conocimiento: Biorremediación

ABSTRACT
The fertilizers application allows the accumulation of insoluble phosphate in water bodies due to surface runoff causing eutrophication, this phenomenon itself is an environmental issue, moreover the presence of potentially toxic elements like cadmium (Cd), causes a major environmental concern; phosphorus assimilation is one of the most important ecological processes in which rhizospheric microorganisms participate in the increase of the bioavailability of this element in the form assimilable to the plant. Our goal was to evaluate the metal removal capacity, coupled to the phosphate assimilation by selected fungi, therefore the hypothesis of this work is that the presence of arbuscular mycorrhizal fungi and phosphate solubilizing fungi enhance the accumulation of Cd in *Phragmites australis*. The selected inoculum corresponds to a consortium of *Rhizophagus spp*. as arbuscular mycorrhiza and *Penicillium italicum* as phosphate solubilizing fungi; both were isolated from a natural wetland that receives wastewater discharges. Four treatments were established and the following four factors were evaluated; (1) Plant + double inoculum (2) Plant + *Rhizophagus spp*., (3) Plant + *P. italicum* and (4) Uninoculated Plant. The experiment was maintained for 6 months and at the end of this time, plant tissue was evaluated by acid digestion; the greatest accumulation occurred in the roots of the plant in particular in treatment (1) that uses calcium phosphate, where 64.11 mg of Cd per gram of plant was recorded, this treatment presented a significant difference (Fo= 17.56; *p*= 0.007). With ferric phosphate, the inoculation have a significantly difference compared to the control (Fo= 6.39; *p*= 0.016). The greater growth response was obtained in treatment (1) with both phosphates, therefore the effectiveness of a double inoculation demonstrated the increase in metal tolerance and the decrease of Cd accumulation in shoots of *P. australis*.

Keywords: Wetlands; Heavy Metals; Insoluble Phosphate; Microbial Interactions.

RESUMEN
La aplicación de fertilizantes permite la acumulación de fosfato insoluble en los cuerpos de agua debido a procesos de escorrentía superficial provocando eutrofización, este fenómeno en sí es un problema ambiental, por otra parte la presencia de elementos potencialmente tóxicos como el cadmio (Cd), causa una gran preocupación ambiental. La asimilación de fósforo es uno de los procesos ecológicos más importantes en las que participan los microorganismos rizosféricos en el aumento de la biodisponibilidad de este elemento en forma asimilable hacia la planta. Nuestro objetivo fue evaluar la el efecto de la inoculación de especies fúngicas seleccionadas sobre la capacidad de remoción de metal y la asimilación de fosfato, por lo tanto, la hipótesis de este trabajo es que la presencia de micorrizas arbusculares y hongos solubilizadores de fosfato mejoran la acumulación de Cd en los tejidos de *Phragmites australis*. El inóculo seleccionado corresponde a un consorcio de *Rhizophagus sp*. como micorriza arbuscular y *Penicillium italicum* como cepa solubilizadora de fosfato; ambos microorganismos fueron aislados de un humedal natural que recibe descargas de aguas residuales. Cuatro tratamientos fueron establecidos y se evaluaron los siguientes cuatro factores; (1) Planta + doble inóculo (2) Planta + *Rhizophagus sp.*, (3) Planta + *P. italicum* y (4) Planta sin inocular. El experimento se mantuvo durante 6 meses y al final de este tiempo las muestras de tejido vegetal se evaluaron mediante digestión ácida; la mayor acumulación se llevo a cabo en las raíces de la planta, en particular en el tratamiento (1) que utiliza fosfato de calcio, donde se registró una asimilación de 64.11 mg de Cd por gramo de planta, este tratamiento presenta una diferencia significativa (Fo=17.56; p= 0.007). Con fosfato férrico, la inoculación presento una diferencia significativa en comparación con el control (Fo=6.39; p=0.016). La mayor respuesta de crecimiento se obtuvo en el tratamiento (1) con ambos fosfatos; por lo tanto, el uso de la doble inoculación incremento la tolerancia hacia el metal y por lo tanto la disminución de la acumulación de Cd en los brotes de *P. australis*.

Palabras Clave: Humedales; Metales pesados; Fosfatos Insolubles; Interacciones Microbianas

INTRODUCCIÓN

La recuperación de sitios contaminados con metales puede favorecerse a través de la selección de especies de plantas tolerantes a la contaminación, por otra parte los microorganismos desempeñan un papel fundamental, debido a la influencia que tienen sobre la fisiología de la planta, funciones tales como la fijación de nitrógeno, el reciclaje de materia orgánica e inclusive la simbiosis micorrízica están relacionadas directamente con el desarrollo de la planta [1]. Entre los microorganismos del suelo, las micorrizas arbúsculares desempeñan un papel relevante en el establecimiento y supervivencia de las plantas, además de influir sobre la mejora de las propiedades del suelo en ambientes impactados [2]. El cadmio (Cd) es un elemento potencialmente tóxico sin función biológica reconocida, que afecta el crecimiento, metabolismo y el estado hidrológico de la planta [3], los principales síntomas de fitotoxicidad son clorosis, inhibición de crecimiento, bajo rendimiento de biomasa, así como cambios en el ciclo respiratorio y de asimilación de nutrientes [4]. Las plantas de los humedales tienen un alto potencial para la biorremediación tanto de macronutrientes como de elementos tóxicos, debido a su rápido crecimiento y alta producción de biomasa, en particular para el caso de metales pesados que son acumulados en los tejidos vegetales [5]. *Phragmites australis*, conocido como carrizo común, es una de las plantas más comunes en los ecosistemas acuáticos, la cual es capaz de soportar condiciones ambientales extremas [6]; *P. australis* ha sido ampliamente utilizado en el tratamiento de aguas

residuales urbanas e industriales que tienen metales pesados [7]. Muchos hongos saprobios pueden sobrevivir y desarrollarse a altas concentraciones de metales tóxicos [8], especies del género *Aspergillus* y *Penicillium* están implicados en procesos tales como; la solubilización de fosfato, promoción del crecimiento de la planta, además de los efectos sinérgicos con hongos micorrícos arbúsculares [9]. La habilidad de solubilización de fosfato es una de las funciones más importantes que son llevadas a cabo por hongos rizosféricos, entre los que se consideran los hongos micorrizicos arbúsculares y los hongos saprobios [10]. El presente estudio tuvo como objetivo, estudiar la influencia de los hongos micorrízicos conjuntamente con la co-inoculación del hongo *P. italicum* en el crecimiento y la absorción de metales de las plantas de carrizo, la hipótesis de este trabajo es que la inoculación de hongos micorrizicos y hongos solubilizadores de fosfato favorecerán la acumulación de Cd en *P. australis*.

METODOLOGÍA

El consocio micorrízico se obtuvo a partir de una muestra de suelo rizosférico tomado de la rizósfera de *P. australis* de plantas de un humedal natural impactado con descargas de aguas residuales, este sitio está ubicado en la Costa Central de Veracruz, México (96°23'09" W, 19°35'19" N). Posteriormente se establecieron cultivos trampa en macetas de plástico, utilizando arena de río estéril como medio de soporte (se esterilizó tres veces a 121º C, tres ciclos, 1 h cada ciclo) y sorgo (*Sorghum spp*) como planta trampa. Las macetas de propagación se mantuvieron por 4 meses en el invernadero (temperatura promedio mínima de 13ºC y 40ºC como máxima, fotoperiodo de 14/10 h luz/ oscuridad). La cepa de *P. italicum* aislada también de suelo rizósferico en el sitio de muestreo fue previamente identificada y seleccionada de acuerdo con sus características de solubilización de fosfato; la producción de conidias se realizó en granos de arroz precocido, lavado tres veces con agua potable y manteniéndolo en reposo durante 30 min, en agua a 75º C, esto de acuerdo a la metodología propuesta por Berlanga y Carrillo (2006). Para el experimento se utilizaron plántulas juveniles *P. australis* de aproximadamente 15 cm. de longitud, las raíces se desinfectaron con etanol durante 20 s, en NaClO al 5% durante 15 minutos y se enjuagaron cinco veces con agua destilada estéril. El sistema hidropónico (Figura 1) estuvo compuesto de un cilindro que contuvo 1 Kg de granzón que previamente había sido lavado con agua corriente y HCl al 2%, posteriormente se esterilizó en autoclave (121ºC, tres ciclos, 1 hora cada ciclo). El experimento consistió en cuatro unidades experimentales en donde se sembraron 3 plántulas de carrizo por unidad.

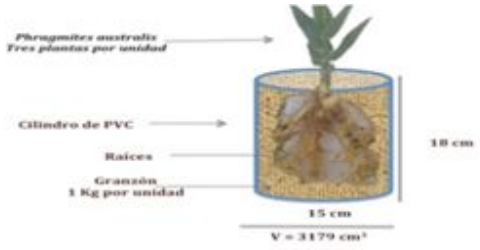


Figura 1. Unidad experimental que consiste en un cilindro de cloruro de polivinilo (PVC) de 15 cm de diámetro y 18 cm de longitud.

Las plantas se regaron con una solución Long Ashton a pH 5.8, para el aporte de fósforo en la solución nutritiva se utilizaron dos fuentes de fosfato (tricálcico y férrico), para los riegos se estableció un sistema

de dosificación semanal. Para la suplementación de metales se utilizó sulfato de cadmio ($CdSO_4.H_2O$). Los niveles de Cd^{2+} que se utilizaron fueron 0 y 50 mg L^{-1}, los tratamientos fueron los siguientes:

- Tratamiento 1 (T1) : *P. australis + Micorriza + Hongo + 50 mg L^{-1} Cd^{2+}*
- Tratamiento 2 (T2) : *P. australis + Micorriza + Hongo*
- Tratamiento 3 (T3) : *P. australis + Micorriza + 50 mg L^{-1} Cd^{2+}*
- Tratamiento 4 (T4) : *P. australis + Micorriza*
- Tratamiento 5 (T5) : *P. australis + Hongo + 50 mg L^{-1} Cd^{2+}*
- Tratamiento 6 (T6) : *P. australis + Hongo*
- Tratamiento 7 (T7) : *P. australis + 50 mg L^{-1} Cd^{2+}*
- Tratamiento 8 (T8) : *P. australis*

Para el inóculo micorrízico, las esporas que se utilizaron se obtuvieron por el método de tamizado húmedo y decantación de cultivos obtenidos en las macetas de propagación mientras que para *P. italicum* se inocularon aproximadamente 1.7 x 10^7 UFC en las raíces de cada planta de los tratamientos correspondientes. El diseño experimental que se utilizó fue completamente al azar con tres repeticiones. El experimento se realizó en condiciones de invernadero (19º39´41´´latitud norte, 99º07´49´´ longitud oeste, 2,261 msnm, temperatura promedio mínima de 11ºC y 40ºC como máxima, fotoperiodo de 13/11 h luz/oscuridad). Los riegos con la solución nutritiva con Cd^{2+} comenzaron al día 28 y las plantas se cosecharon dos días después del último riego (90 días de edad).

Las muestras de plantas se separaron en raíces y parte aérea se lavaron cuidadosamente para eliminar las partículas de soporte se realizó la medición de parámetros agronómicos (longitud de raíces, tamaño de planta, peso seco); el material vegetal fue secado en un horno a 70 ° C durante 72 h y posteriormente se fraccionó manualmente en un mortero. El material vegetal seco (500 mg) se digirió con 10 ml de ácido nítrico concentrado y 1 mL de H_2O_2 al 20% en un horno de microondas (Mars 5, CEM Corporation, Matthews, NC, USA). Mientras que la determinación de Cd se realizó con espectroscopia de absorción atómica.

RESULTADOS

Para evaluar la presencia de colonización micorrizica en la rizósfera de las plantas de *P. australis* se realizó tinción de raíces con Azul Tripano y los resultados se expresan en función del porcentaje de colonización micorrizica, los tratamientos T3 y T4 presentaron los mayores porcentajes de colonización, destaca el T3 con fosfato férrico que presentó un porcentaje de colonización de 70.37 %, mientras que el T4 con el mismo fosfato mostró un porcentaje de colonización de 39.25%. Para el caso del fosfato cálcico se obtuvo 30.37 % y 35.55 % de porcentaje de colonización micorrizica para el T3 y T4 respectivamente. En el caso de los tratamientos combinados se observó una mayor colonización en el T1, obteniendo porcentajes de colonización micorrizica de 11.11 % para tricálcico y 12.5 % para férrico, mientras que el T2 se observó 9.62 % para tricálcico y 8.14 % para férrico, por lo que la presencia del metal, favorece la colonización micorrizica.

Durante tres meses se registró el crecimiento de *P. australis* bajo Las condiciones establecidas en los diferentes tratamientos y utilizando dos fuentes de fosfato, para el caso de fosfato tricálcico no se presentó diferencia significativa entre tratamientos. Sin embargo, el tratamiento 8 (*P. australis* sin metal) fue el que presentó el mayor crecimiento (113 ± 29.81 cm), seguido de los tratamientos con Planta /Micorriza/ Metal (T3) y Planta/ Micorriza/ Metal (T4), mientras que para el caso del fosfato

férrico se observó la misma tendencia, siendo el tratamiento 8 el de mayor crecimiento (99.66 ± 11.06 cm) aunque el crecimiento fue menor al registrado con fosfato tricálcico. Para el caso de la elongación de raíces, el T3 (Micorriza) es el que presentó una mayor elongación 35 y 44 cm para cálcico y férrico respectivamente.

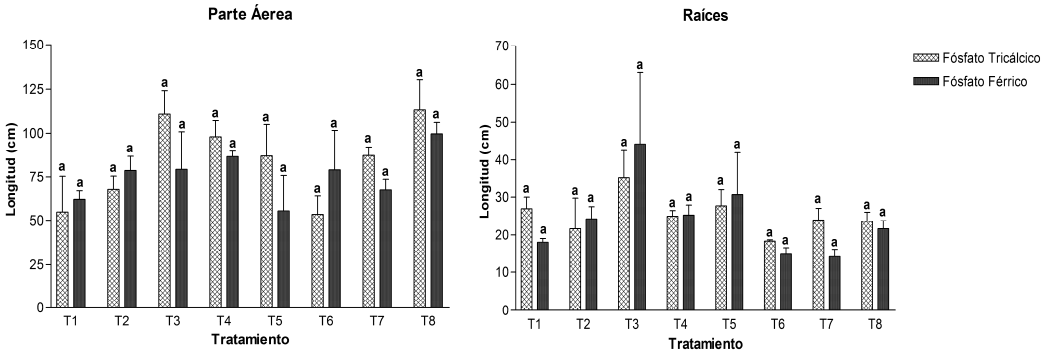


Figura 2 Crecimiento de *Phragmites australis* para los 8 tratamientos. T1: *P. australis* + Micorriza + Hongo + 50 mg/L Cd^{2+} T2: *P. australis* + Micorriza + Hongo T3: *P. australis* + Micorriza + 50 mg/L Cd^{2+} T4: *P. australis* + Micorriza T5: *P. australis* + Hongo + 50 mg/L Cd^{2+} T6: *P. australis* + Hongo T7: *P. australis* + 50 mg/L Cd^{2+} T8: *P. australis*. Medias con la misma letra no son significativas entre sí (n=3, Media + Error Std, $p < 0.01$).

Con respecto a la acumulación de Cd^{2+} en los tejidos de la planta se observó que hubo mayor acumulación en las raíces en comparación con la parte aérea (Figura 3), el tratamiento 1 (inoculación dual) favoreció la acumulación de Cd^{2+} en el tratamiento con fosfato tricálcico (64.11 ± 20.57 cm) presentando diferencia significativa con respecto a los demás tratamientos, mientras que para el caso del fosfato férrico los tratamientos con Micorriza (14.25 ± 2.76 cm) y Hongo (14.92 ± 2.39 cm) favorecieron la acumulación de Cd^{2+} en raíces. Para el caso de la parte aérea, los tratamientos sin inoculación obtuvieron mayor acumulación, siendo el fosfato férrico el tratamiento con valores más altos (7.3 ± 2.43 cm) comparado con el fosfato cálcico (3.25 ± 1.25 cm), mientras que los factores de bioacumulación y de translocación se observan en la Tabla 1.

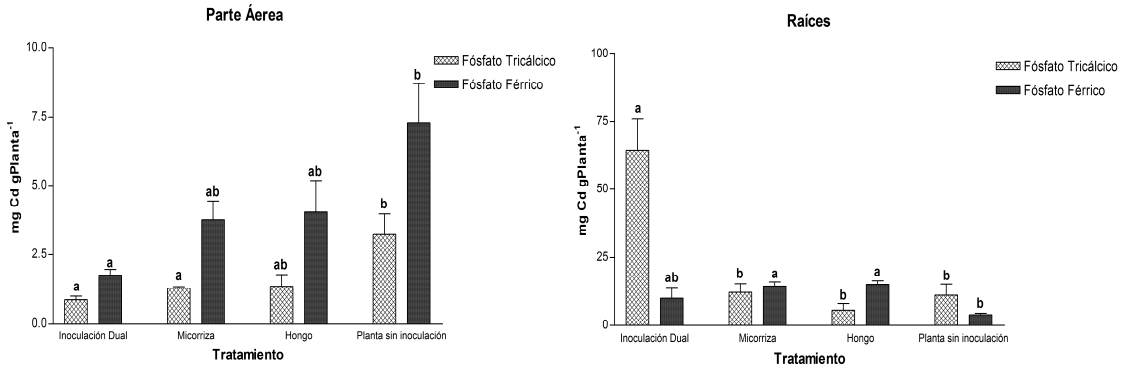


Figura 3 Acumulación de Cd^{2+} en tejidos de *Phragmites australis* para cuatro tratamientos. Medias con la misma letra no son significativas entre sí (n=3, Media + Error Std, $p < 0.01$).

Tabla 1. Factores de Bioacumulación y Translocación.

	Fosfato Tricálcico			Fosfato Férrico		
Tratamiento	Bioacumulación Parte aérea	Bioacumulación Raíces	Translocación	Bioacumulación Parte aérea	Bioacumulación Raíces	Translocación
Doble Inoculación	0.0014	0.1069	0.0134	0.0029	0.0168	0.1736
Micorriza	0.0021	0.0204	0.1052	0.0063	0.0238	0.2639
Hongo	0.0023	0.0095	0.2390	0.0067	0.0249	0.2708
Sin inoculación	0.0054	0.0186	0.2911	0.0122	0.0066	1.8484

DISCUSIÓN

La presencia de *P. italicum* incrementó la colonización micorrízica en comparación con la inoculación individual de hongos micorrizicos arbúsculares, además de favorecer la solubilización de fosfato, los hongos saprobios incrementan la colonización micorrizica de la raíz mediante la producción de metabolitos específicos, por lo que ejercen un efecto sinérgico sobre el consorcio micorrízico [11]; de acuerdo con Arriagada [12], los hongos saprobios tienen influencia sobre la captación de metales pesados desde el sitio contaminado e incrementan la colonización de micorrízica, lo cual favorece los procesos de sorción de metales que pueden estar presentes en niveles tóxicos [13]. La micorriza puede mejorar la asimilación de nutrientes en particular de fósforo, además de aumentar el crecimiento de las plantas mediante la dilución de efecto tóxico ejercido del metal sobre la planta huésped o por la unión del metal al micelio fúngico y posterior inmovilizarlos en la rizosfera o raíces [14]. Los tratamientos de inoculación no presentaron diferencias significativas con respecto al crecimiento de las plantas de *P. australis* en comparación con el tratamiento no inoculado. La mayor acumulación ocurrió a nivel de raíces disminuyendo la posibilidad de traslocación de Cd^{2+} hacia la parte aérea.

CONCLUSIONES

La inoculación micorriza arbuscular en combinación con *P. italicum* no influyó sobre el crecimiento de las plantas de *Phragmites australis,* sin embargo redujo la traslocación del metal hacia el tejido de la planta; el interés de este trabajo radica demostrar que la inoculación favorece la acumulación de metal en los tejidos de *P. australis*, aunquee se observó el efecto contrario por lo nuestra hipótesis se rechaza, no obstante los microorganismos evaluados en este estudio pudieran aplicarse en suelos agrícolas en donde lo que se pretende es evitar la translocación del metal a la parte aérea de la planta.

REFERENCIAS

[1] Hodkinson, I. D., Webb, N. R., & Coulson, S. J., (2002). “Primary community assembly on land- the missing stages: why are the heterotrophic organisms always there first?”. Journal of Ecology, 90: 569–577.

[2] Ortega-Larrocea, M. P., Xoconostle-Cázares, B., Maldonado-Mendoza, I., Carrillo-González, R., Hernández-Hernández, J., Díaz Garduño, M., López – Meyer, M., Gómez-Flores, L., Gónzález – Chávez, M. C. A., (2010). "Plant and fungal biodiversity from metal mine wastes under remediation at Zimapan, Hidalgo, Mexico". Environmental Pollution, 158: 1922–1931.

[3] Divan, A.M., De Oliveira, P.L., Perry, C.T., Atz, V.L., Azzarini-Rostirola, L.N., Raya- Rodriguez, M.T., (2009). "Using wild plant species as indicators for the accumulation of emissions from a thermal power plant, Candiota, South Brazil". Ecol. Indic. 9: 1156–1162.

[4] Perfus-Barbeoch, L., Leonhardt, N., Vavasseur, A., Forestier, C., (2002). "Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status". Plant J 32: 539–548.

[5] Weis, J.S., Glover,T., Weis, P., (2004) "Interactions ofmetals affect their distribution in tissues of Phragmites australis". Environmental Pollution 131: 409-415.

[6] Bonanno, G., Giudice, R. L., (2010). "Heavy metal bioaccumulation by the organs of Phragmites australis (common reed) and their potential use as contamination indicators." Ecological Indicators, 10(3), 639–645.

[7] Bragato, C., Brix, H.,Malagoli, M., (2006). "Accumulation of nutrients and heavy metals in Phragmites australis (Cav.) Trin. ex Steudel and Bolboschoenus maritimus (L.) Palla in a constructed wetland of the Venice lagoon watershed". Environ. Pollut. 144: 967–975.

[8] Valix, M., Tang, J.Y., Malik, R., (2001). Heavy metal tolerance of fungi. Minerals Engineering 14: 499–505.

[9] Barea, J.M., Azcón, R., Azcón-Aguilar, C., (2002) "Mycorrhizosphere interactions to improve plant

fitness and soil quality". Anton Leeuw, 81: 343–351.

[10] Souchie, E.L., Azcón, R., Barea, J.M., Saggin, O.J., Silva, E.M.R., (2006). "Phosphate solubilization and synergism between P-solubilizing and arbuscular mycorrhizal fungi". Pesquisa Agropecuária Brasileira. 41: 1405–1411.

[11] Barea, J. M., Pozo, M. J., Azcón, R., & Azcón-Aguilar, C.(2005). Microbial co-operation in the rhizosphere. Journal of Experimental Botany, 56, 1761–1778.

[12] Arriagada, C. A., Herrera, M. A., Garcia-romera, I., & Ocampo, J. A. (2004). Tolerance to Cd of soybean (Glycine max) and eucalyptus (Eucalyptus globulus) inoculated with arbuscular mycorrhizal and saprobe fungi. Symbiosis, 36, 285–299.

[13] Ning, J. (2000). Mycorrhizal roles in broomsedge plants under phosphorus limitation and aluminum toxicity. PhD dissertation, West Virginia University, Morgantown WV, USA

[14] Chen, B. D., Zhu, Y.-G., Duan, J., Xiao, X. Y., & Smith, S. E. (2007). Effects of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* on growth and metal uptake by four plant species in copper mine tailings. Environmental Pollution, 147, 374–380.

BIODEGRADATION OF TOTAL PHENOLS IN WASTE PULPING PROCESS LIQUIDS ORGANOSOLV

(Biodegradación de fenoles totales en líquidos residuales del proceso de pulpeo Organosolv)

Karina de la Paz García-Mariscal[a*+], Nayeli Sarahi Quiñones-Islas[a], Manuel de Jesús Bermúdez-Guzmán[a]

[a] INIFAP, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Tecomán, Colima. Programa de Bioenergía.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: garcia.karina@inifap.gob.mx

Área del conocimiento: Biorremediación.

ABSTRACT
The removal of phenolic compounds present in industrial effluents is of great environmental importance because these have high toxicity. In the pulp and paper industries, Organosolv pulping process, which asid digestion of lignocellulosic material, leaving liquid wastes high in organic load, intense color and large amounts of phenol is used. In the present investigation anaerobic biodegradation of total phenols was evaluated in present waste pulping process Organosolv (residual liquid, residual liquid Llig and delignified, Ldlig) using different bacterial organisms (*Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens*) and different fungal microorganisms (*Pleurotus columbinus*, *Pleurotus pulmonarius* and *Trametes versicolor*), all under mesophilic conditions. During the biodegradation test, variations in pH, chemical oxygen demand (COD), total sugars, reducing sugars and total phenols, using standard methods each variation is monitored. The results showed an initial phenol content of 3.7 ± 0.5 and 2.5 ± 0.2 g / L for Llig and Ldlig respectively. During biological treatment (22 days), the highest percentage of total phenols removal was obtained in the residual liquid Ldlig with fungal treatment, obtaining removal percentages of 52, 47 and 40% with *P. columbinus*, *P. pulmonarius* and *T. versicolor*, respectively; whereas most bacterial removal treatment was 33% with *P. putida*. These results show that the fungal treatment is most effective removal of organic matter present in the waste of a Organosolv process, compared with bacterial treatment. It was recognized that the residual liquid Ldlig, were the means of better adaptation to both types of microorganisms upon removal. However, it is important to consider the type of phenols present in each residue, since the process may be slowed when there are more complex phenolic compounds.

Keywords: Organosolv, total phenols.

RESUMEN
La remoción de compuestos fenólicos, presentes en efluentes industriales, tiene gran importancia ambiental debido a que estos poseen alto grado de toxicidad. En las industrias de celulosa y papel, se utiliza el proceso de pulpeo Organosolv, el cual facilita la digestión de materia lignocelulósica, dejando residuos líquidos con alto contenido en carga orgánica, coloración intensa y elevadas cantidades de fenoles. En la presente investigación se evaluó la biodegradación anaeróbica de fenoles totales presentes en residuos del proceso de pulpeo Organosolv (líquido residual, Llig y líquido residual deslignificado, Ldlig), utilizando diferentes microorganismos bacterianos (*Pseudomona putida* y *Pseudomona fluorescens*) y con diferentes microorganismos fúngicos (*Pleurotus columbinus, Pleurotus*

pulmonarius y *Trametes versicolor*), todos bajo condiciones mesofílicas. Durante el ensayo de biodegradación, se monitorearon las variaciones de pH, demanda química de oxígeno (DQO), azúcares totales, azúcares reductores y fenoles totales, utilizando para cada variación los métodos estándar. Los resultados mostraron un contenido inicial de fenoles de 3.7±0.5 y 2.5±0.2 g/L para los Llig y Ldlig, respectivamente. Durante los tratamientos biológicos (22 días), se obtuvo el mayor porcentaje de remoción de fenoles totales en los líquidos residuales Ldlig con el tratamiento fúngico, lográndose porcentajes de remoción de 52, 47 y 40% con *P. columbinus*, *P. pulmonarius* y *T. versicolor,* respectivamente*;* mientras que con el tratamiento bacteriano la mayor remoción fue de 33% con *P. putida.* Estos resultados muestran que el tratamiento fúngico, tiene mayor efectividad de remoción de la materia orgánica presente en los residuos generados de un proceso Organosolv, en comparación con tratamientos bacterianos. Se reconoció que los líquidos residuales Ldlig, fueron el medio de mayor adaptación para ambos tipos de microorganismos al efectuar la remoción. Sin embargo, es importante considerar el tipo de fenoles presentes en cada residuo, ya que el proceso podría hacerse más lento cuando existen compuestos fenólicos de mayor complejidad.

Palabras Clave: Organosolv, fenoles totales.

INTRODUCCIÓN

El aumento continuo de la población y el incontrolado desarrollo industrial originan serios problemas para el medio ambiente en forma de contaminación, la cual se define como la presencia de cualquier agente físico, químico o biológico cuya concentración ocasione alteraciones en la estructura y en el funcionamiento de los ecosistemas ambientales [1]. La gestión de residuos está hoy en día fuertemente asociada con productos que sean respetuosos con el medio ambiente y que sean capaces de reincorporarse nuevamente dentro de los ambientes naturales.

En los últimos años la demanda de productos generados por la manufactura papelera ha ido en aumento y con ello los residuos generados por la misma, convirtiendo a la industria de celulosa y papel en una de las principales industrias contaminantes, presentándola como un gran problema ambiental, por tal motivo, se ha acentuado el interés de estudiar diferentes procesos de cocción para obtener pulpa celulósica de calidad, que generen menores niveles de contaminación.

Una alternativa para obtener pulpa para la fabricación de papel está basada en un proceso de pulpeo Organosolv (etanol-agua); el cual presenta algunas ventajas sobre otros procesos de pulpeo químicos en la recuperación de subproductos, como la lignina, la reutilización de solventes empleados y el fácil blanqueo de la pulpa comparado con otras técnicas químicas [2]. Aun teniendo un proceso con menor impacto ambiental, los licores residuales del proceso de pulpeo Organosolv (etanol- agua) siguen siendo un problema de contaminación, debido a la presencia de color en el agua, los compuestos fenólicos y la alta demanda química de oxígeno (DQO) que presentan [3]. Los compuestos fenólicos, inhiben la actividad microbiana y al mismo tiempo son inhibidores de los microorganismos patógenos, lo que indica que son altamente tóxicos en concentraciones elevadas, por lo que es necesario disminuir su concentración en los efluentes antes de que sean desechados o incorporados al medio ambiente.

Durante los primeros años de la década de los ochenta, los residuos tóxicos se convirtieron en el principal problema medio ambiental de la sociedad [4]. La emisión de sustancias contaminantes al medio ambiente hoy en día ha sido inevitable, por lo cual sigue existiendo la necesidad de tener mayor

número de alternativas ante el tratamiento y disminución de estos residuos desfavorables al ambiente y a la población.

Distintas alternativas han sido probadas como tratamientos biológicos, que a pesar de mostrar buenas eficiencias de remoción de materia orgánica, no tienen un impacto importante en la eliminación de los compuestos tóxicos (compuestos fenólicos, furanos, melanoidinas, etcétera) por el contrario tienden a inhibir el proceso y por consecuencia no tienen un efecto en el color final del efluente tratado [5], además de que los microorganismos presentan bajas tasas de crecimiento y una cierta sensibilidad a los cambios ambientales como el pH, la temperatura, entre otros [6].

En este sentido, surgen los tratamientos anaeróbicos como una opción prometedora, dentro de los cuales destaca el empleo de bacterias y hongos ligninolíticos o de pudrición blanca, los cuales son satisfactorios al degradar compuestos fenólicos, decolorar los efluentes tratados y reducir la demanda química de oxígeno (DQO), disminuyendo el impacto que ocasionan estos residuos al ser reincorporados al medio ambiente [7].

La biodegradación de sustancias aromáticas y compuestos lignocelulósicos es un proceso, en el cual los microorganismos tienen la capacidad de utilizar parcial o completamente estos compuestos, como fuente de Carbono o de energía, degradándolos hasta dióxido de Carbono (CO_2) y agua (H_2O) logrando su mineralización. Este proceso se realiza por medio de enzimas y mecanismos a nivel de membrana que permite la entrada de nutrientes y depende de varios factores como las características del contaminante, su concentración, los microorganismos presentes, las condiciones geoquímicas y ambientales entre otras [8].

En los procesos de biorremediación, los microorganismos que comúnmente se utilizan son hongos y bacterias, debido a que tienen rutas metabólicas que les permiten utilizar contaminantes como fuentes de energía o carbono. En nuestro estudio se utilizaron bacterias del género *Pseudomonas* y hongos ligninolíticos, por lo cual en el siguiente apartado se expresa una descripción de los mismos.

Tabla 1. Importancia de bacterias del género *Pseudomona* sp., en la eliminación de compuestos tóxicos.

CEPAS	COMPUESTO TOXICO (CT) ELIMINADO	REFERENCIA
Pseudomonas putida	Realizaron un estudio cinético para la remoción de un compuesto tóxico fenólico, proponiendo una cinética con diferentes concentraciones, 0.05 g/L como concentración mínima y una máxima de 0.5 g/L de fenol.	[9]
	Evaluaron la capacidad de degradar compuestos aromáticos, utilizándolos como fuente de Carbono y energía.	[10]
Pseudomonas fluorescens	Estudiaron la remoción de etil-benceno con *Pseudomonas fluorescens* en forma libre e inmovilizada, encontrando que las células inmovilizadas soportaban concentraciones superiores de compuesto orgánico.	[11]
	Remoción del fenol en biorreactor inoculado con *Pseudomonas fluorescens*, evaluando diferentes concentraciones (20, 50, 100 y 170 mg/L) presentando las mayores tasas de degradación a una concentración de 100 mg/L de fenol.	[12]

Las bacterias del género *Pseudomona* son reconocidas por su metabolismo versátil capaz de utilizar distintos tipos de compuestos contaminantes como fuente de energía y de Carbono, es por esta razón que se han realizado un gran número de estudios sobre biorremediación utilizando distintas cepas de *Pseudomona* sp., como fueron mencionadas en la **Tabla 1**.

La utilización de hongos ligninolíticos para la solución de problemas ambientales es una alternativa de gradual expansión en biotecnología, ya que han demostrado ser capaces de degradar eficientemente la lignina contenida en los materiales lignocelulósicos mediante la acción de enzimas extracelulares [13]. Los primeros estudios acerca de la capacidad degradativa de estos hongos fueron realizados por *Kirk* y *Yang* en 1979 [14] utilizando el basidiomiceto *Phanerochaete chrysosporium*. El interés acerca de este grupo de hongos y especialmente en sus enzimas ligninolíticas aumentó cuando Bumpus en 1985 [15], demostró que *P. chrysosporium* era capaz de oxidar compuestos xenobióticos recalcitrantes como los compuestos aromáticos policíclicos, cloro-aromáticos y tinturas poliméricas. Los estudios actuales demuestran que el tratamiento de efluentes con hongos ligninolíticos no sólo produce decoloración hasta en un 80%, sino también detoxificación, razón por la cual estos hongos ofrecen una opción innovadora para minimizar el impacto ambiental de los procesos contaminantes.

La mayoría de los hongos ligninolíticos pertenecen al grupo Basidiomicetes, entre ellos los géneros *Pleurotus* y *Trametes*, los cuales destacan por su capacidad de degradar lignina y una gran variedad de compuestos tóxicos como compuestos aromáticos, clorolignинas, colorantes, fenólicos, pesticidas y poliaromáticos presentes en efluentes de diversas industrias como la azucarera, destilerías, farmacéutica, papelera, petrolera, textil, entre otras [16, 17]. La mayoría de las enzimas caracterizadas en estos hongos son del tipo de las oxidasas (lacasa y Mn-peroxidasa) que se han utilizado principalmente en el tratamiento de aguas residuales o productos recalcitrantes [18, 19].

METODOLOGÍA

Obtención de los licores residuales del proceso de pulpeo Organosolv.

Para obtener los licores del proceso de pulpeo se realizaron cocciones del bagazo integral de la caña de azúcar, procedimiento que se llevó a cabo en un digestor piloto de acero inoxidable con una capacidad de 15 L, diseñado para alcanzar temperaturas mayores a 220°C. Las condiciones de la cocción fueron las siguientes: se agregaron 1000 gramos de materia prima base seca de bagazo integral de la caña de azúcar, la mezcla de una solución de 6000 mL, (50% de etanol 96° y 50% del volumen de agua destilada), se adicionó un catalizador orgánico, (ácido acético 3% del volumen total). La temperatura se mantuvo constante (175°C), por un tiempo aproximadamente de 90 minutos.

Caracterización química básica del licor residual.

Se caracterizaron químicamente los licores residuales del proceso Organosolv, previo al tratamiento biológico, con las siguientes determinaciones: azúcares totales (A.T.), azúcares reductores (A.R.), fenoles totales (F.T.), demanda química de oxígeno (DQO), coloración inicial.

Biorremediación de licores residuales del proceso Organosolv.

El procedimiento de activación y multiplicación de las cepas, se realizó en una campana de flujo laminar previamente desinfectada y cerca de la flama de un mechero Bunsen. Los materiales, y los medios de cultivo que se utilizaron fueron previamente esterilizados.

En tubos de ensaye con un volumen aproximado de 5 mL de medio de cultivo comercial caldo de soya tripticaseína (CST), como medio de enriquecimiento, fueron inoculados con cada bacteria de forma individual a una concentración de 0.5 de la escala de McFarland (equivalentes a 1x106-8 UFC/mL). Se mantuvieron en incubación a 27°C durante 24 horas y 120 rpm para la obtención del inóculo bacteriano. Para el caso de las cepas fúngicas se realizó en medios suplementados (150 ml), con fructuosa 10 g/L, 5 g / L de extracto de levadura, 5 g / L de hojuelas de puré de papa comercial y 5 g / L de peptona. Inoculando 5 discos de cada hongo a evaluar por matraz (250 ml). Se incubaron a 30° C por un periodo de 5 días, filtrando la biomasa y secándola en horno a una temperatura de 60°C. El peso seco fue registrado y se utilizó la producción de biomasa de cada hongo por triplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Caracterización química básica del licor residual.

La caracterización del licor residual obtenido del proceso de pulpeo Organosolv aplicado al bagazo integral de la caña de azúcar, indico una cantidad elevada tanto de azúcares como de compuestos fenólicos (Tabla 2) y lignina. Estos compuestos que presentan una elevada cantidad de demanda química de oxígeno (DQO) y presentan un pH de 3.8.

Tabla 2. Caracterización química básica del licor residual del proceso Organosolv con bagazo integral de la caña de azúcar.

Parámetro	Concentración (g/L)
Azúcares reductores	6.4
Azúcares totales	15.9
Fenólicos totales	3.7
DQO	189
Lignina	25.4

Los valores de azúcares presentes en el licor, se presentan en forma de oligosacáridos y monosacáridos, siendo los principales azúcares: xilosa, arabinosa y glucosa [20]. Para los valores de DQO se presentan por encima de los rangos reportados por otros estudios como efluentes de la industria celulósica, reportando 59.0 g/L [21] y 33.0 g/L [22].

Para determinar el porcentaje de remoción de los compuestos tóxicos y de los carbohidratos consumidos como única fuente de Carbono para el desarrollo bacteriano se realizaron las técnicas experimentales adecuadas para cada una de las determinaciones que se tomaron inicialmente, azúcares totales (A.T.), azúcares reductores (A.R.), fenoles totales (F.T.), demanda química de oxígeno (DQO), coloración inicial y pH, obteniendo así un nivel de remoción. En la figura 3, se muestran los compuestos fenólicos removidos finalmente por cada bacteria.

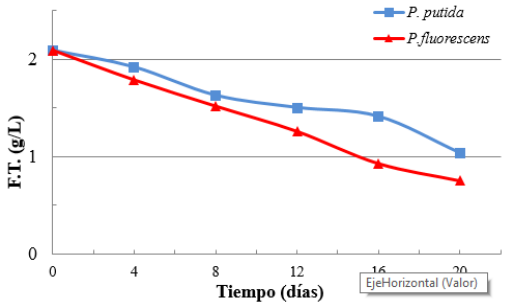


Figura 1. Remoción de compuestos fenólicos totales en relación al tiempo de tratamiento bacteriano.

Donde la concentración inicial de compuestos fenólicos totales es degradada por los microorganismos bacterianos en un periodo paulatino tal, como lo menciona [9], donde indica que los microorganismos después de pasar por un periodo adaptativo pueden ser capaces de degradar los compuestos contaminantes del medio y desarrollarse en el mismo teniendo concentración mínimas del (0.05 a 0.5 g / L) compuesto contaminante, cabe mencionar que para esta evaluación el licor residual, no fue sometido a diluciones y tampoco se adiciono fuente de Carbono, ni fuente de Nitrógeno.

Posteriormente se evaluó el comportamiento de los hongos ligninolíticos en los licores residuales del proceso Organosolv enriquecidos, utilizando fructosa como fuente de Carbono (**FC**), $NH_4(SO_4)_2$ como fuente de Nitrógeno (**FN**) y la combinación de ambos (**FC + FN**). En la figura 2, se observa el porcentaje de compuestos fenólicos removido por cada uno de los microorganismos evaluados, con las 3 diferentes combinaciones de enriquecimiento. Los resultados muestran que *Pleurotus columbinus* fue el hongo que tuvo mejor desempeño ya que removió hasta 52% de los compuestos fenólicos totales presentes.

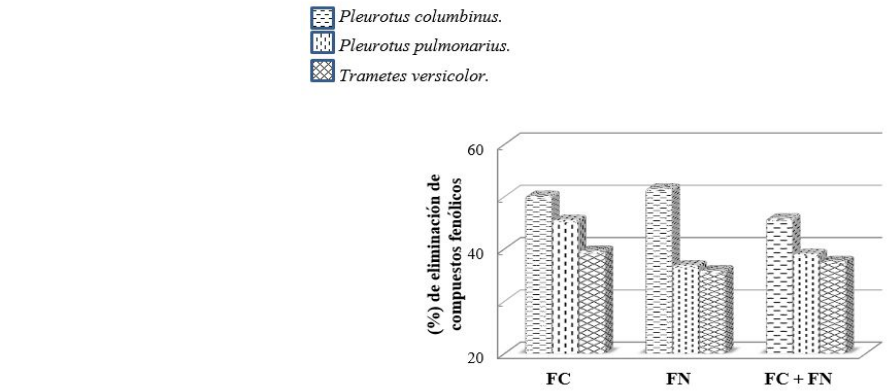


Figura 2. Remoción de compuestos fenólicos totales en licor residual (Ldlig).

Los resultados de la disminución de la DQO de los licores residuales se muestran en la figura 3, donde se observa que el mayor porcentaje de reducción de DQO fue obtenido con el tratamiento enriquecido con fructosa **A)** FC, en particular con el hongo *Pleurotus Columbinus*, donde se obtuvo un 39% de reducción de DQO. En el tratamiento combinado **C)** FC+FN, se observó que las cepas evaluadas llevaron a cabo una disminución de la DQO por encima del 35%.

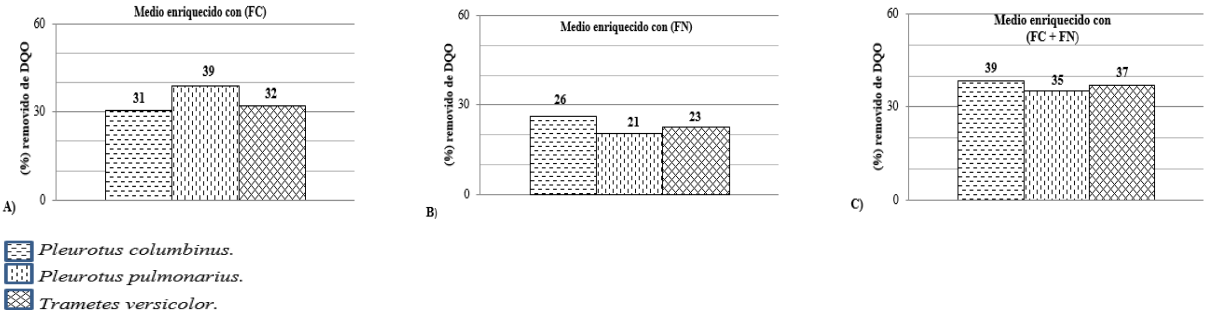


Figura 3. Remoción de DQO en licor residual enriquecido con 2 diferentes nutrientes y la combinación de ambas. A) Fuente de Carbono (FC), B) Fuente de Nitrógeno (FN), C) Combinación de ambas (FC+FN).

Se obtuvo el 71% de reducción en color comparada con la coloración inicial del licor residual sin tratamiento, el hongo *Trametes versicolor*, con la adición de fuentes de Carbono (FC) y Nitrógeno (FN) de manera combinada.

CONCLUSIONES

El tratamiento biológico de los licores residuales del proceso Organosolv, utilizando bagazo de integral de caña de azúcar, aplicando microorganismos bacterianos y fúngicos de manera separada mostro reducciones importantes en el porcentaje de compuestos tóxicos presentes en el licor. Obteniendo una biorremediación significativa por parte de los hongos ligninolíticos.

Así como también se obtuvo una importante reducción en la DQO y un porcentaje alto en la remoción del color por parte del hongo ligninolítico *Trametes versicolor*, en licor residual, adicionando fuentes de Carbono, Nitrógeno y la combinación de ambas.

Por lo que podemos concluir que la aplicación del tratamiento fúngico en licores residuales provenientes del proceso de pulpeo Organosolv aplicando bagazo integral de caña de azúcar, tuvo mayor efectividad que el tratamiento bacteriano, ya que las cepas bacterianas solo lograron disminuir los compuestos fenólicos totales pero no la coloración.

En cuanto a la posibilidad del reciclaje de los residuos generados por la industria azucarera sometidos a un proceso de pulpeo Organosolv, tienen una importante posibilidad de solventarse en gran disposición, mediante la caracterización de cada sistema productivo, ya que existe una amplia diversidad de usos alternativos con perspectivas comerciales. Ya que este material puede ser de gran calidad con múltiples usos, entre ellos la producción de celulosa teniendo un impacto positivo económicamente.

Para el licor residual procedente del proceso de pulpeo Organosolv aplicado al bagazo de caña de azúcar, podrían ser utilizados como fuente de Carbono para diversos microorganismos, ya que cuenta con un alto contenido de carbohidratos.

REFERENCIAS

1. Enkerlin, E.C., Cano, G., Garza R. A., Vogel, E. (1997). Ciencia Ambiental y Desarrollo Sostenible. International Thomson Editores, México D.F. (499-526).

2. Gilarranz, M., Oliet, M., Rodríguez, F., Tijero, J. (1998). Ethanol- Water pulping: Cooking variables optimization. The Canadian Journal of Chemical Engineering. Vol. 76 (2): (253-260).

3. Rodríguez, G. V., Anzaldo H.J., Meza C. J., García G. Y. (2012). Tratamiento de licores residuales del proceso Organosolv con carbón activado para la remoción de compuestos contaminantes. Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C. (94).

4. LaGrega, M., Buckingham, P., Evans, J. (1998). Gestión de residuos tóxicos, tratamiento, eliminación y recuperación de suelos. Ed. McGraw-Hill. Interamericana de España, S.A. (1316).

5. Flores, V. M., González, Y., Manríquez, R., González, R., y Meza, J.C. (2011). Aislamiento de hongos filamentosos con potencial para la biorremediación de vinazas tequileras. XXXII Encuentro Nacional y 1er Congreso Internacional AMIDIQ., 3-6 de Mayo, Quintana Roo, México.

6. Collazos, C. J. (2008). Tratamiento anaerobio de aguas residuales; Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ingeniería, Cátedra Internacional. Bogotá, Colombia (118-135).

7. González, C. M., González, S. E., Machado, B. S., Acevedo, L. (2002). Reducción del consumo de agua y vertimiento de residuos e implementación del pulpeo Organosolv en una fábrica de papel. Centro de Análisis de Procesos. Facultad de química Farmacia. Universidad Central Martha Abreu de Las Villas. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. (102-114).

8. Alexander, M. (1994). Biodegradation and bioremediation. Academic Press, San Diego. (302-306).

9. Reardon, K., Mostler, D., Rogers, J. (2000). Biodegradation kinetics of benzene, toluene and phenol as single and mixed substrates for *P. putida* F1. Biotechnol. Bioeng. 69 (385-400).

10. Timmis K.N. (2002). *Pseudomonas putida*: a cosmopolitan opportunist par excellence. Editorial; Environmental Microbiology, 4; 12 (779-781).

11. Parameswarappa S., Karigar C., Nagenahalli M. (2008). Degradation of ethylbenzene by free and immobilized *P. fluorescens*-CS2. Biodegradation, Vol 19 (1), (137-144).

12. Sgountzos, I., Pavlou, S., Paraskeva, C. y Payatakes, A. (2006). Growth kinetics of *P. fluorescens* in sand beds during biodegradation of phenol. Biochemical Engineering. 30: (164-173).

13. Mucke, I. (1997). History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase–mediator–systems (Lignozym®–process). J. Biotechnology., 53: (193).

14. Kirk, T.K., Yang H.H. (1979). Partial delignification of unbleached Kraft pulp with lignolytic fungi. Biotechnol. Lett. 1: (347–352).

15. Bumpus, J. A., Tien M., Whright D.S., Aust A.D. (1985). Oxidation of persistent environmental pollutants by white rot fungus. Science; 228: (1434–1436).

16. Singh, D.S., Moo-Young, M., Anderson W.A. y Chakrabarty, A., Nigam, P. (1995). Environmental biotechnology: principles and applications; Netherlands: Kluwer Academic Pub. (735-750).

17. Luo, Q., Zhang, X., Wang, H. y Qian, Y. (2005).The use of non-uniform electro kinetics to enhance in situ bioremediation of phenol-contaminated soil, Journal of Hazardous Materials (121):1887-1894.

18. Rodríguez S, Fernández M, Bermúdez RC, Horris H (2003). Tratamiento de efluentes industriales coloreados con Pleurotus spp. Rev. Iberoam. Micol.20: (164-168).

19. Camarero S, Ibarra D, Martínez MJ, Martínez AT (2005). Lignin derived compounds as efficient laccase ediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. Appl. Environ. Microbiol. 71: (1775-1784).

20. Rodríguez, G. (2011). Producción de polihidrocialcanatos (PHA) a partir de los licores residuales del Kenaf, obtenidos del proceso Organosolv. Departamento de Madera, Celulosa y Papel. Universidad de Guadalajara. (28-38).

21. Marina, A., Mosqueda, R., Alonso N. y Rodríguez, R. (2007). Inmovilizado y películas de TiO_2 modificadas con Coloide RuxSey como la nueva alternativa para el tratamiento de aguas residuales de la industria papelera. Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Morelia, Michoacán (25-29).

22. Latorre, A., Malmqvist, A., Lacorte, S., Welander, T., Barceló, D. (2007). Evaluation of the treatment efficiencies of paper mil whitewater's in terms of organic composition and toxicity. Environmental Pollution. Vol. 147 (3); (648-655).

IN SEARCH OF HEALTHY ALTERNATIVES CAJITITLÁN LAKE, USING AS A BIOLOGICAL INDICATOR *Escherichia coli*

(En búsqueda de alternativas saludables para la Laguna de Cajititlán, empleando como indicador biológico: *Escherichia coli*)

Luz Adriana Vizcaíno Rodríguez[a]*+, Daniela Ivett Villavicencio[a], Alejandro Brena Becerril[a], Juan Luis Caro Becerra[a], Ramiro Lujan Godínez[a], María Eugenia Mosqueda Ochoa[a].

[a] Universidad Politécnica de la Zona Metropolitana de Guadalajara.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia:adyvizcaino7@mail.com

Área del Conocimiento: Biorremediación.

ABSTRACT.
Cajititlán Lake, second largest in Jalisco State, is located southeast of Guadalajara, has recurrently environmental conditions that conducive to the death of Loderos fish. In August 2014, the environmental authorities declared environmental emergency in the area, in order to summon Federal and State Institutions to cooperate in solving the problem. Preliminary studies directed by Vizcaino et al., 2013-2014, showed the presence of Fecal Coliforms in the water, which threatens the health of tourists and population. The hypothesis of this paper was: is possible to inhibit the growth of *Escherichia coli* present in the Lake, with the use of essential oils. The study of essential oils, with antimicrobial activity, has been applied in food processing and traditional medicine since ancient times. For that, the objective of this work was: isolate and identify *E. coli* from water samples and inhibit its growth with *Syzygiumaromaticum*, *Zingiberofficinale* ,*Menthapiperita* and *Ocimumbasilicum*essential oils. For the isolation of *E. coli*, was employment: the Most Probable Number Technique of Fecal Coliform (NMP), selective differential media, biochemical tests and Gram stain. Essential oils were obtained by Steam Distillation Technique: from spices and plants. Were employ four replications per treatment, and distilled water as control. The samples were *E. coli* positive, there were: colonies round, concave of 1 mm in diameter, metallic sheen EMB medium, gram negative, positive mobility, fermentation and gas production from glucose. The oil that completely inhibited the growth of the isolated microorganism was *Syzygiumaromaticum*, other treatments produced zones of inhibition of 1 to 2 mm. The main contribution of this work was talk about solutions, not of problem, it´s possible to design biodegradable alternatives to control the prevalence of microorganisms that are part of the ecosystem of the Lake and contribute to the deterioration of the water quality.

Keywords: Lake Cajititlán; *Escherichia coli*; essential oil; *Syzygiumaromaticum.*

CADMIUM REMOVAL BY DEAD AND ACTIVE BIOMASS OF *Trichoderma atroviride*

(Remoción de Cadmio por biomasa inactiva y activa de *Trichoderma atroviride*)

Dianyss Linares Ramírez[a]*, José Roberto Zuñiga Silva[b+], Sebastián González Manrique[c], Martha Barajas Aceves [b], Ma. del Carmen Fajardo Ortíz[a], Refugio Rodríguez Vázquez[b].

[a]Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. Departamento de Biotecnología.
[b]Laboratorio de Compuestos Xenobióticos. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. D.F, México.
[c]Programa de Microbiología Industrial. Universidad de Santander, Bucaramanga, Colombia.

*Autor que presentó el trabajo.

+Autor para correspondencia: zuñiga_jr@me.com

Área del Conocimiento: Biorremediación.

ABSTRACT

The contamination by heavy metal in the environment is increasing on a daily basis. Thus, the presence of cadmium (Cd), lead (Pb) and others in the effluents at high concentration is devastating the ecosystems affecting human health. Therefore, is priority to reduce the concentration of heavy metals in soil and water with alternatives and more ecological methods, such as fungal biosorption. The aim of the work was to evaluate the removal of Cd from aqueous media, using inactive and active biomass of *Trichoderma atroviride*. So, we hypothesized that both biomass have the ability to remove Cd in aqueous media, which can be useful in the treatment of contaminated sites. A YPG (Yeast, Peptone and Glucose) medium was prepared and enriched with 0.125,0.5,0.75 and 1 mM of Cd, the plates were inoculated with 20 µl of *Trichoderma atroviride* spore solution (1 x 10^6), the plates were incubated to measure the 25% metal tolerance. To determine the biomass biosorption in inactive and active biomass, 60 ml of YPG medium with 0.22 mM Cd were added to 250 ml Erlenmeyer flasks. The medium was inoculated with 50 µl of fungal spore solution and incubated for 5 days. The fungal biomass was defined as dry biomass and the residual Cd^{2+} in the culture medium was measured by atomic absorption spectrometry. The results indicate that dead and active biomass has a high metal sorption capacity compared to other fungi. The metal sorption was less than 2 days and there were not significant differences ($p>0.05$) in both treatments, with a 87% Cd^{2+} removal. The removal ability of Cd was up 13 mg Cd^{2+} per mg dry biomass. Cd was efficiently removed by biomass in solution, with a maximum capacity of 12-14 mg g^{-1} .

Keywords: Fungi; Heavy Metals; Sorption; Water

RESUMEN

La contaminación por metales pesados en el medio ambiente está aumentando diariamente. Por lo tanto, la presencia de cadmio (Cd), plomo (Pb) y otros en los efluentes a alta concentración está devastando los ecosistemas que afectan a la salud humana. Por lo tanto, es prioritario reducir la concentración de metales pesados en los suelos y el agua con alternativas y métodos más ecológicos, como la biosorción por hongos. El objetivo del trabajo fue evaluar la remoción de Cd desde medios acuosos, utilizando biomasa inactiva y activa de *Trichoderma atroviride*. Por lo tanto, la hipótesis es que tanto la biomasa activa e inactiva tienen la capacidad de eliminar Cd en medios acuosos, que pueden ser útiles en el tratamiento de sitios contaminados. Un medio YPG (Yeast,Peptone and Glucose) se preparó y se enriqueció con 0.125,0.5,0.75 y 1 mM de Cd, las cajas Petri se inocularon con 20 µl de solución de esporas de *Trichoderma atroviride* (1×10^6), las cajas se incubaron para medir el 25% de tolerancia frente al metal. Para determinar la biosorción de biomasa en la biomasa inactiva y activa, se añadieron 60 ml de medio YPG con 0.22 mM Cd a matraces Erlenmeyer de 250 ml. El medio se inoculó con 50 µl de solución de esporas fúngicas y se incubó durante 5 días. La biomasa fúngica se definió como la biomasa seca y el residual Cd^{2+} del medio de cultivo se midió por espectrometría de absorción atómica. Los resultados indican que la biomasa muerta y activa tiene una alta capacidad de sorción de metal en comparación con otros hongos. La absorción de metales era inferior a 2 días y no había diferencias significativas ($p > 0,05$) en ambos tratamientos, con una eliminación de 87% Cd^{2+}. La capacidad de eliminación de Cd fue hasta 13 mg Cd^{2+} por mg de biomasa seca .Cd fue removido eficientemente por ambas biomasas en solución, con una capacidad máxima de 12 a 14 mg/L .

Palabras Clave: Hongo; Metales pesados, Biosorción; Agua.

INTRODUCCIÓN

La contaminación del ambiente con metales, semimetales y contaminantes orgánicos, se ha convertido en un problema ambiental a nivel mundial, y en especial la contaminación con metales pesados se considera una de las más peligrosas y tóxicas [1].

Existen metales tóxicos, como el Cadmio, Cobre, Mercurio y Zinc, que son constantemente liberados al ambiente desde las actividades humanas, las aguas residuales de industrias que producen pintura, baterías, la erosión de las rocas, etc. Algunos, como el Magnesio y Zinc son micronutrientes esenciales, para la mayoría de los organismos vivos [2]. Sin embargo, cuando las concentraciones de algunos micronutrientes son altas en el ambiente, o cuando no se conoce las funciones biológicas esenciales de los metales y están presentes, por ejemplo: Mercurio, Plomo o Cadmio pueden hacerse tóxicos para el humano y seres vivos. Los efectos tóxicos de los metales se notan en varios procesos, como; la reducción de fijación del nitrógeno, necrosis en seres humanos, irregularidades en la síntesis de enzimas, etc.

Con el impacto de los metales pesados en el ambiente y su acreción a través de la cadena alimentaria han promovido investigaciones dirigidas al desarrollo de alternativas más eficientes y sistemas de purificación de aguas residuales con bajo costo [3]. Los métodos convencionales que se han usado durante varios años para retirar metales pesados disueltos incluyen: precipitación química y separación

de lodos, ósmosis inversa, filtración, adsorción y recuperación por evaporación [4]. Sin embargo, estas técnicas pueden ser muy caras, no factibles y sus propiedades de fijación de metales son en su mayoría no específicas [5]. Estas son las razones por las que se buscan métodos alternativos, uno de ellos es el uso de la biomasa microbiana (inactiva y activa), el cual actualmente está siendo considerado como una alternativa más económica y sustentable [4].La biomasa microbiana puede remover y concentrar una variedad de iones metálicos de soluciones acuosas, la absorción de metales pesados por microorganismos puede ser dividida en dos categorías: Una es conocida como biosorción, que consiste en un metabolismo independiente que une grupos libres cargados negativamente. El otro es un flujo de metales dependiente de energía conocido como bioacumulación [6].
La biosorción es un término que implica el uso de microorganismos para desintoxicar y controlar los contaminantes en el ambiente. Mediante el uso de biomasa microbiana, incluyendo: algas, hongos y bacterias; este método se vuelve una alternativa que ha sido considerada con preferencia antes los métodos tradicionales para remover metales pesados y radionucleidos de soluciones acuosas [7]. De este modo los microorganismos inmovilizan los iones metálicos por medio de la vinculación a sus paredes celulares.

Los hongos son un grupo que cuenta con biosorción versátil, ya que éstos pueden crecer bajo condiciones extremas como: pH, temperatura y disponibilidad de nutrientes, al igual que a una alta concentración de metales [7]. Ha sido posible remover Cd y Pb por eliminación biológica, usando diversas especies de hongos teniendo un 94.47% para Cd, 79.81% para Ni y 99.73% para Pb [8].

Los objetivos de este trabajo son estudiar la tolerancia y evaluar la remoción de Cadmio en un medio acuoso, usando biomasa inactiva y activa de *T. atroviride*. Esta especie de hongo fue elegida para nuestro estudio, debido a que se conoce por estudios previos, que es el más abundante en suelos contaminados analizados [1]. Este hongo a su vez ha sido investigado por su habilidad de crecer en presencia de hasta tres metales pesados : Cobre, Zinc y Cadmio. Este último se eligió, porque es uno de los metales pesados más tóxicos encontrados en lodos y medios acuosos contaminados, y porque es distribuido de manera ubicua en todo el mundo.
Finalmente, el crecimiento y la remoción del metal fueron estudiados bajo diferentes concentraciones de Cadmio, para determinar la máxima captación de Cadmio y estudiar su porcentaje de tolerancia a este.

METODOLOGÍA

1. Preparación de un control del hongo Trichoderma atroviride.

Un control de la especie de hongo del género *Trichoderma atroviride*, fue obtenido del laboratorio de Xenobióticos, Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, del CINVESTAV Zacatenco. Se transfirieron a un medio esterilizado de YPG. Estas muestras fueron refrigeradas a una temperatura de 3°C, después de que la biomasa alcanzó su máximo crecimiento. Esta colonia fue adecuada para usarse en nuestro experimento como recurso.

2. Medición de tolerancia del hongo ante el Cd.

La tolerancia al metal de *T. atroviride* fue determinada midiendo el micelio en cajas Petri**.** La solución patrón fue preparada disolviendo $3CDSO_4*8H_2O$ en agua destilada. Se preparó medio YPG, y se enriqueció con concentraciones de 0.125, 0.25, 0.5, 0.75 y 1 mM de Cd a partir de la solución Stock, estas fueron inoculadas en cajas petri teniendo replicado de cada concentración y posteriormente se adicionaron 20 µl de suspensión de esporas de *T. atroviride* a cada caja. Después se incubaron a 36°C por 7 días con el fin de medir el 25% de tolerancia al metal del hongo ***(Ver Fig.1),*** el cual es conocido como análisis Probit**.**

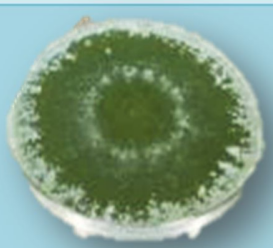
Crecimiento radial del control de Trichoderma atroviride a los 7 días de incubación en medio YPG.	*Crecimiento radial Trichoderma atroviride a los 7 días de incubación en medio YPG con 0.25 mM de concentración de Cd.*
	

Fig.1.Crecimiento radial de T. atroiviride. en medio YPG a siete días de incubación a 36°C para medir el 25% de tolerancia al Cd, en un análisis Probit.

3. Bioacumulación de Cadmio por biomasa activa y no activa de *T. atroviride*.

Para determinar la habilidad de biosorción del hongo se inocularon 50 µl de suspensión de esporas de *T. atroviride* en matraces Erlenmeyer de 250 ml. con 60 ml de medio YPG acuoso previamente esterilizado, y una concentración de 0.22 mM de Cd., los matraces fueron colocados en un agitador a 125 rpm y 34°C. Esto se realizó para el experimento con biomasa activa durante cinco días. Para el caso de biomasa inactiva se realizó el mismo procedimiento tomando 2 g de biomasa inactiva, la cual fue previamente esterilizada a 120°C durante 10 minutos terminando su primer, tercer y quinto día de incubación.

Después de 1, 3 y 5 días de incubación en ambos tratamientos, los matraces fueron filtrados a través de un papel filtro Whatman No.42. El medio filtrado fue usado para determinar la concentración total de Cd. Las muestras de biomasa fueron enjuagadas 2 veces con agua destilada y puestas en una estufa a 60°C hasta obtener un peso constante (48 h). La biomasa fue pesada y definida como biomasa total.

La concentración de Cadmio en el medio acuoso fue medida en un espectro de absorción atómica. La captación del metal fue estimada como la cantidad de metal (mg) por unidad de micelio seco pesado (g) [9]: **q=[(Ci-Ct)/m]V**, donde q=metal captado (mg metal/mg biomasa), Ci=concentración inicial del metal

(mg/l),Ct=concentración final del metal (mg/l), m=cantidad de biomasa total (mg), V=volúmen del medio (ml).

4. Determinación de la eficiencia de remoción.

La siguiente ecuación fue usada para determinar la eficiencia de remoción del metal por el hongo estudiado: **R=[(Po-Pe)/Po)*10**0. En donde R es el porcentaje de remoción del metal por la masa del hongo, Po es la concentración de iones metálicos (ppm) y Pe es la concentración final de iones metálicos en el experimento**.**

Análisis estadístico. Fueron realizados usando el programa Statgraphic, versión 5.1. Analizando la varianza (ANOVA) de un factor, no mostrando diferencia significativa P>0.05.

RESULTADOS

Detección de la Concentración efectiva 25 (CE25) con Cd en *T. atroviride.*

En este presente estudio *T.atroviride.* se observó bajo diferentes concentraciones :0.1 ,0.25,0.5 ,0.75 y 1 mM. de Cd en medio YPG dentro de 5 días de incubación. Los resultados mostraron que este hongo presentó un 25% de tolerancia al metal respecto al control a una concentración de 0.22 mM. de Cd **(Tabla 1).**

Tabla 1.Tasa de crecimiento en medio YPG a diferentes concentraciones de Cd en *T. atroviride*.

		Concentración de Cd (II)					
Días de incubación	n	Control	0.1 mM	0.25 mM	0.5 mM	0.75 mM	1 mM
Uno	3	2.533	2.000	2.200	2.066	1.900	1.700
Tres	3	7.533	5.867	5.033	3.966	3.500	2.900
Cinco	3	8.500	8.300	8.200	8.180	7.733	7.633

n es el número de réplicas por cada concentración, el análisis estadístico se realizó mediante el procedimiento de Probit del paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System) v.9.0 .La CE25 hace referencia a la concentración de un componente antifúngico, es este caso el Cd, que es requerido para inhibir el 25% del crecimiento del hongo. Se midió como variable respuesta el diámetro de la colonia.

Capacidad de acumulación de Cd (II) por *T. atroviride*.

El crecimiento de la biomasa inactiva y activa, seca aumentó con el paso del tiempo **.**Los resultados indican que el valor más alto de biomasa fue el del control, mientras que el valor más bajo de crecimiento de biomasa fue guardado con las muestras de biomasa muerta de *Trichoderma a.* ,notándose hasta un 45% en su disminución respecto al control.

Capacidad de captación de Cd (II) por *T. atroviride*.

El resultado más importante fue el valor de la remoción de Cd por la biomasa inactiva, presentando un valor de 2.8 mg de Cd/g de biomasa, siendo una diferencia de 0.4 no significativa respecto al tratamiento con biomasa activa. Esto se debe a que la biomasa inactiva ofrece ciertas ventajas sobre las células vivas , ya que estas últimas son más sensibles a las concentraciones de iones metálicos.**(Figura 2).**

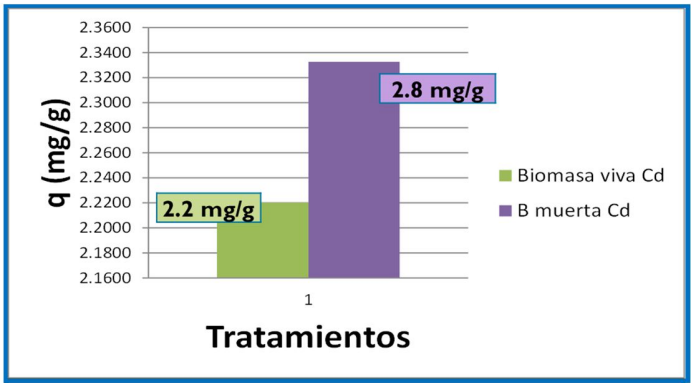


Figura 2. Capacidad de biosorción de Cd por *T.atroviride* con biomasa activa e inactiva.

Capacidad de remoción de Cd de *T. atroviride.*

Los resultados muestran que *T.atroviride* tiene gran habilidad en remover los iones de Cd superando un 80% (2.8 mg/g) basados en peso seco de la biomasa del hongo en remoción para ambas biomasas (Fig 3).

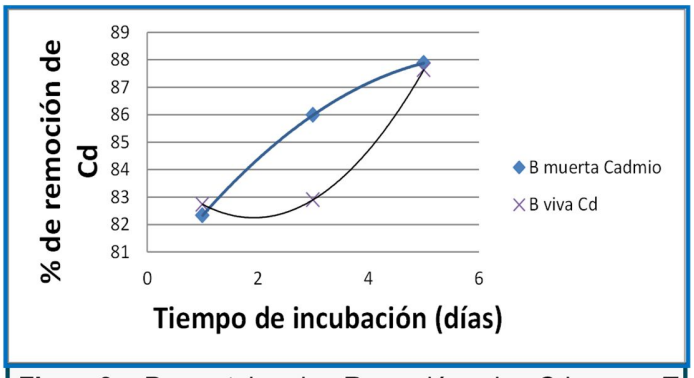


Figura3. Porcentaje de Remoción de Cd con *T atroviride* en un medio líquido a diferentes días de incubación

DISCUSIONES

Efecto de un pH alto.

El pH es un factor importante en el proceso de remoción biológico de metales pesados . Este proceso dependió de diversos grupos funcionales de la superficie de la pared celular del hongo y el valor del pH en el medio acuoso, el cual tuvo un rango de valores entre 5-7 para ambos tratamientos. Al principio del experimento en la absorción del Cd en el medio acuoso se tuvo un incremento de pH. Este fenómeno puede ser justificado de acuerdo a la liberación de H^+ desde algunos componentes de las biomasas en solución que es un tipo de cambio de iones entre H^+ y los iones metálicos. En general se obtuvo una buena absorción de Cd debido a un pH alto (5-9),ya que más grupos funcionales, como carboxílicos y grupos fosfatos tenían cargas negativas y por lo tanto su habilidad de adsorción de iones metálicos fue incrementada, dando como resultado una carga positiva, estos resultados coinciden con estudios previos [9].

Efecto de la concentración inicial de Cd en la capacidad de remoción del metal.

Nuestros datos demuestran la habilidad de remoción de Cd en un medio acuoso, tanto para biomasa activa como en biomasa inactiva. Diversos autores sugieren que una alta concentración de metal en el medio trae consigo una importante fuerza motriz a superar todas las resistencias en la transferencia de masa entre la solución con el metal y la pared celular [10]**.** El proceso de remoción de Cd fue rápido, teniendo al primer día un 80% de remoción de Cd en ambos tratamientos **(Fig 3),** esto coincide con otros autores, ya que se consideran que en las primeras horas de contacto del medio con el hongo la remoción es rápida, y posteriormente se establece y permanece constante; eh aquí porque se considera que el mecanismo de biosorción fue por intercambio iónico. Debido a que el proceso se dividió en dos etapas: la primera tuvo un rápido proceso de remoción en pocas horas ,y la segunda etapa que fue mucho más lenta y se estableció un valor alrededor de 87% de remoción de Cd en ambos tratamientos, permaneciendo más constante a partir del tercer día.

Capacidad de Captación de Cd(II)

La alta tolerancia y capacidad de captación de Cd observada en *T. atroviride* pueden ser atribuidas a que el hongo fue obtenido previamente de una muestra de lodo conteniendo niveles de metal. Es conocido que los microorganismos aislados de ambientes naturales contaminados con metales pesados a menudo tengan una tolerancia a múltiples contaminantes, porque ellos han sido adaptados a estos ambientes. En nuestro caso se tiene un valor de captación de Cd por el hongo arriba de 2 mg metal/g biomasa en ambos tratamientos **(Figura 2).**; siendo este equivalente a otros estudios con mayor concentración de Cd [1].Otro factor importante que cabe resaltar es el uso de la glucosa en el medio de cultivo, ya que se sabe por estudios previos, que esta incrementa la captación de los iones metálicos. Estos trabajos reportaron que la estimulación en la captación del metal por la glucosa es el resultado de mejorar el transporte en la membrana de la síntesis de proteínas y/o incrementar la fuerza de los protones.

Biomasa activa vs inactiva

Debido a que en el análisis estadístico no se encontró ninguna diferencia entre el tratamiento con biomasa activa y el tratamiento con biomasa inactiva, se confirma la hipótesis; ya que se puede hacer uso de ambos tratamientos para la remoción de Cd en sitios contaminados con ≥0.22 mM de Cd. Se hace la recomendación de usar el tratamiento de biomasa inactiva, ya que genera menor costo, no existe mucha complejidad en los procesos metabólicos entre el hongo y metal, y es un proceso más rápido.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos muestran que las biomasas fúngicas de *T.atroviride* analizadas remueven eficientemente Cd (II) en solución acuosa. Por lo que procesos de biosorción de metales pesados como este, particularmente aquellos que usan hongos / levaduras, podría tener una gran aplicación en México, ya que es un país que cuenta con una industria de fermentación importante (ácido cítrico, levadura de panificación, cerveza, vinos, antibióticos, etc) que pudiera promover que la biomasa microbiana sea utilizada como biosorbente. La aplicación de esta tecnología para remover metales pesados, purificar aguas residuales y recuperar metales preciosos presenta además un gran potencial; ya que las biomasas son naturales, se pueden obtener en grandes cantidades, son más económicas que los métodos convencionales y remueven más selectivamente los iones metálicos en diferentes soluciones acuosas.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a las Dra. Refugio Rodríguez Vázquez por su ayuda en la revisión del abstract en inglés y en extenso, y por su apoyo en el laboratorio, a la Dra. Martha Barajas por su apoyo en la medición de la concentración de Cd en el espectrofotómetro de absorción atómica, a la Dra. Ma. Del Carmen Fajardo por la revisión del abstract , al Maestro Roberto Zuñiga por su apoyo incondicional en el proyecto ,al Lic. Yovany Cuetero por su apoyo moral, y la Psic.Susana Ramírez Sibaja por su apoyo moral y económico a este proyecto.

REFERENCIAS

[1]E.López Errasquín,C.Vázquez. (2001).´´Tolerance an uptake of heavy metals by *Trichoderma atroviride* isolated from sludge´´,Chemosphere,50 (2003):137-143.

[2]Akar T.Tunali S. (2006).´´Biosorption characteristic of Aspergillus flavus biomass for removal of Pb (II) and Cu(II) ions from an aqueous solution´´,Bioresorurce Technology,97:1780-1787.

[3]Akhtar M N,Mohan PM. (1995).´´Bioremediation of toxic metal ions from polluted lake waters and industrial effluents by fungal biosorbent´´.Current Science,69:1028-1030.

[4]Anand P,Isar J,Saran,Saxena R K. (2006).´´Bioacumulation of copper by *Trichoderma viride*´´.Bioresource Technology,97:1018-1025.

[5]Alguacil,F.J;Merino,Y.(1998).´´Biotratamiento de contaminantes de origen inorgánico´´.Rev.Metal.Madrid.34,428-436.

[6]Gadd G M. (1993). ´´Interactions of fungi with toxic metals´´.The New Phytologist,124:25-60.

[7]Hafez N,Abdel-Razek A S (1997).´´Accumulation of some heavy metals on Aspergillus flavus´´.Journal of Chemical Technology and Biotechnology,68:19-22.

[8]Harzin H.(2010).´´The study of bacteria, fungi and other microorganisms for the treatment of heavy metals and petroleum hydrocarbons from water and environment.Proceding of third Natio Conf Environ Health.

[9]Xiezhi Y;Ming HM. (2005). ´´Earthworm-mycorrhiza interaction on Cd uptake and growth of ryegrass´´.Soil Biol Biochem.37:195-201.

[10]Nur Liyana;Soon Guan. (2010).´´Tolerance and biosorption of cooper (Cu) and lead (Pb) by filamentous fungi isolated from a freshwater ecosystem´´.Journal os environmental sciences,23(5) 824-830.

DEGRADATION OF AMPICILLIN AND CHLORAMPHENICOL BY BASIDIOMYCETES FUNGI

(Degradación de ampicilina y cloramfenicol por hongos basidiomicetes)

Víctor Carpanta Capistrán[a*], Alexis Joavany Rodríguez Solís[b], Ma. Lourdes Acosta-Urdapilleta[b], Elba Cristina Villegas Villarreal[b+]

[a]Licenciatura en Biología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Av. Universidad 1001, Cuernavaca, Morelos 62210 México.
[b]Laboratorio de Estructura-Función e Ingeniería de Proteínas, Centro de Investigación en Biotecnología, Autónoma del Estado de Morelos. Av. Universidad 1001, Cuernavaca, Morelos 62210 México.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: elbav@uaem.mx

Área del Conocimiento: Biorremediación

ABSTRACT
A priority of humanity is to maintain global health, using tools such as, pharmaceutical or medicinal drugs. Among them antibiotics are substances of variable structure produced by different organisms such as, fungi and bacteria, they have a mode of action that falls within one of four mechanisms. Three of them are involve in the inhibition or regulation of enzymes responsible of cell wall biosynthesis, nucleic acid metabolism or protein synthesis. The fourth one involves the disruption of the whole membrane structure. Cellular functions targeted by antibiotics are most active in multiplying cells. Antibiotics have been used in several industries such as food, livestock, agriculture and human health despite the strong regulations around the world they have been misused, for instance in self-medication, unfinished treatments, animals overexposure, fruits, vegetables and crops, which have contributed to increase antibiotics multi-resistant bacteria and environment pollution of soil and wastewater. Antibiotics are stable in the environment specially those with aromatic rings in their structures as: enrofloxacin, ciprofloxacin, amoxicillin, ampicillin and chloramphenicol. Basidiomycetes fungi produce enzymes able to degrade aromatic compounds. The objective of this work was to determine the ability of the best basidiomycetes out of five to degrade ampicillin and chloramphenicol in liquid and solid media. Growth curves for each strain were conducted in the absence and presence of antibiotics, the best strains were selected after statistical analysis performed with DCA and Tukey. The degradation in minimal medium with/without antibiotics was followed by HPLC. Growth curves showed that *Trametes versicolor* and *Lentinula edodes* grew well in solid and liquid media without been affected by antibiotic presence. However, *Trametes versicolor* produced higher amount of biomass in liquid medium and was able to degrade up to 15 ppm of ampicillin or chloramphenicol in 8 days. *Trametes versicolor* can be used to remove antibiotics in wastewater systems.

Keywords: bioremediation of antibiotics, basidiomycetes fungi, liquid media.

FLUORINE REMOVAL BY CHEMISTRY COPRECIPITATION

(Remoción de flúor por coprecipitación química)

Sergio Hernández Martínez[a*+], Lidia Olvera Ávila[b]

[a] Depto. de Química Facultad de CCQQ, Universidad Autónoma de Guadalajara. Avenida Patria 1201, Villa Universitaria Zapopan, Jalisco. México. CP 45129
[b] Jefe de Departamento de Química Aplicada en Laboratorio CIDI-UAG

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: Sergio.hernandez@edu.uag.mx.

Área del conocimiento: Biorremediación.

ABSTRACT
The fluorine is a necessary element for the human being, inside certain limits of concentration. Neverthless, if these concentrations are exceeded, the fluorine presents certain affections into health detriment. Some common affections are dental fluorosis, skeletal fluorosis, and also, produces disorders over reproduction, neurological and endocrine systems. CEAS (State Water Council), a regulatory organism in México, is concerned about fluorine concentration ang it monitors that the flourine limit does not reach 1.5 ppm according to Norm Official Mexican NOM-127-SSA1-1994. The following study was developed to evaluate conditions of treatment to remove the fluorine and to reduce its concentration to obey the regulation imposed by the NOM-127. Samples were treated following a methodology of coagulation – floculation, mixing salts and floculants to promote the increasing particle size, which causes the precipitation. Experiments were performed using the test of jars. The objective was to obtain the optimal dose for flourine removal. The determination of flourine concentration was measured with an ion selective electrode. The sample selected is representative of well water, which is incorporated to municipal network. The initial fluorine concentration was 3.93 ppm, a value superior than the limit permitted by NOM-127-SSA1-1994. Within doses used it was possible to find a optimal combination of salts and flocculants to decrease fluorine content below the superior limit established by the NOM-127. In conclusion, it was applied a practical and economical methodology able to reduce flourine content in potable water, which can be used as a base to develop an automated process of control.

Keywords: Flourine removal, flocculation, coagulation, precipitation.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

ENZYMATIC ACTIVITY MEASUREMENT AND CHARACTERIZATION OF PHYSICALLY ADSORBED HRP ENZYME ON HDPE/AGAVE FIBER COMPOSITES

(Medición y caracterización de la actividad enzimática de la enzima HRP adsorbida físicamente sobre composites espumados de HDPE/fibra de agave)

Valeria Figueroa Velarde[a*], Mayra García Sánchez[b], Orfil González Reynoso[a], Jorge Robledo Ortiz[b], Luis Carlos Rosales Rivera[a+]

[a] Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco.
[b] Departamento de Madera, Celulosa y Papel, Universidad de Guadalajara, Jalisco.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: lcrr33@hotmail.com

Área del Conocimiento: Biorremediación.

ABSTRACT
Reactive dyes are manufactured to be stable under special conditions, making them an environmental problem when they contaminate bodies of water, due to their toxicity and/or capacity to block the sunlight through water thus inhibiting plant photosynthesis. Enzymatic degradation can be an alternative to the use of physicochemical treatments for decomposing dyes dissolved at different concentrations in water. In the present work, degradation of reactive dyes is performed using physically adsorbed enzymes onto a foamed composite that incorporates natural agave fibers. Horseradish peroxidase (HRP) enzyme was adsorbed physically onto high density polyethylene (HDPE)/Agave fiber composites, characterized in terms of enzymatic activity and adsorption physicochemical conditions. Finally, the modified composites were tested for degradation of a reactive dye. Foamed composites were fabricated using a 30% (w/w) agave fiber in a matrix of HDPE. Azodicarbonamide was used as foaming agent and zinc oxide as catalyst. The obtained platform was pelletized and used without further modifications. Several physicochemical parameters were analyzed in order to obtain the best enzymatic activity of the HRP composites. In terms of immobilization, the best performance was obtained using 120 µg/mL of HRP in acetate buffer at pH 4.5. Regarding enzyme stability, values of 30% of activity were maintained after 10 cycles of reaction. Finally, a reactive dye (blue 49) was degraded to a 20% of its initial color after 40 minutes of reaction under continuous stirring.

Keywords: Enzymatic degradation, Composites, Natural fibers, Reactive dyes.

RESUMEN
Los colorantes reactivos son fabricados para ser muy estables para afrontar una gran cantidad de condiciones fisicoquímicas, haciéndolos un problema medioambiental cuando estos son desechados en cuerpos de agua, debido a su alta toxicidad y/o capacidad de bloquear el paso de la luz a través del agua inhibiendo la fotosíntesis de plantas acuáticas. La degradación enzimática representa una alternativa respecto al tratamiento fisicoquímico de efluentes contaminados con colorantes, ya que pueden degradarlos a distintas concentraciones sin presentar inhibición o saturarse. En este trabajo, la degradación de colorantes reactivos se realizó mediante la adsorción física de la enzima HRP sobre

composites espumados que incorporan fibra de agave. Específicamente, la enzima peroxidasa del rábano picante fue adsorbida físicamente en materiales compuestos de polietileno de alta densidad (HDPE)/Fibra de agave. Las enzimas inmovilizadas fueron caracterizadas en términos de su actividad enzimática y con este parámetro fueron optimizadas las condiciones fisicoquímicas de adsorción. Finalmente, los composites modificados fueron usados en la degradación de un colorante reactivo. Los materiales compuestos espumados fueron fabricados usando 30% (w/w) fibra de agave en una matriz de HDPE. La azodicarbonamida fue usada como agente espumante y el óxido de zinc como catalizador. El material espumado fue pelletizado al salir de la extrusora y usado sin ninguna otra modificación. Diversas condiciones fisicoquímicas fueron probadas para conseguir una mayor actividad enzimática. En términos de inmovilización, el mejor rendimiento fue obtenido usando 120 μg/mL de enzima en buffer de acetato a un pH de 4.5. Con respecto a la estabilidad de la enzima adherida, fue posible mantener hasta un 30% de la actividad inicial después de 10 ciclos de reacción y lavados. Por último, el colorante reactivo azul 49 fue degradado hasta un 20% de su color inicial después de estar en contacto por 40 minutos con enzima adsorbida sobre pellets de material compuesto y en agitación continua.

Palabras Clave: Degradación enzimática, Materiales compuestos, Fibras naturales, Colorantes reactivos.

INTRODUCCIÓN

Los colorantes comerciales son un ejemplo de compuestos químicos que representan un gran problema medioambiental en nuestros días. Clasificados como productos tóxicos y, algunos de ellos, como mutagénicos, son usados en la industria, sobre todo en la del procesado y la impresión textil. Debido a la escasa regulación medioambiental existente en algunos países, estos compuestos son desechados directamente en cuerpos de agua, llegando a afectar a los organismos acuáticos que los habitan. Su toxicidad y su capacidad de bloquear el paso de la luz solar en medios acuosos a bajas concentraciones, inhibiendo así fotosíntesis de plantas acuáticas, los hace candidatos idóneos para ser removidos de aguas residuales usando procesos amigables con el medio ambiente[1].

Una alternativa ecológica, económicamente viable y sustentable, capaz de sustituir los métodos tradicionales en el tratamiento de aguas residuales es la degradación enzimática. Este método permite convertir compuestos químicos complejos de una manera selectiva en estructuras más sencillas, usando enzimas provenientes de microorganismos, hongos y plantas[2]. En el caso de las descargas residuales es común el uso de enzimas oxidantes como las peroxidasas, *e.g.* manganeso peroxidasas (MNP), lacasas y peroxidasas del rábano picante (HRP), más comúnmente usadas en la degradación de compuestos colorantes azo[3].

Para llevar a cabo la degradación enzimática es necesario considerar la forma en que se usarán las enzimas. Su uso directo en solución dificulta en gran medida su recuperación y reutilización, haciéndolo un proceso económicamente inviable. Una alternativa es el uso de soportes sólidos, ya que brindan no solo una protección física a las biomoléculas sino que además aumentan su estabilidad y hacen posible la recuperación de las mismas. La actividad enzimática depende en una gran medida en la manera en que son adheridas a estos soportes. De una manera general, es posible clasificar la inmovilización de biomoléculas en métodos físicos y químicos[4].

Entre los soportes sólidos que se pueden usar destaca el uso de las fibras naturales como pino, henequén, yute, coco etc., solas o mezcladas con soportes poliméricos para inmovilizar enzimas directamente[5]. Además, mediante el uso de este tipo de soportes se ha demostrado la presencia de

una mayor superficie de contacto y adherencia de enzimas, bacterias y otros materiales, además de modificar las propiedades mecánicas y morfológicas de las matrices poliméricas. Recientemente, su uso como soporte de polisacáridos ha quedado demostrado en la remoción de soluciones de Cr(VI) usando recubrimientos de quitosana y en la inmovilización de la bacteria *Pseudomonas putida* en la degradación de compuestos químicos como benceno, tolueno y o-xileno[6].

METODOLOGÍA

Extrusión de pellets

Los pellets de HDPE fueron fabricados usando un extrusor corotativo de doble husillo Leistritz (Leistritz, NJ, EUA) de 27 mm con un diagrama de temperatura de 7 zonas (entrada de material → dado de extrusión) (150, 180, 170, 160, 160, 150, 130°C). Se usó un alimentador exterior de velocidad controlable con una mezcla de polietileno de alta densidad (HDPE) junto con fibras de agave limpias (malla 50) a 5% (w/w), además de 0.5% (w/w) de azodicarbonamida (ACA) como espumante y 0.2% (w/w) de óxido de zinc como catalizador.

Inmovilización de la enzima HRP

La enzima HRP tipo VI (Sigma-Aldrich, México) se inmovilizó sobre 0.2 g de pellets a diferentes concentraciones en solución (30, 60, 90, 120 y 200 μg/mL) usando buffer 50 mM de acetato de sodio, pH 4.0. Se realizaron estudios para determinar el tiempo (15, 30, 45, 60 y 75 min) y temperaturas (15, 25, 55, 65°C) óptimos de inmovilización, así como buffers de acetato, de fosfatos salinos (PBS) y tris(hidroximetil)aminometano (Tris). Los pellets fueron lavados tres veces con 5 mM de acetato de sodio, pH 5.0 para remover las enzimas no adsorbidas de la superficie de los pellets espumados. A menos que se especifique lo contrario las condiciones que se usaron fueron de 90 μg/mL de HRP, a 25°C, pH de 4.5 en buffer de acetato y 40 minutos en agitación continua.

Medición de la actividad enzimática

La actividad enzimática se midió usando una concentración de 0.36 mM ABTS (ácido 2,2'–azino–bis–(3–etillbenzotiazolin–6–sulfónico)), junto con 6 mM de H_2O_2 disuelto en buffer 50 mM de acetato de sodio, pH 5.0. Un volumen de 5 mL de la solución anterior se puso junto con pellets con enzimas adsorbidas y lavados. La actividad enzimática fue medida durante 3 minutos, midiendo la concentración del compuesto producido a 420 nm (ε_{420} = 3.6 x10^4 M^{-1} cm^{-1}) usando un espectrofotómetro Genesys 10s UV-Vis (Thermo Scientific, MA, EUA). Una unidad de actividad enzimática (AU) es la necesaria para convertir 1 μmol de ABTS por minuto a 25°C y pH 5.0.

Degradación enzimática del colorante reactivo azul 49

La degradación enzimática del reactivo colorante azul 49 (70 μg/mL) se realizó midiendo la disminución en la absorbancia a 595 nm. Se realizó a un pH de 5 en buffer de acetato y con la presencia de H_20_2 a una concentración de 0.25 mM. Se realizaron diversos blancos en donde no se incluían el substrato y la enzima inmovilizada para determinar qué cantidad se degradaba o se adsorbía en el pellet sin la presencia de enzima.

RESULTADOS

Efecto de las condiciones fisicoquímicas sobre la actividad enzimática

Diversas condiciones fisicoquímicas fueron usadas para caracterizar la adsorción física y optimizar las condiciones de inmovilización de la enzima HRP adsorbida sobre los materiales compuestos espumados. La concentración de HRP usada fue la primera condición modificada, en la fig. 1 se puede observar que el incremento en la actividad enzimática mantiene una tendencia lineal con respecto a la concentración de enzima en solución.

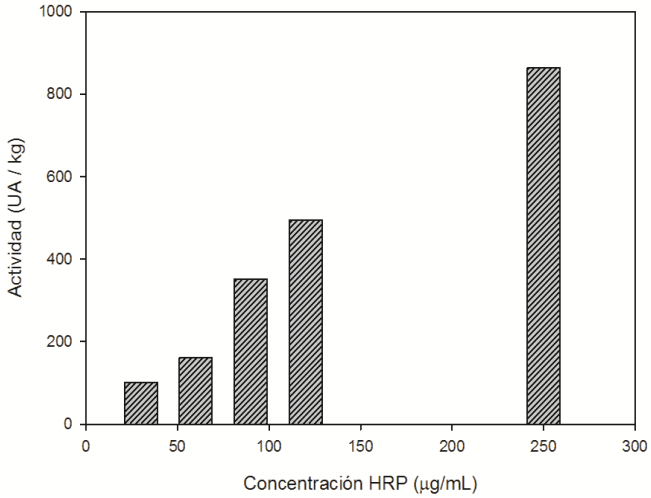


Figura 1.- Actividad de la enzima inmovilizada HRP para distintas concentraciones en solución.

En cuanto al tiempo de contacto de la enzima con el pellet de material compuesto, el mejor tiempo para estar en contacto fue de 40 min a 25°C y usando un buffer de acetato 50 mM, pH 4.5, como se puede observar en la fig. 2.

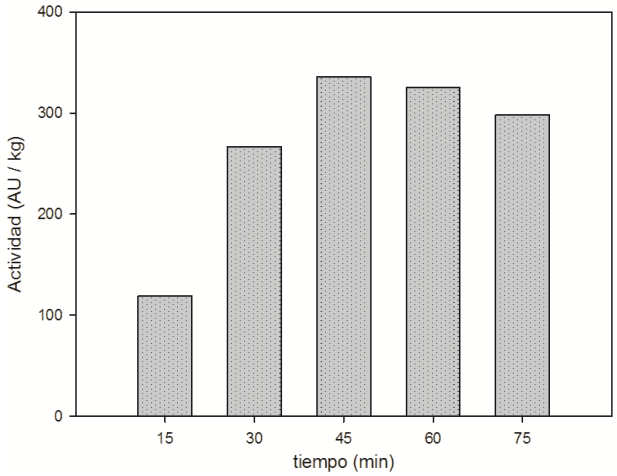


Figura 2.- Actividad de la enzima inmovilizada HRP para distintos tiempos de contacto.

La temperatura es un factor muy importante a la hora de inmovilizar una enzima, altas temperaturas pueden degradar la enzima rápidamente y por ello es importante verificar que temperatura es la más óptima para realizar una inmovilización, como se puede ver en la fig. 3 la mayor actividad fue conseguida para 25°C.

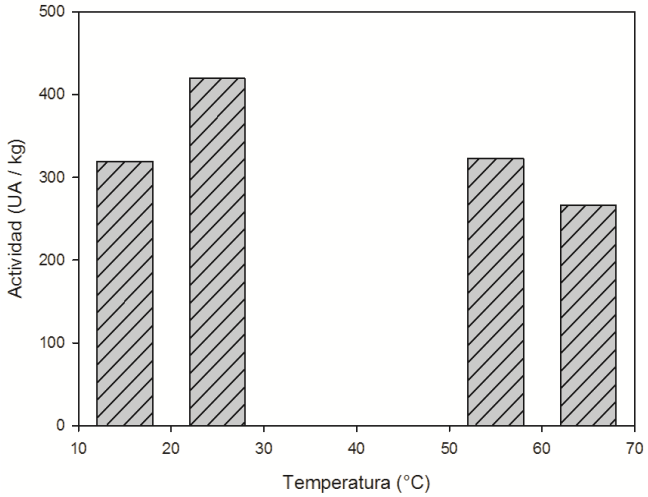


Figura 3.- Actividad de la enzima inmovilizada HRP a diferentes temperaturas.

Finalmente distintos buffers y valores de pH fueron usados para mejorar las condiciones de inmovilización. Tres distintos buffers fueron probados (acetato, fosfato salino y tris), los resultados de las pruebas están resumidos en la fig. 4.

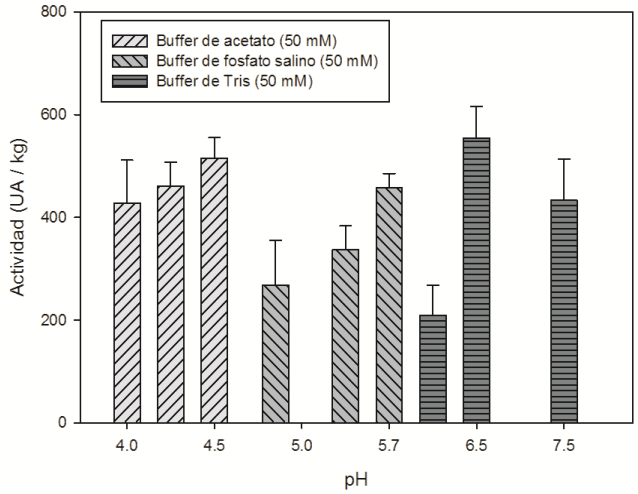


Figura 4.- Actividad de la enzima HRP a diferentes valores de pH y para diferentes soluciones buffer.

Degradación enzimática del colorante reactivo azul 49

La degradación de un colorante reactivo azo (Azul 49) fue llevada a cabo usando condiciones similares para la enzima HRP en solución y la enzima adsorbida físicamente. En la fig. 5, se pueden observar las curvas de degradación del colorante y los blancos que fueron usados.

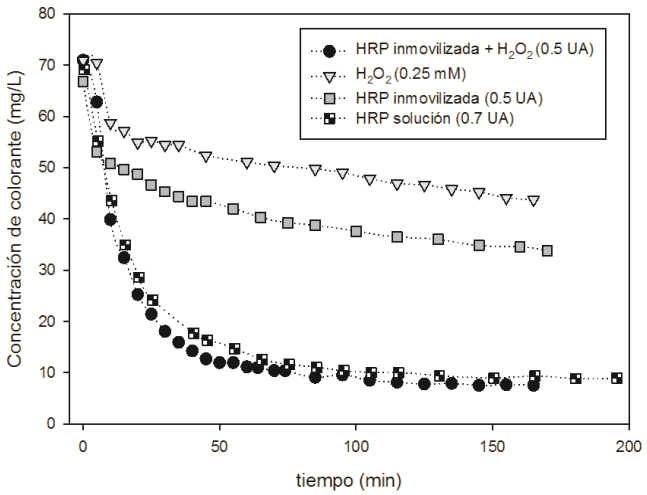


Figura 5.- Degradación del colorante reactivo azul 49 usando enzima HRP inmovilizada y en solución.

DISCUSIONES

La cantidad de enzima adsorbida es un parámetro con el cual se comenzó a optimizar nuestro sistema, debido a los valores usados no fue posible estimar si esta cantidad de enzima es suficiente para ocupar todos los espacios del pellet o si está ocurriendo la formación de multicapas de enzimas, es necesario realizar esta comprobación aumentando la concentración con la que se realiza la inmovilización de la enzima HRP. Por otra parte el tiempo de inmovilización para la enzima tuvo un máximo a 40 minutos y después descendió a mayores tiempos de inmovilización, aquí faltaría comprobar si es debido a la formación de multicapas de enzima adsorbida en la superficie o si es debido a otro fenómeno.

En el caso de la temperatura de inmovilización esta ocurrió como era esperado debido a que a mayores temperaturas la enzima HRP sufre una degradación y esta se inactiva conforme se va aumentando la temperatura[7]. El valor del pH puede afectar de distintas maneras la inmovilización de la enzima debido a la presencia de múltiples isoenzimas para la enzima HRP, y como se comprueba con las mediciones del potencial zeta, la carga superficial se va haciendo mucho más negativa al aumentar el pH de la solución sin embargo es necesario determinar la carga de los pellets para poder explicar de una mejor manera este comportamiento.

Finalmente se llevó a cabo la degradación de un colorante reactivo y se comparó esta degradación con la enzima en solución. Fue posible degradar para un hasta un 90% de la concentración del colorante con una menor cantidad para la enzima inmovilizada, sin embargo este valor es debido no solo a la degradación hecha por la enzima HRP sino también por la adsorción del pellet que necesita ser comprobado realizando más experimentos.

CONCLUSIONES

Mediante el uso de composites espumados de polietileno reciclado y fibra de agave, fue posible llevar acabo la inmovilización de la enzima peroxidasa del rábano usando la adsorción física en la superficie de los pellets. Se optimizaron las condiciones fisicoquímicas de la inmovilización como lo fue la temperatura, pH, concentración y tiempo de inmovilización. Se comprobó que es posible usar la enzima HRP para la degradación de un colorante modelo (Azul 49), y se comparó la degradación de la enzima inmovilizada con la enzima libre en solución obteniéndose valores muy similares en torno al 90%, usando 45 minutos de reacción. Es necesario realizar más experimentos en la parte de la degradación y cuantificar por separado las contribuciones de la adsorción que lleva acabo el pellet, así como realizar los experimentos para una mayor cantidad de colorante y diferentes concentraciones de substrato.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Universidad de Guadalajara por su apoyo para la realización de este trabajo.

REFERENCIAS

[1] M. Solís, A. Solís, H. I. Pérez, N. Manjarrez, and M. Flores, “Microbial decolouration of azo dyes: A review,” *Process Biochem.*, vol. 47, no. 12, pp. 1723–1748, Dec. 2012.

[2] M. T. Moreira, I. Mielgo, G. Feijoo, and J. M. Lema, “Evaluation of different fungal strains in the decolourisation of synthetic dyes,” *Biotechnol. Lett.*, vol. 22, no. 18, pp. 1499–1503, Sep. 2000.

[3] S. M. A. G. Ulson de Souza, E. Forgiarini, and A. A. Ulson de Souza, “Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme horseradish peroxidase (HRP).,” *J. Hazard. Mater.*, vol. 147, no. 3, pp. 1073–8, Aug. 2007.

[4] M. M. F. Choi, “Progress in Enzyme-Based Biosensors Using Optical Transducers,” *Microchim. Acta*, vol. 148, no. 3–4, pp. 107–132, Oct. 2004.

[5] R. O. Cristóvão, S. C. Silvério, A. P. M. Tavares, A. I. S. Brígida, J. M. Loureiro, R. a R. Boaventura, E. a Macedo, and M. A. Z. Coelho, “Green coconut fiber: a novel carrier for the immobilization of commercial laccase by covalent attachment for textile dyes decolourization.,” *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 28, no. 9, pp. 2827–38, Sep. 2012.

[6] J. R. Robledo-Ortíz, D. E. Ramírez-Arreola, C. Gomez, O. González-Reynoso, and R. González-Núñez, “Bacterial immobilization by adhesion onto agave-fiber/polymer foamed composites.,” *Bioresour. Technol.*, vol. 101, no. 4, pp. 1293–9, Feb. 2010.

[7] Q. Chang and H. Tang, “Immobilization of horseradish peroxidase on NH2-modified magnetic Fe3O4/SiO2 particles and its application in removal of 2,4-dichlorophenol.,” *Molecules*, vol. 19, no. 10, pp. 15768–82, Jan. 2014.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

SCREENING OF FUNGAL LIGNINOLYTIC ENZYMES IN NATIVE MACROMYCETES FROM VERACRUZ, MEXICO

(Screening de enzimas ligninolíticas fúngicas en macromicetos nativos de Veracruz, México)

Wilberth Chan-Cupul*[a+], Gabriela Heredia-Abarca[b], Refugio Rodríguez-Vázquez[c].

[a] Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Colima, A. P. 36 Autopista Colima-Manzanillo km 40, C. P. 28100, Tecomán Colima, México.
[b] Instituto de Ecología A. C. Carretera Antigua a Coatepec 351, El Haya, C.P. 91070, Xalapa Veracruz, México.
[c] Centro de investigación y de estudios avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, A. P. 14-740, Col. San Pedro Zacatenco, C.P. 07360, México D.F.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: wchan@ucol.mx

Área de conocimiento: Biología de Recursos Naturales

ABSTRACT
Fungal diversity in Mexico has been estimated in 140,000 and 200,000 species. However, less than 10% have been studied. Regarding to macromycetes only have been described 4,000 species. The magnitude of fungal species richness by State is still far from having a representative knowledge. However, Veracruz State has the largest number of species described, having registered 1,517. The exploration of mycological richness in search of strains with potential for ligninolytic enzymes production, which have biotechnological applications, is a priority activity at the continuing biodiversity loss of local ecosystems. Therefore, the objective of this study was to isolate and evaluate qualitatively and quantitatively the ligninolytic enzyme activities in native macromycetes. Seventy isolates were made and 41 showed laccase activity in the qualitative assessment. Highlighting in the qualitative assessment the *Trametes maxima* SM9, *Pycnoporus sanguineus* ACT1 and *Daedalea elegans* PM7 strains were chosen to evaluate the laccase and manganese peroxidase (MnP) activities in the liquid culture media: Bose, Koroljova and Sivakumar, and in the agroindustrial waste: wheat straw, sugar cane bagasse and pine sawdust. In Sivakumar culture medium was obtained the highest laccase and MnP activities; *Trametes maxima* showed the highest values for laccase (9,121.8 U/mg of protein) and MnP (477.9 U/mg of protein) activities. In second term *P. sanguineus* ACT1 (laccase=5,422.2 U/mg of protein and MnP=41.0 U/mg of protein) and *D. elegans* PM7 (laccase=1,784.2 U/mg of protein and MnP=40.0 U/mg of protein) were found. In solid state fermentation *P. sanguineus* ACT1 obtained the highest laccase activity in wheat straw (1,409.0 U/mg dry weight) and sugar cane bagasse (1,404.8 U/mg dry weight); meanwhile, MnP activities were better in sugar cane bagasse for *P. sanguineus* ACT1 and *T. maxima* SM9 with 619.0 and 519.6 U/mg dry weight, respectively. *Trametes maxima* SM9 and *P. sanguineus* ACT1 are considered candidates for laccase and MnP production.

Keywords: fungal diversity, laccase, manganese peroxidase, solid and liquid fermentation.

MYCOREMEDIATION OF A CONTAMINATED SOIL WITH ATRAZINE USING LIGNINOLYTIC ENZYMES

(Micorremediación de un suelo contaminado con atrazina usando enzimas ligninolíticas)

Wilberth Chan-Cupul*[a+], Gabriela Heredia-Abarca[b], Refugio Rodríguez-Vázquez[c].

[a] Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Colima, A. P. 36, autopista Colima-Manzanillo km 40, C. P. 28100, Tecomán, Colima, México.
[b] Instituto de Ecología A. C. Carretera Antigua a Coatepec 351, El Haya, C.P. 91070, Xalapa, Veracruz, México.
[c] Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, A. P. 14-740, Col. Zacatenco, C.P. 07360, México D.F.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: wchan@ucol.mx

Área de conocimiento: Biología de Recursos Naturales.

ABSTRACT
The application of mycoremediation to degrade atrazine in contaminated soils faces several challenges and limitations regarding the competition and proliferation capabilities of introduced fungi in non-sterile soil, nutrient availability in soil and environmental factors. An alternative approach for addressing these challenges is the use of fungal enzyme extracts to degrade atrazine in contaminated soils. The fungal enzyme extracts can be obtained via solid or liquid fermentation and their activity can be enhanced by the use of fungal co-cultures. The use of fungal enzyme extracts from co-cultures and monocultures of *Trametes maxima* (Basidiomycota) and two soil borne micromycetes [*Paecilomyces carneus* and *Aspergillus tamarii* (Ascomycota)] were evaluated for atrazine degradation in a clay-loam soil at field application rate (5 mg/kg). *Trametes maxima-P. carneus* co-culture showed the highest (P = 0.0001) laccase activity with 18, 956.0 U/mg of protein in comparison to the *T. maxima* monoculture (12, 866.2 U/mg of protein) and *T. maxima-A. tamarii* co-culture (1, 969.0 U/mg of protein). Manganese peroxidase (MnP) activity did not show difference (P > 0.05) both in *T. maxima* monoculture (572.4 U/mg of protein) and its co-culture with *P. carneus* (542.6 U/mg of protein). *Aspergillus tamarii* inhibited the MnP activity in *T. maxima* when was co-cultured. In soil microcosms experiments at the first evaluation (1 h), atrazine degradation occurred faster when was used the co-culture extract of *Trametes maxima-P. carneus* (95 %) than the monoculture extract of *T. maxima* (75 %). However, at the end of evaluation (24 h) both the extract of *T. maxima* and its co-culture with *P. carneus* were able to degrade the atrazine at 100 %. The co-culture extract of *T. maxima-A. tamarii* only degraded 25 % of atrazine. The highest degradations were found in the fungal extracts with high laccase activity. This study demonstrated the feasibility of fungal enzyme extracts from co-culture to rapidly degradation of atrazine in contaminated soil at field application rate.

Keywords: fungal interactions, laccase, manganese peroxidase, mycoremediation.

MORPHOLOGICAL VARIATION OF VEGETATIVE AND REPRODUCTIVE CHARACTERS OF SOME GLOBOSE SPECIES OF CACTACEAE

(Variación morfológica de caracteres vegetativos y reproductivos de algunas especies globosas de cactaceae)

María de los Dolores Martínez Martínez[a*], Sofía Loza Cornejo[a+], Hilda Julieta Arreola Nava[b]

[a] Centro Universitario de los Lagos, (CULAGOS), Universidad de Guadalajara
[b] Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA), Universidad de Guadalajara

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: sofialo@culagos.udg.mx

Área del Conocimiento: Biología de Recursos Naturales

ABSTRACT
Cacteae species (family Cactaceae), are a group of great importance in several aspects: food, medicine, ornamental, among others. The region called "Altos Norte de Jalisco" in Jalisco, Mexico, includes municipalities that are characterized by a remarkable diversity of these species of globose cacti; However, studies describing Cactaceae species in the region are scarce; thus, the aim of this study was to analyze the morphological diversity of some species of representative genera distributed in the region and contribute to the knowledge of the diversity of plant genetic resources. A field study that included the register of species and collection of some them for their maintenance under greenhouse conditions was realized; morphological variability of species was analyzed by measuring and recording qualitative and quantitative characteristics. An analysis of diversity (genera and representative species) and morphological variability of vegetative structures (height and stem diameter, number of spines), and reproductive structures (height of the flower, fruit and seed length) is also included. Other registered qualitative morphological characters were: color of stem, color and shape of flowers, fruit and seeds. The results showed the existence of four representative genera of the region: *Coryphantha*, *Mammillaria*, *Ferocactus* and *Stenocactus* of these, the genera with more species were *Mammillaria* (six species) and *Stenocactus* (five species), while genera as *Ferocactus* are small because they include only two species. The average plant size varies from 11cm (*Stenocactus* species) to 100 cm (*Ferocactus* spp.), the shape and size of the spines in different species also presented great variability. Campanulate flowers are shaped in species of all genera. Fruit size varies from 1 cm (*Stenocactus* species) to 4 cm (*Mammillaria* species). Seeds in most genera studied are small (1-4 mm in length).

Keywords: Cacteae; *Mammillaria*; *Coryphantha*; *Stenocactus*, *Ferocactus*.

THE PROPAGATION OF TWO CULTIVARS of *Tradescantia zebrina* Heynh. Ex Bosse (MATALI), IN MEXICO CITY

(La propagación de dos cultivares de *Tradescantia zebrina* Heynh. ex Bosse (MATALÍ), en el D.F.)

Andrés Fierro Álvarez[a*+], María Magdalena González López[a], Carlos Alberto Monsalvo Castillo[b]

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

b. Productor de Plantas Medicinales y Colaborador del Proyecto Aclimatación, domesticación agronómica de especies medicinales, aromáticas y/o condimentarias de zonas templadas.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: afierro@correo.xoc.uam.mx y agrouam_x@hotmail.com

Área del Conocimiento: Biología de Recursos naturales.

ABSTRACT
The *Tradescantia zebrina* hort. ex Bosse, synonymy *Zebrina pendula* Schnizl, is a herbaceous plant with creeping stems or decumbent stems, rooting at gnarls, sessile leaves, arranged in two rows of elliptic-lanceolate to elliptic-ovate about 3-9 x 1,5-3 cm, with the oblique base, cuneate base, acute apex to accuminate apex and the entire margin. They have the beam green, usually silver variegated or purple and purplish underside. It is a plant with different uses of adornment and as a medicinal plant like dermatology, antiemetic, diuretic, antipyretic, analgesic, antihemorrhagic, antidiabetic and Phytochemistry. It contains zebrinin flavonoids and the mono-decafeilado compound. The work consisted to evaluate two cultivars of this species, due to scarce information related to its propagation and its cultivation of this medicinal species of widely used in Tabasco and Guerrero. It is multiplied by cutting, with the plant's fragments stems in order to reproduce the plant. The varieties of 'discolor' and 'purpusii' were evaluated in a greenhouse using two types of herbaceous cuttings, sections of branches and tips of branches. In both types of cuttings they were taken four buds and all the leaves were left, also the use or not use of powder auxins of commercial product RADIX 1500 was evaluated, It was used an experimental design of randomized blocks with three repetitions, the experimental unit counted with 50 cuttings in polyethylene black bags about 10 x 10 cm, with agrolite's substratum, coconut fiber, peat moss and tezontle in ratio to (1:1:1:1), the work was done in Mexico city and the results showed that there were no significant differences between varieties neither types of cuttings nor with use or without use of auxins.

Palabras Clave: esquejes, auxinas, fertirriego, desarrollo.

DEVELOPMENT AND TAKING ROOT OF CUTTINGS OF *Mentha piperita* L., LEMON CULTIVAR WITH DIFFERENT CONCENTRATIONS OF AUXINS IN MEXICO CITY

(Prendimiento y desarrollo de esquejes de *Mentha piperita* L., cultivar limón, con diferentes concentraciones de auxinas, en EL D.F.)

Andrés Fierro Álvarez[a*+], María Magdalena González López[a], Carlos Alberto Monsalvo Castillo[b]

[a] Profesor del Departamento de Producción Agrícola y Animal. UAM-Xochimilco, C.P. 04960 México D.F., México.
[b] Productor de Plantas Medicinales y Colaborador del Proyecto Aclimatación, domesticación agronómica de especies medicinales, aromáticas y/o condimentarias de zonas templadas.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: afierro@correo.xoc.uam.mx y agrouam_x@hotmail.com

Área del Conocimiento: Biología de Recursos naturales.

ABSTRACT

The *Mentha piperita* L., the lemon cultivar is a herbaceous species. It is vivacious, it is creeping growth and it is very aromatic. They are used for their medicinal properties and others like (stimulants, stomachic, antiseptic and carminative properties) even nutritional properties. Its multiplication is effected by stem's herbaceous cuttings and tips of branches for obtaining seedlings. There's limited information about its propagation in Mexico, I bear in mind the use and application of phytohormones in the propagation by cuttings herbaceous of branches and tips of branches of this medicinal and aromatic species. The aim of the study was to measure the effect of different doses of auxins indole-3-butyric acid, to achieve the highest point of taking root and to induce the best vegetative development (root, leaves, steam and branches) in *Mentha piperita* L., lemon cultivar. The work was done in Mexico City in the months of March, April and May 2015, under the plastic cover and fertilizing irrigation system. Herbaceous cuttings were used, terminals of *Mentha piperita*, lemon cultivar applying five different concentrations of auxins (0, 200, 400, 800, and 1000 ppm). It was used an experimental design of randomized blocks (five treatments with three repetitions), the experimental unit counted 50 cuttings in polyethylene black bags about 10 x 10 cm, with agrolite's substratum, coconut fiber, peat and tezontle in ratio to (1:1:1:1). The cuttings were cut and they were immersed in the solution with the respective concentration of auxins, after planting it was applied fertilizing irrigation system with a nutritive solution that included concentration of auxins. The plant's' response to the application of hormones was positive in different concentrations. It was recorded a good development of tissues as much aerial as underground, however, the best treatments were the ones with the application of 800 to 1000 ppm of auxins.

Palabras Clave: Hormonas, esquejes, auxinas, fertirriego.

DEVELOPMENT AND TAKING ROOT OF *Tropaeolum majus* L., IN MEXICO, CITY.

(Prendimiento y desarrollo de esquejes de *Tropaeolum majus* L., en el D. F.)

María Magdalena González López[a*], Andrés Fierro Álvarez[a], Carlos Alberto Monsalvo Castillo[b]

[a] Profesor del Departamento de Producción Agrícola y Animal. UAM-Xochimilco, C.P. 04960 México D.F., México.

[b] Productor de Plantas Medicinales y Colaborador del Proyecto Aclimatación, domesticación agronómica de especies medicinales, aromáticas y/o condimentarias de zonas templadas.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: afierro@correo.xoc.uam.mx y agrouam_x@hotmail.com

Área del Conocimiento: Biología de Recursos naturales

RESUMEN
Tropaeolum majus L., (mastuerzo o capuchina), es una planta herbácea, perenne, glabra en la mayor parte de sus superficies, rastrera o trepadora, láminas foliares peltadas cerca del centro, flores anaranjadas a rojas o amarillas, en ocasiones con varios colores o tonos a la vez, incluyendo el morado, cáliz a menudo también coloreado, sus segmentos algo desiguales en forma y tamaño, de 1.5 a 2 cm de largo. De uso medicinal (revitalizadora, antibiótica, diurética, afecciones de la piel (jiotes, manchas, paño), dolor de cabeza, antiescorbútico, avitaminosis), condimentaría y alimentaria (hojas y flores). Especie vegetal con frecuencia sembrada principalmente como ornamental y de forma secundaria como alimentaria y medicinal. Florece durante todo el año. Esta planta se reproduce por esquejes herbáceos de ramas de una planta madre y colocarla en contenedores, en donde enraizará. La información para México disponible de esta especie es limitada, por lo que, se evaluaron dos tipos de esquejes herbáceos: el primero de secciones de ramas y el segundo de puntas de ramas, en los dos tipos de esquejes se tomaron cuatro yemas y se quitaron las hojas grandes, dejaron todas hojas pequeñas, se evaluó también en los dos tipos de esquejes el uso o no de auxinas en polvo del producto comercial RADIX 1500, se utilizo un diseño experimental de bloques al azar con tres repeticiones, la unidad experimental conto con 100 esquejes en bolsas negras de de polietileno de 10 x 10 cm, con sustrato de: agrolita, fibra de coco, turba y tezontle en relación (1:1:1:1), desinfectado. Los resultados mostraron que no se presentaron diferencias significativas entre los dos tipos de esquejes con y sin uso de auxinas.

Palabras Clave: Hormonas, esquejes, auxinas, fertirriego.

DEVELOPMENT AND TAKING ROOT OF *Plectanthus oloroso (Vaporub)* IN MEXICO CITY

(Prendimiento y desarrollo de *Plectanthus oloroso* (Vaporub) en el D. F.)

María Magdalena González López[a*], Andrés Fierro Álvarez[a+], Carlos Alberto Monsalvo Castillo[b]

[a] Profesor del Departamento de Producción Agrícola y Animal. UAM-Xochimilco, C.P. 04960 México D.F., México.
[b] Productor de Plantas Medicinales y Colaborador del Proyecto Aclimatación, domesticación agronómica de especies medicinales, aromáticas y/o condimentarias de zonas templadas.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: afierro@correo.xoc.uam.mx y agrouam_x@hotmail.com.

Área del Conocimiento: Biología de Recursos naturales.

ABSTRACT
Plectanthus oloroso of the family *Lamiaceae* (*Labiatae*), it has been related by the aroma of their leaves similar to the 'vick vaporub', the popular medicinal ointment. Recent scientific researchers have concluded that the methanolic extract of Plectranthus oloroso's leaves presents some antibiotic activity against *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis* and also has a range of antioxidants. On the other hand phytochemical studies have shown that there is presence of secondary metabolites in the leaves of this plant like: phenolic compound, flavonoids, steroids and carbohydrates. According to specialized publications, to relieve certain types of aches it is usually used the ointment rubbing the chest with the leaves previously heated in treatments to decongest the respiratory tract. These plants are reproduced by herbaceous cuttings of branches of a mother plant and they are placed in containers where it will take root. It also grows well in gardens and in home interiors. There were evaluated two types of herbaceous cuttings: the first one sections of branches and the second one tips of branches. In both types of cuttings they were taken four buds, the large leaves were removed and all the small leaves were left, also the use or not use of powder auxins of commercial product RADIX 1500 was evaluated in both types of cuttings. It was used an experimental design of randomized blocks with three repetitions, the experimental unit counted 100 cuttings in polyethylene black bags about 10 x 10 cm, with agrolite's substratum, coconut fiber, peat moss and tezontle in ratio to (1:1:1:1) disinfected. The results showed no significant differences between both types of cuttings neither with use or not use of auxins.

Palabras Clave: Hormonas, esquejes, auxinas, fertirriego.

CURRENT STATE OF KNOWLEDGE OF FRESHWATER ALGAE IN THE SANTA CATARINA RIVER, MONTERREY, N.L.

(Estado del conocimiento de las algas del lecho del río Santa Catariana, Monterrey N.L.)

Diana Elena Aguirre Cavazos[a]*, Sergio Salcedo Martínez [a], Sergio Moreno Limón [b]

[a] Herbario. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Biológicas.
[b] Lab. Fisiología Vegetal. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Biológicas.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: deac_83@hotmail.com

Área del conocimiento: Biología de Recursos naturales

ABSTRACT
The continental algae of Mexico have been studied since 1843, but many states remain unexplored or with scarce register. Besides their ecological importance, certain algal groups or species stand out as nitrogen fixers or soil stabilizers, indicators of environmental conditions or source of biotechnological metabolites. The 21 species records for Nuevo Leon represent scarcely a 0.64% of the country richness, making evident phycology is a pristine field of study in the state. This reasoning lead us to pose as a research objective the identification of predominant macroalgae in the section of the Santa Catarina River that crosses the metropolitan area of Monterrey, aiming to contribute to the knowledge of freshwater algae and their potential as a renewable resource capable of sustainable utilization. Five collection sites were sampled. Water temperature, dissolved oxygen, conductivity and pH, as well as the vegetation and substrate type present along a 100 m transect were registered in each site. Macroalgae in transect were collected and taken to Facultad de Ciencias Biológicas Herbaria for mounting, photographic record and identification. Eleven macroalgae genera were identified, 50% of them are in the Division Chlorophyta, being the genera with greater coverage *Cladophora*, followed by *Spirogyra* and *Rhizoclonium*. The predominant substrata were rock, grass and mud, where a total of 9 genera of microalgae were identified, mostly bacillariophyceae. Nine of the 11 genera of macroalgae and the nine of the microalgae found are new records to Nuevo Leon, which highlights the importance of conducting studies to increase the knowledge about continental phycology and its potential importance, laying the foundations for sustainable use of this renewable resource.

Keywords: Nuevo León; Chlorophyta; Bacillariophyceae; *Cladophora*.

RESUMEN
Las algas continentales de México han sido objeto de estudio desde 1843, sin embargo, muchos estados permanecen inexplorados o con escasos registros. Además de su importancia ecológica, se reconocen ciertos grupos o especies como fijadores de nitrógeno o estabilizadores en el suelo, indicadores de condiciones ambientales o fuente de metabolitos biotecnológicos. Para Nuevo León existen 21 registros específicos, representando apenas un 0.64% de la riqueza del país lo que evidencia que la ficología del estado es un campo prístino de estudio, razonamiento que nos llevó a plantear como objetivo de trabajo identificar la macroalgas predominantes en la sección del Río Santa Catarina que atraviesa el área metropolitana de Monterrey, Nuevo León, contribuyendo al conocimiento ficológico del estado y el de

su potencial como recurso renovable susceptible de un aprovechamiento sustentable. Se muestrearon 5 sitios de colecta registrando el tipo de vegetación y sustrato presentes en un transecto de 100m, así como los valores de temperatura del agua, oxígeno disuelto, conductividad y pH. Las macroalgas se colectaron a lo largo de toda el área y se trasladaron al Herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas para su montaje, registro fotográfico e identificación. Se identificaron 11 géneros de macroalgas en las estaciones, de los cuales el 50% pertenecen a la División Chlorophyta, siendo los géneros con mayor cobertura *Cladophora*, seguida de *Spirogyra* y *Rhizoclonium*. Los sustratos predominantes fueron rocas, pasto y lodo, en donde se identificaron un total de 9 géneros de microalgas, la mayoría bacilaroficeas. Nueve de los 11 géneros de macroalgas y los 9 géneros de microalgas reportados son nuevos registros para Nuevo León, lo que resalta la importancia de realizar estudios que contribuyan al conocimiento de la ficología continental y su importancia potencial, fincando así las bases para el aprovechamiento sustentable de este recurso renovable.

Palabras Clave: Macroalgas; Nuevo León; Chlorophyta; Bacillariophyta; *Cladophora*; S*pirogyra*; *Rhizoclonium*.

INTRODUCCIÓN

Las algas continentales de México han sido objeto de estudio desde 1843 y el conocimiento de estos grupos se ha mantenido en aumento desde entonces, sin embargo, la mayoría de los estados permanecen hasta hoy inexplorados o con escasos registros. Además de su importancia ecológica como productores primarios y elemento basal clave de la pirámide trófica de ambientes acuáticos, también se reconoce actualmente la importancia de ciertos grupos o individuos específicos como fijadores de nitrógeno o estabilizadores en el suelo, indicadores de condiciones ambientales o fuente novedosa de metabolitos de importancia biotecnológica, como anti-inflamatorios, anti-tumorales, antivirales, antimicrobianos, etc. Ejemplos de esto se tienen en *Staurastrum gracile*, que ha demostrado su efectividad antibacteriana, en el género *Chlorella,* ampliamente utilizado como productor de luteína, en varias especies de *Scenedesmus* cultivadas con el propósito de obtener alimento vivo para acuicultura, para bioremediación de aguas residuales y para la producción de biocombustibles. En México los registros taxonómicos suman 3256 especies, concentrándose el 56% de los estudios en el centro del país [1]. Sin embargo, podemos pensar que en México existen géneros todavía no descritos ya que se ha planteado que el número de especies por describir puede superar 3.6 por año [2]. Para Nuevo León, estado por el que atraviesan 20 ríos y existen 19 embalses con capacidades que van desde 0.9 hasta 1784Mm^3, existen únicamente 21 registros específicos, representando apenas un 0.64% de la riqueza del país [2]. Esto hace evidente que la ficología continental del estado es un campo prístino de estudio y este razonamiento nos llevó a plantear como objetivo de este trabajo identificar la macroalgas predominantes en la sección del Río Santa Catarina que atraviesa el área metropolitana de Monterrey, para contribuir al conocimiento ficológico del estado y el de su potencial como recurso renovable susceptible de un aprovechamiento sustentable futuro.

ÁREA DE ESTUDIO

Nuevo León se localiza al noreste de la República Mexicana, con una superficie total de 64,555 km^2 representando el 3.3% de la superficie total del país. La altitud varía entre 70 y 3,710 metros sobre el

nivel del mar (msnm). El estado comprende tres regiones o provincias fisiográficas: la Llanura Costera del Golfo Norte, la Sierra Madre Oriental y la Gran Llanura Norteamericana [3].

El clima es muy variable debido a lo irregular del relieven las zonas fisiográficas, predominando los climas secos y semisecos extremosos. La temperatura media anual estatal es de 22°C con máximas de 40 a 45°C y mínimas de -5 a -10ºC. La precipitación pluvial media general oscila entre 300 y 600 milímetros anuales. Los principales ríos de la entidad son: San Juan, Santa Catarina, Salado, Ramos, Pilón, Pesquería y Conchos (San Fernando); los cuales forman parte de la Sub-cuenca del Río San Juan, segunda en importancia después de la cuenca del río Bravo. La mayoría de los ríos no tienen corriente permanente, excepto en las partes medias y bajas, y ninguno es navegable. Casi todos nacen en la Sierra Madre Oriental y desembocan en el río Bravo o en los ríos San Fernando y Soto la Marina en Tamaulipas. Asimismo, los principales cuerpos de agua de la entidad están conformados por las presas de almacenamiento El Cuchillo (con capacidad de 1,748 Mm^3), Cerro Prieto (400 Mm^3) y La Boca (40 Mm^3), así como el vaso regulador denominado Laguna de Salinillas (70 Mm^3)[3].

METODOLOGÍA

Se muestrearon 5 sitios de colecta en el lecho del río Santa Catarina, en el área que comprende la zona metropolitana de Monterrey, Nuevo León (Figura 1). Las colectas se realizaron en el verano del 2014 (2) y en invierno (1) y primavera (2) del 2015. El material ficológico se colectó siguiendo técnicas ficológicas tradicionales [4]. El muestreo en cada sitio se realizó por medio de un transecto de 100 m, registrando el tipo de vegetación y sustrato presentes entre los 0-10, 50-60 y 90-100 m, repitiendo el transecto a tres profundidades (orilla, media agua y fondo). Las macroalgas se colectaron a lo largo de toda el área. Con los registros de las observaciones se calcularon los porcentajes de cobertura de vegetación y sustratos por sitio. Los parámetros fisicoquímicos de temperatura del agua, oxígeno disuelto, conductividad y pH se registraron por triplicado, para cada estación, con la ayuda de aparatos portátiles. El material colectado se transportó en recipientes plásticos en hielo al Herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas para su procesamiento.

Procesamiento de muestras:

Una vez en el Herbario, se procedió a separar el material y fotografiar las algas en fresco. Para ello se utilizó un microscopio óptico Labomed con cámara Amscope MU1000 (10 Megapixeles). Para su fijación se utilizó formalina (5%), posteriormente el material fue montado en papel o en preparaciones permanentes con gelatina/glicerina (7%) según la talla del ejemplar. Por último, se identificó el material montado con la ayuda de claves taxonómicas [4, 5 y 6]. Las preparaciones permanentes y los montajes en papel forman parte de la colección de algas del herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL.

RESULTADOS

Los valores promedio de pH, Oxígeno disuelto, conductividad y temperatura del agua en cada estación se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: Promedio de los parámetros fisicoquímicos por estación de colecta.

	E1	E2	E3	E4	E5
pH	7.6	8.4	9.1	9.4	9.5
Oxígeno disuelto (mg/ml)	5.99	7.1	7.95	7.66	9.66
Conductividad(m/s)	0.684	0.494	0.278	0.493	0.493
Temperatura(°C)	25.4	23.9	14.5	21.1	23

Se encontraron en las estaciones un total de 10 géneros de macroalgas pertenecientes a 4 Divisiones, siendo las clorofitas el grupo mejor representado, seguido por las carofitas y en menor porcentaje por las rodofitas y las xantofitas (Fig. 2).

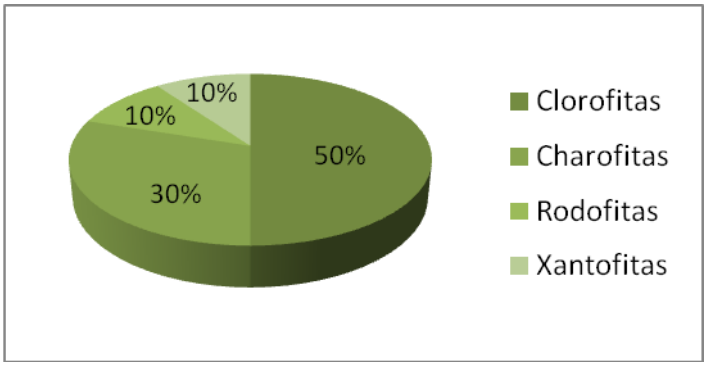


Figura 2: Riqueza de géneros de macroalgas por división

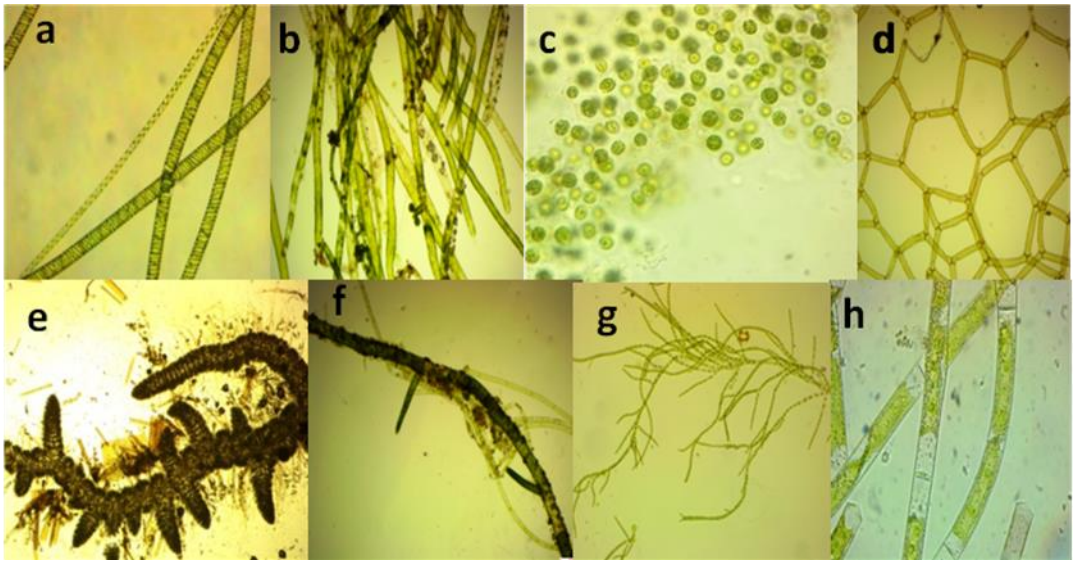


Figura 3: Nuevos registros de géneros de macroalgas para Nuevo León. a) *Spirogyra* sp., b) V*aucheria sp.,* c) *Tetraspora* sp.*,* d) *Hydrodictyon sp.* e) *Batrachospermum* sp., f) *Rhizoclonium* sp.*,* g) *Stigeoclonium sp.,* h) *Mougeotia* sp.

Los géneros presentes fueron los siguientes: Batrachospermum, Chara, Cladophora, Hydrodictyon, Mougeotia, Rhizoclonium, Spirogyra, Stigeoclonium, *Tetraspora* y *Vaucheria* (Fig.3).

El muestreo de las cinco estaciones en el lecho del río Santa Catarina, arrojó los porcentajes de cobertura totales de macroalgas siguientes: 32.12 % en la orilla, 40.18% a media agua y 21.64% en el fondo. Aunque los géneros no fueron los mismos, el número por estación fue similar, encontrándose nueve géneros en tres estaciones, ocho en una y diez en otra. Tanto en la orilla del río, como a media agua se presentaron con mayor cobertura los géneros *Cladophora* y *Spirogyra*, mientras que en el fondo, además del género *Cladophora* se presentó *Rhizoclonium* como uno de los géneros predominantes (Fig.4).

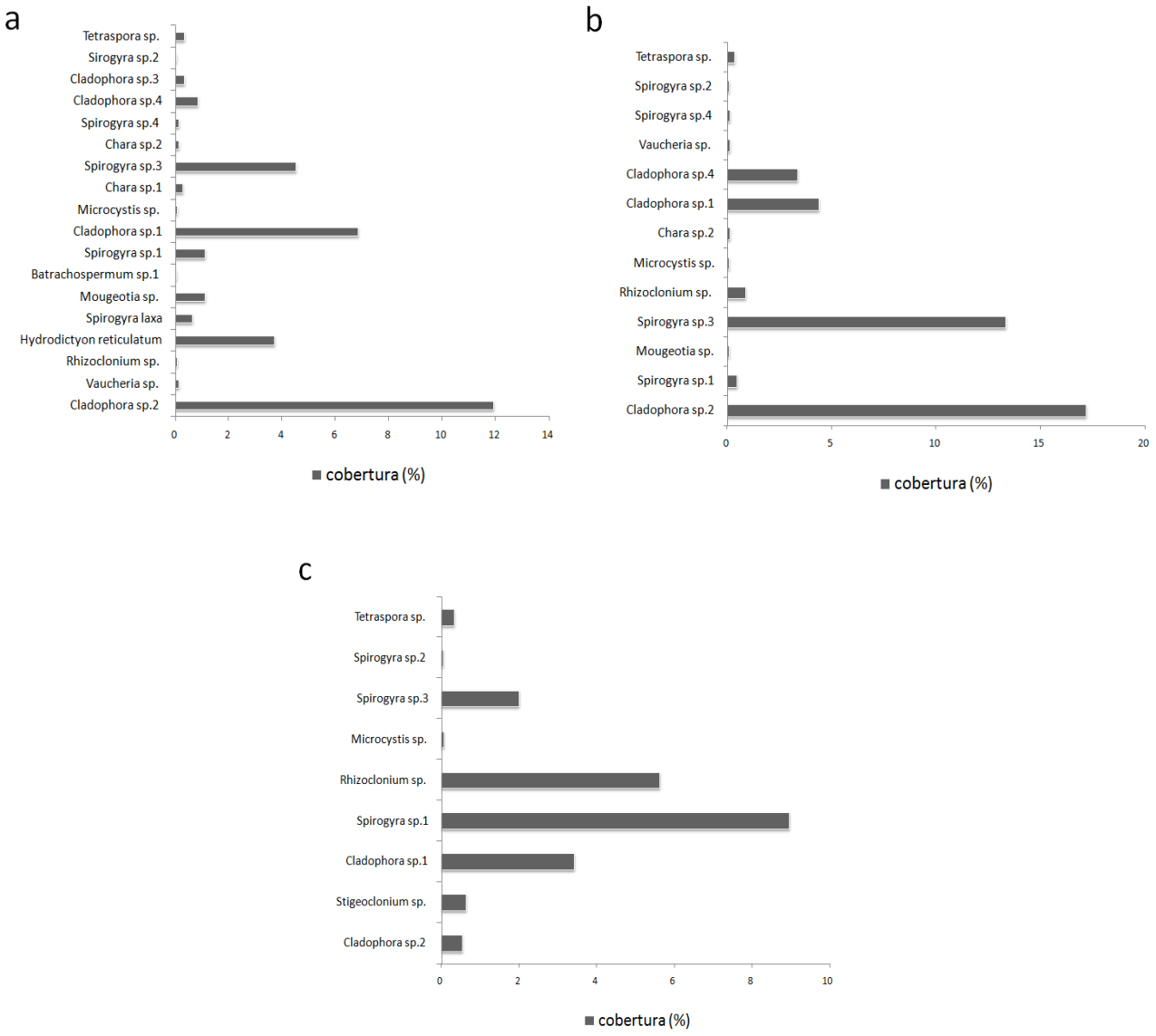


Figura 4. Cobertura de las macroalgas en las 5 estaciones por profundidad. a) Porcentaje de cobertura en orilla, b) Porcentaje de cobertura a media agua, c) Porcentaje de cobertura en fondo.

Los seis tipos principales de sustrato presentes fueron: pasto, lodo, plantas, rocas, raíces y grava, de los cuales las rocas fueron predominantes, seguidas del lodo y el pasto. Las plantas, raíces y grava tuvieron menor presencia, con valores menores al 2% de cobertura (Tabla 2). En la Tabla 3 se muestra un listado de las algas microscópicas identificadas en los distintos tipos de sustrato.

Tabla 2: Porcentajes de cobertura de los tipos de sustrato presentes en las estaciones de colecta.

Sustrato	Cobertura (%)
Pasto	2.69
Lodo	5.86
Plantas	1.19
Rocas	12.55
Raíces	0.23
Grava	0.17

Tabla 3: Géneros de microalgas más comunes en los principales sustratos de las estaciones de colecta.

Lodo	Pasto	Rocas	
Closterium sp.	*Closterium* sp.	*Gomphonema* sp.	*Navicula* sp.
Gyrosigma sp.	*Melosira* sp.	*Fragillaria* sp.	*Scenedesmus* sp.
Navícula sp.	*Navicula* sp.	*Gyrosigma* sp.	*Schizomeris* sp.
	Synedra sp.	*Melosira* sp.	*Synedra* sp.

DISCUSIÓN

De acuerdo a los resultados, en el lecho del río Santa Catarina la mayor cobertura de macroalgas se presentó a media agua, mientras que los menores porcentajes se presentaron en el fondo, el género *Cladophora* fue uno de los más representativos, lo que coincide con la publicación realizada por [7], quienes mencionan que esta alga puede ser la macroalga con mayor distribución en aguas dulces en el mundo, la cual incluso puede alcanzar niveles perjudiciales como resultado de la eutrofización cultural, al tolerar altos grados de contaminación.

Al analizar los valores de los parámetros fisicoquímicos, se observó que en las estaciones muestreadas durante la misma época del año fueron muy similares. La mayoría de los géneros se presentaron durante las 3 estaciones del año con excepción de *Batrachospermum*, que solamente se encontró en invierno e *Hydrodictyon* el cual se observó durante el verano. Cabe mencionar que la estación con el mayor número de géneros fue muestreada durante el verano, mientras que las del menor riqueza fueron muestreadas durante primavera, en el mes de mayo, época del año con más precipitaciones, lo que coincide con trabajos realizados por [8], quien menciona que conforme hay una reducción del volumen del agua, se incrementan los florecimientos de algas.

Para las macroalgas, el grupo mejor representado en las estaciones de colecta fue el de las Clorofitas y en cuanto a los géneros identificados, todos, con excepción de *Chara* y *Cadophora* son nuevos reportes

para el estado de Nuevo León, estos hallazgos incrementan incrementa el número de registros hasta el 2011 por [2]. En este estudio se reportan principalmente los géneros de macroalgas identificados en las estaciones de colecta, sin embargo, debido a que se reportó la cobertura de los tipos de sustrato en las estaciones, consideramos oportuno reportar las microalgas identificadas en los 3 tipos de sustrato con mayor cobertura (rocas, pasto y lodo) en donde los géneros con mayor frecuencia de aparición fueron diatomeas, la Tabla 3en la sección de resultados muestra los géneros reportados para cada tipo de sustrato, cabe mencionar que dichos géneros son nuevos registros para el estado de Nuevo León.

CONCLUSIONES

Se identificaron 11 géneros de macroalgas distintos en las estaciones de muestreo, de los cuales el 50% pertenecen a la División Chlorophyta, mientras que en los principales tipos de sustratos se identificaron 9 géneros de microalgas, la mayoría pertenecientes a las bacilarioficeas.

Los géneros de macroalgas con mayor cobertura en el río Santa Catarina fueron *Cladophora*, seguido de *Spirogyra* y *Rhizoclonium*. Estos géneros estuvieron presentes en 3 estaciones del año, mientras que *Batrachospermum* se encontró sólo en invierno e *Hydrodictyon*, sólo en verano.

18 géneros (nueve macroalgas y nueve microalgas) fueron nuevos registros para Nuevo León y se espera se sigan identificando géneros y especies no reportadas, lo que resalta la importancia de realizar estudios que contribuyan al conocimiento de la ficología continental y su importancia potencial, fincando las bases para el aprovechamiento sustentable de este recurso renovable.

REFERENCIAS

[1] Garduño-Solórzano G., Rodríguez-Palacio MC., Martínez-García M., Quintanar-Zúñiga RE., Lozano-Ramírez C., Campos-Contreras JE, Monsalvo-Reyes AC. 2011. Cultivos de microalgas del Lago de Catemaco .RevLatinomBiotecnolAmbAlgal 2:67-80.

[2] Novelo E, Tavera R. 2011. Un panorama gráfico de las algas de agua dulce de México. *Hidrobiológica* 21(3): 333-341.

[3] Ortega-Gaucin, D. 2011. Diagnóstico sobre la gestión y el uso del agua en el sector agropecuario de Nuevo León., 2 ed. Instituto del agua del estado de Nuevo León. 277p.

[4] Wehr, J.D., Sheath, R.G., Kociolek, P., Thor, J.H. 2003. Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification. AcademicPress. ElsevierScience. CA, USA. 918 p.

[5] Whitford, L. A., y Schumacher, G. J. 1984. *A manual of fresh-wateralgae* North Carolina Agricultural Experiment Station. USA. 337p.

[6] Guiry, M.D. y Guiry, G.M. 2015. *AlgaeBase*. World-wideelectronicpublication, National University of Ireland, Galway. http://www.algaebase.org; visitada el 11 de julio de 2015.

[7] Dodds, W.K. y Gudder D.A. 1992. The ecology of Cladophora. J. Phycol. 28, 415-427.

[8] Carrasco Vargas, U. Y., Díaz Vargas, M., Molina Astudillo, F. I., García Rodríguez, J. Elizalde Arriaga, E. E. 2014. Composición fitoplanctónica de la presa El Abrevadero, Jantetelco, Morelos, México. Acta Universitaria, 24(6), 3-10.

EVALUATION OF THE TROPHIC STATE BY MEANS OF THE TRIX INDEX IN THE URIAS ESTUARY, MAZATLAN, SINALOA

(Evaluación del estado trófico mediante el índice TRIX en el estero de Urías en Mazatlán, Sinaloa)

Miguel Ángel Sánchez-Rodríguez[a+], Cynthia Lizeth Jocobi-Aguilar[a*], Omar Calvario Martínez[a]

[a] Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Unidad Mazatlán

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: msanchez@ciad.mx

Área del Conocimiento: Biología de Recursos naturales

ABSTRACT
Urias estuary is a coastal lagoon located south of Mazatlan City and is considered the most urbanized and one of the most impacted estuaries in the zone since it is the final recipient of domestic, industrial, aquacultural and naval dockyard wastes. In order to determine the system's trophic state, monthly samplings were conducted over a 6 month period from January to June 2015, surface water samples representative of the existing conditions of the system were taken from each sampling station which were situated in such a way that the effects from industrial, aquaculture and urban wastes, were taken into consideration temperature, salinity, pH and dissolved oxygen parameters in situ were monitored, together with water samples for the determination of nitrogen as ammonia, nitrites and nitrates, chlorophyll a and total phosphorus which were later analyzed in the laboratory. Once the results were obtained for each parameter, the TRIX index was used to assess the data. The provisionaltime classification obtained by TRIX of the Urias estuary indicate the same trend as during the study period which corresponds to a high trophic level which classifies it as poor water quality and to a very high trophic level which classifies it as poor water quality. Situation that has not been improved in recent years. Corresponding to the estuary Infiernillo point, recording a very high trophic level (very poor water quality) during the six months due to urban discharges and low capacity for renewal of the water.

Keywords : trophic state, TRIX , Urías estuary .

RESUMEN
El estero de Urías es una laguna costera localizada al sur de la ciudad de Mazatlán y es considerado el sistema más urbanizado y uno de los más impactados de la zona al ser receptor final de drenes domésticos, industriales, acuícolas y de la industria naval. Con el fin de determinar el estado trófico del sistema, se realizaron muestreos mensuales de agua durante un período de 6 meses comprendidos de enero a junio de 2015, colectando muestras de agua superficial representativas de las condiciones existentes del sistema por lo cual fueron tomadas en cada estación de muestreo de forma tal que mostrara los efectos de la industria, la acuicultura y los desechos urbanos, de tal manera que se tuvieron en cuenta el monitoreo de parámetros como temperatura, salinidad, pH y oxígeno disuelto in situ, adicionalmente muestras de agua para la determinación de nitrógeno en forma de amonio, nitritos y nitratos, clorofila a y fosforo total los cuales fueron analizados en el laboratorio. Una vez obtenido los resultados para cada parámetro, se utilizó el índice TRIX para evaluar los datos. La clasificación

temporal del estado trófico TRIX en el estero de Urías, durante el periodos de estudio corresponde a un nivel trófico alto con una calidad del agua mala y un nivel trófico muy alto con una calidad del agua pobre, situación que no se ha visto mejorado en los últimos años. La estación que representan al estero el Infiernillo, presentó un nivel trófico muy alto (calidad de agua pobre), durante los seis meses de estudio debido a la influencia que genera las descargas urbanas y a la baja capacidad de renovación de sus aguas.

Palabras Clave: Estado trófico, TRIX, Estero de Urías.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha incrementado el interés por estudiar los ecosistemas costeros debido a la complejidad del comportamiento ecológico e impacto que pueden ocasionar diversas fuentes de contaminación. En México la investigación sobre la calidad del agua costera se ha convertido en un tema de prioridad del país [1], dado que estas pueden contaminarse por sustancias derivadas de diferentes fuentes, en particular por efluentes municipales [2, 3, 4]. Se estima que entre un 80 y 90 % de las aguas residuales se descargan en las costas sin tratamiento previo adecuado [5], siendo importante señalar que en el Noroeste de México, muchos de los puertos y de las ciudades costeras más importantes muestran ya síntomas locales de contaminación por nutrientes [2]. Dicha presencia de nutrientes en la mayoría de los casos determina la cantidad de la productividad primaria en un sistema; aunque diversos factores pueden incrementar su productividad, el factor más común es un incremento de la cantidad de nitrógeno (N) y fósforo (P) que estos reciben. La contaminación por nutrientes en las lagunas costeras son producto del exceso de las cargas de estos componentes derivados de los procesos naturales y de las actividades antropogénicas, en donde se han observado severos daños que van desde la mortandad de peces, fetidez, anoxias recurrentes, hasta la destrucción total de los ecosistemas [6].

El enriquecimiento de las aguas con dichos nutrientes normalmente es conocido como eutrofización, cuyos efectos en los ambientes marinos costeros alrededor del mundo están bien documentados. Desde entonces la eutrofización en los ecosistemas costeros se ha convertido más frecuentemente en los últimos años, palabras como oligotrófico, mesotrófico y eutrófico (una terminología mayormente desarrollada por limnologistas que caracterizan las condiciones tróficas de aguas interiores) también ha llegado a ser más frecuentemente en la literatura marina. Existen acuerdos generales donde oligotrófico significa aguas pobres en nutrientes (productividad baja) y eutrófico significa aguas ricas en nutrientes (alta productividad) [7].

La determinación del estado trófico es un importante aspecto de los estudios de cuerpos de agua y hay numerosos índices propuestos y usados en la mayoría de los cuerpos de agua interiores en Norteamérica [8]. Por ejemplo [9, 10] propusieron parámetros únicos y múltiples tales como la concentración de fósforo total, nitrógeno inorgánico disuelto (NID), oxígeno disuelto y clorofila “a” como un indicador para la clasificación del estado trófico del cuerpo de agua.

El TRIX es un Índice del estado trófico que ha sido propuesto por [7], éste índice se creó con el objeto de poder comparar información en un amplio intervalo de situaciones, al conjugar factores que están directamente relacionados con la productividad: la clorofila a, oxígeno disuelto y con nutrientes (nitrógeno y fósforo) [3]. Este índice ha sido incluido en la legislación italiana como una forma de estimar el estado de agua de mar, de acuerdo a la clasificación de Giovanardi y Penna [11, 12].

Por tal motivo, el presente estudio pretende determinar durante un periodo de tiempo el estado trófico del estero de Urías, con la finalidad de contribuir a una mejor gestión de los recursos costeros, y de esta manera poder definir estrategias para un uso sustentable del sistema del estero de Urías.

METODOLOGÍA

El estero de Urías se localiza al sur del estado de Sinaloa, en el municipio de Mazatlán, entre las coordenadas 23°08'6.7'' a 23°13'35.4'' LN y 106°17'19.8'' a 106°25'43.0'' LO. Está delimitado al norte por el puerto de Mazatlán, al este por el Océano Pacifico y Golfo de California y al sur por el poblado de la isla de la Piedra y granjas camaronícolas. La boca que lo conecta con el Océano Pacífico y el Golfo de California es permanente y está situada al noroeste de manera semiparalela a la línea de costa, con una anchura de 200 m y una profundidad de 15 m. Cuenta con aproximadamente 12.5 km^2 de superficie, un perímetro litoral de 23 km y una anchura que fluctúa entre 280 y 1,717 m. Tiene forma de escuadra que penetra hacia el noroeste aproximadamente 3.8 km, luego gira hacia el este aproximadamente 2.6 km y finalmente hacia el sureste a 7.7 km, siendo este último, el transecto más largo y es paralelo a la línea de costa, con un transecto total de 14.1 km desde la boca hasta la cabeza del sistema lagunar (Figura 1).

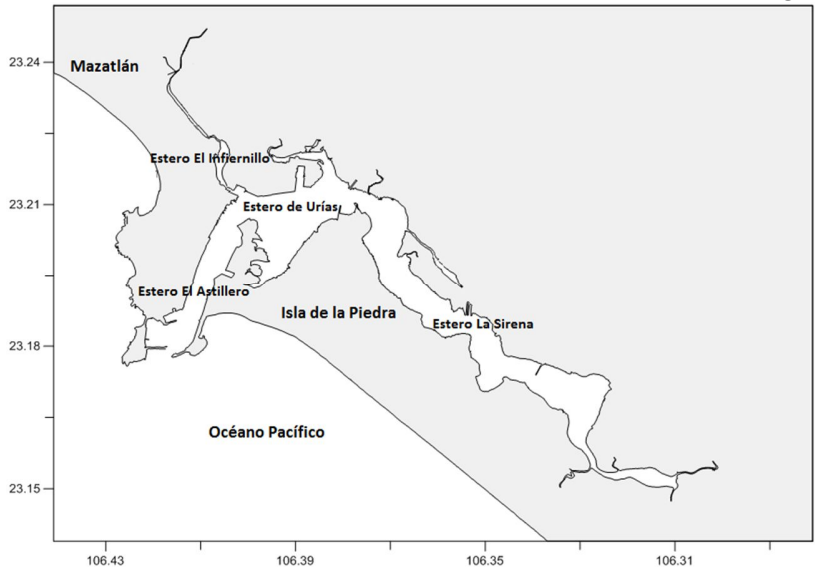


Figura 1. Ubicación geográfica del estero de Urías.

Colecta de muestras

Se realizaron muestreos durante 6 meses consecutivos, desde enero a junio del 2015, distribuyendo 5 puntos de muestreo durante la bajamar, debido a que durante esta marea el estero de Urías se encuentra en la condición más críticas, con las mayores concentraciones de contaminantes no influenciadas con la mezcla del agua proveniente de la bahía, considerando así solamente las condiciones del estero. Los 5 puntos de muestreo (Figura 2), son representativos de las condiciones existentes en el sistema, debido a que se realizó un recorrido por tierra y otro por mar para encontrar cuales eran los puntos clave, pudiendo registrar los efectos de las descargas de las industrias, granjas y de la zona urbana de Mazatlán.

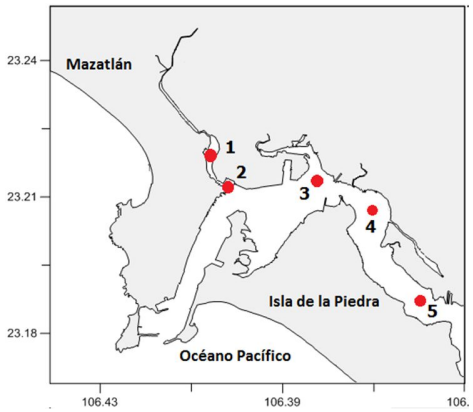


Figura2. Ubicación de estaciones de muestreo en el estero de Urías.

Las muestras se tomaron en la parte superior de la columna de agua a 20 cm por debajo de la superficie. Para la determinación de los parámetros fisicoquímicos y biológicos, se recolecto una muestra en recipientes con capacidad de 2 litros. Una vez recolectadas las muestras se colocaron en hieleras a una temperatura menor a 4 °C. La medición de parámetros de campo requirió la utilización de una sonda multiparamétrica Hidrolab DS5X mediante la cual se midió oxígeno disuelto, porcentaje de saturación de oxígeno, pH, temperatura y salinidad. Las muestras fueron trasladadas al laboratorio donde se realizarán los análisis correspondientes.

Análisis de laboratorio

Los análisis se realizaron por personal del Laboratorio de Química y Productividad Acuática del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Unidad Mazatlán conjuntamente con estudiantes del Instituto Tecnológico de Mazatlán y del Centro de Estudios Tecnológicos del Mar No. 8 en Mazatlán mediante las siguientes técnicas (Tabla 1).

Tabla 1. Parámetros físicos, químicos y biológicos analizados para el estero de Urías.

Parámetro	Método	Referencia
Temperatura, °C	HIDROLAB DS5X	-
Salinidad, UPS	HIDROLAB DS5X	-
Oxígeno disuelto, mg/L y % de Sat	HIDROLAB DS5X	-
pH	HIDROLAB DS5X	-
Nitrógeno en forma de amonio, mg/L	Espectrofotométrico	[13]
Nitrógeno en forma de nitrito, mg/L	Espectrofotométrico	[13]
Nitrógeno en forma de nitrato, mg/L	Reducción con cadmio/colorimétrico	[13]
Fósforo en forma de ortofosfatos, mg/L	Espectrofotométrico	[13]
Clorofila a, µg/L	Espectrofotométrico	[13]

Índice de eutrofización TRIX

El índice TRIX propuesto por Vollenweider [7], es útil para comparar información en un amplio intervalo de situaciones, al conjugar factores, que están directamente relacionados con la productividad (la clorofila a y el oxígeno disuelto), y con los nutrientes (nitrógeno y fósforo), de acuerdo a la ecuación:

$$TRIX = \frac{(Log[Chl\ a \times a\%OD \times NID \times PO_4]) + 1.5}{1.2} \quad \text{..... (1)}$$

Dónde:
TRIX: índice del estado trófico
Chl a: concentración de Clorofila a en µg/L
a%OD: valor absoluto de la desviación del porcentaje de saturación de oxígeno disuelto |100 - %OD|
NID: nitrógeno inorgánico disuelto ($N\text{-}NO_2^-$ + $N\text{-}NO_3^-$ +$N\text{-}NH_4^+$), en mg/L
PO_4: concentración de fósforo en forma de ortofosfatos en mg/L

Las constantes 1.5 y 1.2 se refieren respectivamente, a los valores mínimos de las variables que componen el índice y a los 8 niveles de jerarquía en que está diseñado, es decir, que el TRIX tiene valores entre 2 y 8 (Tabla 2). Estos niveles representan una variedad de situaciones tróficas con una resolución muy fina, relacionadas con un ambiente costero desde condiciones oligotróficas a eutróficas. Valores cercanos a 8 indican una fuerte eutrofización, caracterizados por altas concentraciones de nitrógeno, fosforo y clorofila a, además de una baja en el contenido de oxígeno, mientras que, cuando los valores del índice se aproximan a 2, indican aguas con bajo impacto antropogénico [14].

Tabla 2. Escala TRIX [12]

TRIX	Calidad del agua	Características del agua
2-4	Alto	Aguas poco productivas. Nivel trófico bajo.
4-5	Bueno	Aguas medianamente productivas. Nivel trófico medio.
5-6	Malo	Aguas entre productividad media y alta. Nivel trófico alto.
6-8	Pobre	Aguas de alta productividad. Nivel trófico muy alto.

RESULTADOS
De acuerdo al índice trófico TRIX [7] y al criterio de la clasificación de la legislación italiana (Tabla 2), el agua costera del sistema estuarino de Urías presenta valores entre 5 y 8 que corresponde a un nivel trófico entre alto y muy alto, es decir, que durante el periodo de enero a junio del 2015 las aguas de estas zona fueron entre media, alta y altamente productivas (Tabla 3).

Tabla 3. Variación anual del índice de eutrofización TRIX para el estero de Urías, Sinaloa.

Estación de muestreo	TRIX					
	Ene 15	Feb 15	Mar 15	Abr 15	May 15	Jun 15
1. Estero del Infiernillo	6.93	6.34	6.36	6.77	7.13	6.18
2. Puente Juárez	6.92	6.47	5.72	6.90	6.78	6.15
3. Frente al Rastro	6.36	6.24	5.91	6.94	7.93	5.57
4. Frente a CETMAR	6.54	6.53	5.69	6.26	6.31	5.64
5. Frente a Termoeléctrica	6.25	6.56	6.40	6.36	6.07	5.85

Como se observa en la tabla 3, se muestran pocas diferencias en la distribución del estado trófico tanto a nivel espacial como temporal. Resalta que en los meses de marzo y junio (este último ya dentro de la temporada de lluvias), la mayoría de las estaciones recuperan un poco la calidad del agua, debido a que

presentaron un nivel de trófico alto, es decir, una calidad de agua mala, respecto a la calidad pobre que presentan en el resto de los periodos de estudio. Sin embargo es importante señalar que la estaciones 1 correspondiente al estero del Infiernillo, presento el nivel trófico muy alto con una pobre calidad de agua todos los meses de estudio y esto es atribuido a que esta parte de sistema estuarino de Urías es la que se encuentra prácticamente rodeado de la mancha urbana de la ciudad de Mazatlán, además que la capacidad de renovación de sus aguas es muy bajo debido a la boca tan pequeña que presenta.

DISCUSIONES

Para el estero de Urías, son prácticamente nulas el uso y aplicación de un índice de calidad, sin embargo para la bahía de Mazatlán, se han realizado estudios de eutrofización, como pueden ser el trabajo realizado por Cortés [15] señalando que el aumento de la eutrofización de las costas de Sinaloa se debe al aporte de aguas residuales de zonas turísticas. Alonso-Rodríguez y la Comisión Nacional de Agua [16, 17] atribuyeron la eutrofización a fuentes antropogénicas. Pérez-Verdugo [18] también concluyó que las diferentes actividades antropogénicas afectaban el ambiente de la bahía, debido a que el nitrito, nitrato y ortofosfatos presentaron concentraciones promedio muy elevadas, características de un sistema con alto nivel de eutrofización, Quiñones-Gallardo [19], en una de sus conclusiones menciona que la contaminación por nutrientes es debido a la descarga de las granjas acuícolas.

El único trabajo sobre la utilización de un índice de calidad lo presento Izaguirre-Flores [20] en un estudio que realizo al estero de Urías durante en el 2010, la cual menciona que el índice TRIX no muestra mucha diferencia durante toda la campaña de estudio y en todas las estaciones estudiadas, registrando valores prácticamente entre 5 y 8, es decir aguas entre productividad media y alta (Nivel trófico alto) y aguas de alta productividad (Nivel trófico muy alto) con agua de calidad mala y pobre, misma situación que se observó en el presente trabajo de investigación sobre la zona conurbada del estero de Urías, pudiendo atribuir dichos resultados al gran aporte de nutrientes por la industria, granjas acuícolas y a la población aledaña a este sistema lagunar.

CONCLUSIONES

La clasificación temporal del estado trófico TRIX en el estero de Urías, durante los seis periodos de estudio corresponde a un nivel trófico alto (calidad del agua mala) y un nivel trófico muy alto (calidad del agua pobre), situación que no se ha visto mejorado en los últimos años.

La estación que representan al estero el Infiernillo, independientemente del periodo de estudio, presento un nivel trófico muy alto (calidad de agua pobre), debido a la influencia que genera las descargas urbanas y a la baja capacidad de renovación de sus aguas debido a la boca tan pequeña que presenta.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Proyecto “Estrategias de Educación, Capacitación y Comunicación ambiental de prácticas responsables en usuarios del Sistema Estuarino Urías” del Centro de Estudios Tecnológicos del Mar No. 8 en Mazatlán y al Centro de Investigación EN Alimentación y Desarrollo, A.C. Unidad Mazatlán por el apoyo económico otorgado al primer autor.

REFERENCIAS

[1] INE. (2000). La calidad del agua en los ecosistemas costeros tropicales. Programa de Medio Ambiente 1995-2000. Instituto Nacional de Ecología. SEMARNAP. México.

[2] Páez-Osuna, F., Guerrero-Galván, S. R. y Ruiz-Fernández, A. C. (1998). The environmental impact of shrimp aquaculture and the coastal pollution in Mexico. Mar. Poll. Bull. 36: 65-72.

[3] Aranda-Cirerol, N. (2001). Alimentando al mundo, envenenando al planeta: Eutrofización y calidad de agua. Avance y Perspectiva. México. 20: 293-303

[4] Rivera-Arriaga, E. and Villalobos, G. (2001). The coast of Mexico: approaches for its management. Ocean and Coastal Management, 44: 11-12, 729-756.

[5] PNUMA(Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente).(2002).Zonas marinas y costeras, panorama mundial pasado, presente y futuro. En: Geo 3 Perspectiva mundial del medio ambiente.

[6] Páez Osuna, F., Ramírez Resendiz, G., Ruiz Fernández, A.C. y Soto Jiménez, M.F. (2007). La Contaminación por nitrógeno y fósforo en Sinaloa: Flujos, Fuentes, Efectos y Opciones de Manejo. Universidad Autónoma de México. 304 pp.

[7] Vollenweider, R.A., Giovanardi, F., Montanari, G. and Rinaldi, A. (1998).Characterization of the Trophic Conditions of Marine Coastal Waters with Special Reference to the NW Adriatic Sea: Proposal for a Trophic Scale, Turbidity and Generalized Water Quality Index. Environmetrics, 9: 329-357.

[8] Carlson, R.E., Simpson J. (1996). A Coordinator's Guide to Volunteer Lake Monitoring Methods. North American Lake Management Society. 96 pp.

[9] OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). (1982). Eutrophication of Waters, Monitoring, Assessment and Control. OECD Publication, Paris.

[10] EEA (European Environmental Agency). (1999). Nutrients in European ecosystems. Environmental Assessment Report. No. 4. Office for oficial publications of the European Communities, 155 pp.

[11] Giovanardi, F., Cicero, A.M., Ferrari, C.R., Magaleti, E., Romano, E., & Rinaldi, A. (2002). Interrelationships between Trophic Index (TRIX) and Productivity Indicators in Italian Marine-Coastal Waters: A Tool for Water Quality Evaluation and Management.

[12] Penna, N., Capellacci, S. and Ricci, F. (2004). The influence of the Po River discharge on phytoplankton bloom dynamics along the coastline of Pesaro (Italy) in the Adriatic Sea. Marine Pollution Bulletin, 48: 3-4, 321-326.

[13] Parsons, T., Maita, C. and Lally, C. (1984). A manual of chemical and biological methods of seawater analysis. Pergamon Press, Oxford. 173 pp

[14] Damar, A. (2003). Effects of enrichment on nutrient dynamics, phytoplankton dynamics and productivity in Indonesian tropical waters: a comparison between Jakarta Bay, Lampung Bay and Semangka Bay. PhD. thesis. Christian Albrechts Universita¨t, Kiel. 249 p.

[15] Cortés, A. R. (1994). ¿Las mareas rojas están aumentando en las costas de México? Planctología Mexicana. Boletín Informativo No. 14 de la Sociedad Mexicana de Planctología. A. C.Cortés, A. R., Hernández, B. D. U. y Luna, R. S. 1996. Red tides in México: A review. In Yasumoto T., Y. Oshima, y Y. Fukuyo (eds.). Harmful and Toxic Algal Blooms. IOC-UNESCO. Paris, France.

[16] Alonso-Rodríguez, R., Páez-Osuna, F., Cortés-Altamirano, R. (2000). Trophic Conditions and Stoichiometric Nutrient Balance in Subtropical Waters Influenced by Municipal Sewage Effluents in Mazatlán Bay (SE Gulf of California). Marine Pollution Bulletin 40: 331-339.

[17] Comisión Nacional del Agua. (2001). Estudio de calidad del agua de la Bahía de Mazatlán, Subdirección regional técnica. Culiacán, México.130 pp.

[18] Pérez-Verdugo, F. (2007). Determinación de variables físicas, químicas y nutrientes en el Estero de Urías y Bahía de Mazatlán, Sinaloa. Tesis de Licenciatura. UAS. Mazatlán, Sinaloa, México. 47 pp.

[19] Quiñonez-Gallardo, W. E. (2008). Aportes de nitrógeno por efluentes acuícolas al estero de Urías: concentración de las especies químicas y composición isotópica. Tesis de licenciatura. Instituto Tecnológico de Mazatlán. Mazatlán, Sinaloa, México. 84 pp.

[20] Izaguirre-Flores, E. (2011). Variación anual de la calidad del agua del sistema estuarino de Urías, Sinaloa, México. Tesis de Maestría. CIAD, 114 pp.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

CURRENT STATUS OF LIZARDS OF THE GENUS *SCELOPORUS* IN TWO NATURAL PROTECTED AREAS OF THE STATE OF HIDALGO, MEXICO

(Situación actual de las lagartijas del género S*celoporus* en dos áreas naturales protegidas del Estado de Hidalgo, México)

Adrian Leyte Manrique[a]*+, Aurelio Ramírez Bautista[b]

[a] Instituto Tecnológico Superior de Salvatierra
[b] Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: aleyteman@gmail.com

Área del Conocimiento: Biología de Recursos Naturales

ABSTRACT
Among the group of lizards one of the most conspicuous is the genus *Sceloporus* part of the Phrynosomatidae family it includes more than 80 species. The genus has a wide distribution covering from southeastern United States to Panama. In the specific case of Mexico, the genus can be found from desert and temperate to tropical environments. In the state of Hidalgo thirteen species of the genus *Sceloporu*s occur and some of them are in protected natural areas (PNA´s). As these important areas in terms of the diversity of sceloporins concentrating. In this paper general information about its natural history we are presented as well as the record of the species occur in two PNA´s and that had not been analyzed from a comparative context in terms of the diversity of species of this genus between ANP' s. The information presented here was collected over a period comprising 2006-2010 in protected areas of El Chico National Park (PNEC) and Biosphere Reserve Metztitlán Canyon (RBBM), respectively. RBBM, presented a greater number of species (six) compared to the PNEC (four). It also presents general information regarding the current problems of the species, as well as some alternatives for conservation in both in the context of its ecological and cultural importance as biological components of biodiversity in both protected areas.

Keywords: *Sceloporus*, Diversity, PNA´s, Hidalgo.

RESUMEN
Entre el grupo de las lagartijas, uno de los más conspicuos es el género *Sceloporus* que forma parte de la familia Phrynosomatidae, éste incluye más de 80 especies. El género presenta una amplia distribución que abarca del sureste de Estados Unidos a Panamá. En el caso específico de México, el género se puede encontrar desde ambientes desérticos y templados hasta los tropicales. En el estado de Hidalgo ocurren trece especies del género *Sceloporus*, y algunas de ellas se encuentran en Áreas Naturales Protegidas (ANP´s). Siendo estas áreas importantes en cuanto a la diversidad de sceloporinos que concentran. En este trabajo se presentan datos generales de su historia natural, así como del registro de las especies que ocurren en dos ANP´s, y que no habían sido analizados desde un contexto comparativo en cuanto a la diversidad de especies de este género entre ANP´s. La información que aquí se presenta, fue recaba en un periodo que comprende de 2008 a 2010 en las áreas protegidas de Parque Nacional El Chico

(PNEC) y Reserva de la Biosfera Barranca de Metztitlán (RBBM), respectivamente. RBBM, presentó un mayor número de especies (seis) en comparación con el PNEC (cuatro). Asimismo, se presenta información general en cuanto la problemática actual de las especies, así como algunas alternativas para su conservación en el contexto de su importancia ecológica y cultural como componentes biológicos de la diversidad en ambas áreas protegidas.

Palabras Clave: *Sceloporus*, Diversidad, ANP´s, Hidalgo.

INTRODUCCIÓN

México, es considerado hoy en día como uno de los 12 países megadiversos a escala mundial en cuanto a la riqueza y diversidad de especies de flora y fauna se refiere [2, 3]. En el caso de la fauna, entre los grupos más importantes desde el punto de vista ecológico, cultural y económico se encuentran los vertebrados terrestres de los anfibios y reptiles [13]. Reconociéndose para nuestro país, alrededor de 1240 especies [11, 4, 3]. Específicamente, los reptiles presentan una alta diversidad de especies, siendo un ejemplo de ello las lagartijas del género *Sceloporus*. El cual, comprende más de 80 especies reconocidas y que se encuentran ampliamente distribuidas desde el sur de Estados Unidos, todo México y hasta Centroamérica en una gama de ambientes; desde los desiertos, hasta los bosques templados y selvas tropicales que han permitido la diversificación del género [19,15]. Particularmente en el estado de Hidalgo, se reportan 13 especies del género *Sceloporus* (*Sceloporus aeneus*, *Sceloporus bicanthalis*, *Sceloporus cyanogenesis*, *Sceloporus grammicus*, *Sceloporus megalepidurus*, *Sceloporus minor*, *Sceloporus mucronatus*, *Sceloporus parvus*, *Sceloporus scalaris*, *Sceloporus serrifer*, *Sceloporus spinosus*, *Sceloporus torquatus*, y *Sceloporus variabilis*; [4]). Mismas que exhiben distintos parámetros ecológicos, reproductivos, morfológicos y de distribución ([14, 6, 20]. Es precisamente la diversidad de formas presentes en el género, lo que lo convierte en un buen modelo de estudio de diversas líneas de investigación: Ecología, genética, reproducción, sistemática, evolución, distribución, diversidad y conservación, entre otras [7, 8]. Sin embargo, y a pesar de la gran cantidad de trabajos dirigidos al conocimiento básico de los sceloporinos. A la fecha no se han desarrollado estudios enfocados a su conservación, ni al reconocimiento e identificación de los impactos negativos a sus poblaciones. Ello, como consecuencia de las actividades humanas que se llevan a cabo en los sitios en que ocurren las especies de este género, y menos aún en Áreas Naturales Protegidas como es el caso del Parque Nacional El Chico (PNEC) y Reserva de la Biosfera Barranca de Metztitlán (RBBM), ambas en el estado de Hidalgo, México. Po ello la intensión del presente trabajo es dar a conocer en primera instancia, aspectos relacionados a su historia natural (tipo de reproducción, formas y ecología, y distribución ecológica, entre otros). Se presenta adicionalmente, información referente a la diversidad de especies de sceloporinos de las dos áreas de estudio. Paralelamente, se identificaron los impactos ocasionados por actividades humanas a las especies de sceloporinos presentes en cada ANP. Destacando actividades de ganadería, cultivos agrícolas, cambio de uso de suelo y extracción de ejemplares con fines comerciales. A partir de ello, se puede considerar la información sobre su historia natural en estrategias de manejo y conservación para cada caso en particular.

METODOLOGÍA

Área de estudio—Comprende las Áreas Naturales Protegidas del PNEC (20° 11' 00" y 20° 12' 32" N; 98° 41' 30" y 98° 47' 23" O), y RBBM (20° 14' 15'' y 20° 45' 26'' N; 98° 23' 00'' y 98° 57' 08'' O), ambas en el estado de Hidalgo, México. PNEC, abarca una superficie de 2739 hectáreas (ha), y se localiza en el Municipio de Mineral El Chico, a 26 kilómetros de la ciudad de Pachuca. El clima, es templado-húmedo

(García, 1973), con una temperatura promedio anual que oscila entre los 10 y 14 °C; la precipitación promedio anual es de 1567.9 mm. Presenta elevaciones que van de los 2350 a los 3086 msnm ([14]. El tipo de vegetación corresponde a bosques de pino, encino y abies; pastizales y matorral xerófilo [16]. RBBM, comprende una superficie de 96, 042.94 ha; abarcando los municipios de Acatlán, Atotonilco El Grande, San Agustín Metzquititlán, Eloxochitlán, Metepec, Zacualtipán, y Metztitlán. Específicamente, el área de estudio en esta reserva, se restringió a él Municipio de Metztitlán. Presenta clima semiseco húmedo en la mayor parte de la reserva [14]. La precipitación y temperatura promedio anual oscilan de los 600 a los 1800 mm, y de 15 a 26 °C, respectivamente [20]. La elevación va de los 1000 a los 2000 msnm. Los tipos de vegetación predominantes son: bosques de pino-encino, bosque tropical caducifolio, matorral submontano y matorral xerófilo [14].

Materiales y Métodos—El estudio de campo para el presente trabajo, se desarrolló de Junio de 2006 a Junio de 2008 para PNEC; y de Mayo de 2008 a Junio de 2010 para RBBM. En ambas áreas, realizamos la búsqueda y recolecta de ejemplares (lagartijas) de manera sistemática y mensual, conforme a técnicas convencionales de colecta [1]. Estableciendo para ello, un muestreo por trayectos (1 km de largo por 10 m de ancho), y con ello dar la posibilidad de recolectar una muestra representativa de la diversidad de sceloporinos [20]. Previo a la recolecta de ejemplares, caracterizamos los tipos de vegetación [16] presentes en ambas ANP´s, y seleccionamos puntos de muestreo con ayuda de un GPS para tener un registro de la ubicación de estos. Para RBBM, se caracterizaron cuatro tipos de vegetación: MX = matorral xerófilo, MSM = matorral submontano, BTC = bosque tropical caducifolio, y BE = bosque de encino; PNEC, incluyo, MX, BE, BPE = bosque de pino-encino, y BO = bosque de oyamel. Los ejemplares se buscaron en todos los posibles tipos de hábitats (se define como el lugar donde vive un organismo o donde uno lo podría encontrar [9]) como troncos, rocas, arbustos, etc., además consideramos sus hábitos y actividad durante el día [1]. Paralelamente a la recolecta de ejemplares, llevamos a cabo su identificación con ayuda de claves y guías de campo especializadas para reptiles [18]. Adicionalmente tomamos datos relevantes del ambiente (tipo de hábitat, hora del día, temperatura ambiental, tipo de vegetación, elevación [en metros = msnm], ubicación geográfica [con ayuda de un GPS], y material fotográfico con la finalidad de formar un banco de imágenes. Asimismo, identificamos los tipos de actividades que se llevan a cabo en ambas ANP´s y que impactan de manera negativa a las especies y poblaciones de las lagartijas estudiadas.

Análisis de la información—Una vez, recolectada la información de campo-generamos bases de datos en el programa Excel-analizamos está con ayuda de software y programas especializados en Bioinformática. La diversidad y riqueza de especies entre las dos ANP´s y por tipo de vegetación con ayuda del índice de Shannon-Wiener [10]. Asimismo, con los datos de especies y abundancia, realizamos un dendograma de similitud (para comparar que sitios son más similares en cuanto al número de especies que presentan y/o comparten; [6]) con ayuda del programa BiodiversityPro versión 3.2. Ambos índices, son una herramienta importante de la bioinformática, que permite interpretar la información biológica desde un contexto actual y acorde a la necesidad de reconocer la biodiversidad.

RESULTADOS

Historia natural—La historia natural de un organismo hace referencia al conocimiento que se tiene de este en cuanto a aspectos relacionados a su biología reproductiva, su alimentación, su ecología (e.g., su hábitat y alimento), y en donde se encuentra o distribuye. Siendo parte de su vida desde un contexto

espacial, temporal y evolutivo [9]. En este caso las lagartijas del género *Sceloporus*, presentan una gran variedad en aspectos de su historial natural, lo cual ha sido una respuesta a las condiciones del ambiente en el que habitan [19, 7]. De manera general en las tablas 1, 2 y 3, se presentan características en cuanto a su morfología, ecología (alimentación, actividad y hábitats).

Tabla 1. Talla para algunas de las especies del género *Sceloporus*. Se consideran valores promedios en relación al carácter diagnóstico LHC =longitud hocico cloaca (se expresa en mm); para agruparlas en especies de talla pequeña, mediana y grande. En el caso de *S. grammicus*, las poblaciones presentan intervalos como los que se muestran en la tabla.

Especie	LHC (mm)	Talla
Sceloporus bicanthalis	42.7	Pequeña
S. grammicus	43 a 70	Pequeña y grande
S. minor	73.5	Grande
S. mucronatus	61.7	Grande
S. parvus	45	Pequeña
S. spinosus	74.8	Grande
S. torquatus	81.3	Grande
S. variabilis	54.1	Mediana

Tabla 2. Ecología de algunas especies del género *Sceloporus*. Forrajeo; se refiere a la técnica que utilizan las lagartijas para capturar a su presa (se = sentarse y esperar; a = activa); i = insectívora, v = vegetariana, c = carnívora; d = diurna, n = nocturna, c = crepuscular; a = arbóreos, t = terrestres.

Especie	Forrajeo		Alimentación			Actividad			Hábitos	
	se	a	i	v	c	D	n	c	a	T
Sceloporus aneus	x		x			x				x
S. anahuacus	x		x			x				x
S. grammicus	x		x		x	x				x
S. minor	x		x	x		x				x
S. mucronatus	x		x			x				x
S. palaciosi	x		x			x				x
S. parvus	x		x			x				x
S. scalaris	x		x			x				x
S. spinosus	x		x			x				x
S. sugillatus	x		x			x				x
S. torquatus	x		x	x		x				x

Tabla 3. Características reproductivas. Tipo de reproducción (TR): O = ovípara, V = vivípara; Tamaño de camada (se refiere al número de crías que pueden tener) = TC; Tamaño de la puesta (se refiere al número de huevos que pueden poner) = TC; LHC de las hembras a la madurez sexual; s/d = sin datos.

Especie	TR	TC	TP	LHC (mm)
Sceloporus grammicus	V	3 a 7	-----	39 a 51

S. minor	V	6	-----	67
S. mucronatus	V	5	-----	81
S. parvus	O	-----	s/d	s/d
S. scalaris	V	4	-----	48
S. spinosus	O	-----	15	98.6
S. torquatus	V	6	-----	53.2
S. variabilis	O	-----	3 a 5	56.6

Para ambas ANP´s conjuntamente se tiene una diversidad de 9 especies de sceloporinos (6 para RBMB; 4 para PNEC). El índice de Shannon fue mayor en RBBM con un valor de *H*' = 0.96; en tanto que en PNEC fue de *H*' = 0.85. Por otra parte al comparar la diversidad de especies por tipos de vegetación, se observa que la mayor riqueza en RBBM, se presentó en MX (*H*' = 0.95) y en MSM (*H*' = 0.96). En tanto que para BE se tuvo un valor de (*H*' = 0.87), y para el BTC (*H*' = 0.30). Por otra parte, el análisis clúster que desarrollamos indicó que en PNEC, los tipos de vegetación más similares fueron BE y BPE, siendo lo más distintos MX y BO RBBM (Figura 1). Para RBBM los tipos de vegetación más similares en cuanto a la diversidad de especies que presenta fueron el MX y el MSM, y el menos parecido fue BTC (Figura 2).

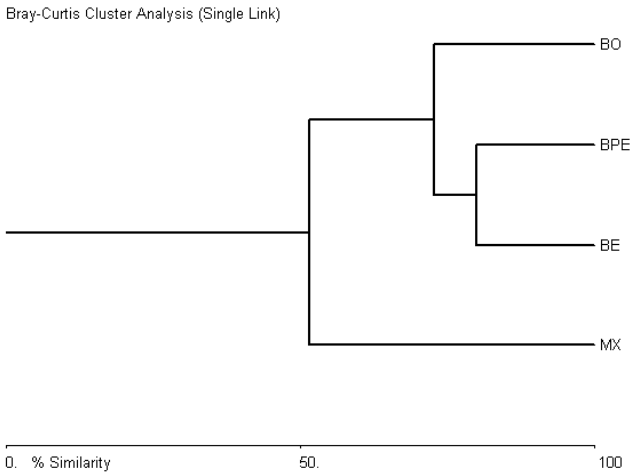


Figura 1. Similitud entre tipos de vegetación en cuanto a la diversidad de especies que presentan en el PNEC.

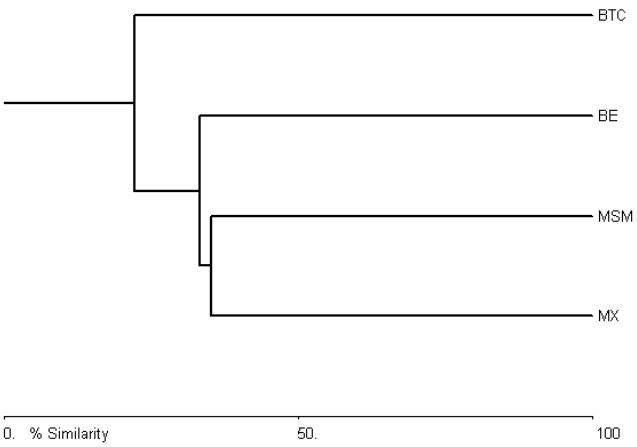


Figura 2. Similitud entre tipos de vegetación en cuanto a la diversidad de especies que presentan en la RBBM.

Impactos ambientales por actividades humanas en ambas ANP´s—En la Tabla 4, se presentan los tipos de interacciones negativas y actividades humanas que afectan la diversidad de sceloporinos para ambos sitios.

Tabla 4. Interacciones que afectan la diversidad de sceloporinos

ANP	Actividades	Conflicto
RBBM	-Extracción de ejemplares -Agrícola -Ganadera -Forestal -Artesanal -Turismo	-Cambio de uso de suelo. -Desconocimiento de la biodiversidad y papel ecológico. -Estrategias de conservación y manejo no acordes con la realidad actual y social.
PNEC	-Agricultura -Forestal -Ecoturismo	-Cambio de uso de suelo. -Desconocimiento de la biodiversidad y papel ecológico. -Estrategias de conservación y manejo no acordes con a la realidad actual y social.

DISCUSIONES

Para ambas ANP´s conjuntamente se tiene una diversidad de 9 especies (6 para RBMB; 4 para PNEC). El índice de riqueza de especies fue mayor en RBBM con respecto a PNEC. Ello sugiere que la mayor riqueza y diversidad de especies que se presentó en RBBM, puede ser debido a que en esta reserva existe una mayor disponibilidad de microhábitats que pueden ser explotados por las especies [20]. Por otra parte al comparar la diversidad de especies por tipos de vegetación, se observa que la mayor riqueza en RBBM, se presentó en MX y en MSM. En tanto que para BE se tuvo un valor de (H' = 0.87), y para el BTC (H' = 0.30). En estudios, dirigidos en zonas con MX y BE, se ha visto que se presenta una mayor diversidad de sceloporinos, dado que la mayor parte de la especies se encuentran en ambientes

templados y de zonas frías [15]. Esto explica en parte, que solo se haya registrado una especie de afinidad tropical, como lo fue *Sceloporus variabilis*, es decir, existen condiciones ambientales como la temperatura y humedad que impiden su distribución a otros tipos de vegetación dentro de la RBMB, en la que especies como *S. grammicus* y *S. minor*, están mejor adaptadas [7].

En el caso de PNEC la mayor riqueza (en especies y abundancia) se observó en el BE y la menor fue para el BO. En ambientes de alta montaña como lo es PNEC, estudios previos han demostrado que la mayor diversidad corresponde a especies como *S. grammicus* y *S. mucronatus*, propias de alta montaña [14, 20]. Por otra parte, el análisis clúster que desarrollamos nos indicó que en la RBBM, los tipos de vegetación más similares en cuanto a la diversidad de especies que presenta fueron el MX y el MSM, y el menos parecido fue BTC (Figura 1). En tanto que en el PNEC, los más similares fueron BE y BPE, siendo lo más distintos MX y BO (Figura 2). En este contexto se puede decir que en RBBM se tiene una mayor diversidad de ambientes y tipos de vegetación que permiten la presencia de microhábitats y por ende, de alimento (Vite-Silva et al., 2010) que al ser comparada con PNEC, en el que el ambiente suele ser más homogéneo y dominado por especies arbóreas de pino y encino, se explicaría la mayor diversidad de especies del género [14].

Las actividades humas desarrolladas en ambas ANP´s que tuvieron mayor impacto sobre las especies fueron la agricultura, ganadería y asentamientos humanos, que en perspectiva por el cambio de uso de suelo modifican no sólo el entorno vegetal sino también las relaciones biológicas y ecológicas de los sceloporinos. Al respecto, si bien no se cuenta con estudios sobre el impacto de las actividades humanas sobre los recursos biológicos como es el caso de las lagartijas, se han desarrollado estudios enfocados al cambio climático y declinación o perdida de especies como resultado indirecto a la perdida de vegetación e incremento de temperatura. Por ejemplo, Sinervo y colaboradores [17], evalúan la declinación de especies de lagartijas y consideran que uno de los mayores causantes de ello es el cambio de temperatura, provocado ello por actividades industriales y que conllevan a la modificación de los ciclos biogeoquímicos del planeta y que inciden en aspectos reproductivos y de supervivencia de las lagartijas. Si bien, en el presente estudio no se analizaron estos aspectos, se encontró que más que las actividades humanas desarrolladas en ambos sitios, existe un desconocimiento general de las especies y su uso y manejo asi como de su papel ecológico. En PNEC, actividades como la agricultura y ecoturísticas, han modificado en el caso de la primera los hábitats naturales de las especies, y en la segunda han promovido la extracción de ejemplares. En este sentido, existen especies que se han adaptado muy bien a estos cambios, siendo una de ellas *Sceloporus grammicus*, que de hecho se considera una especie indicadora de perturbación del ambiente. Esta especie se ha adaptado muy bien a entornos humanos, supliendo con ello sus microhábitats rocosos a los que evoluciono, ya que usa bardas [14]. Sin embargo, existen otras como *S. bicanthalis*, que han sufrido una merma en sus poblaciones, restringiéndose sólo a zonas con vegetación de pino y encino, es decir, boscosas. Para RBMM, al igual que en PNEC, especies como *S. grammicus*, se encuentran ampliamente distribuidas en ella, a excepción de *S. variabilis* que se confina principalmente a ambientes de selva baja [20]. Las seis especies registradas en RBBM, tres de ellas; *S. minor* y *S. parvus* y *S. torquatus* han sido afectadas principalmente por actividades forestales en las que la extracción de madera para uso en mampostería, carbón o muebles, ha sido el principal factor que ha originado la perdida de hábitats para estas especies. En el caso de *S. variabilis*, especie asociada a los cuerpos de agua-sin ser acuática-como arroyos y la misma Laguna de Metztitlán, ha visto impactado su hábitat por efectos de la contaminación y pérdida de cobertura de vegetal que sirve de refugio.

CONCLUSIONES

Conjuntamente para ambas ANP´s se registraron nueve de las 13 especies del género *Sceloporus* presentes en el estado de Hidalgo. RBBM presento seis especies y PNEC cuatro.

Las actividades humanas como agricultura, ganadería y forestales pueden considerarse como un factor negativo que repercute en la abundancia y presencia de las especies del género en ambas ANP´s.

El conocimiento sobre este grupo de lagartijas permitirá la toma de decisiones más *ad hoc* para su conservación, manejo y uso.

AGRADECIMIENTOS

A Víctor Vite Silva, Alejandro Ramírez Pérez, Roberto Hernández y Uriel Hernández Salinas por el apoyo logístico. A las autoridades ambientales del Área Natural Protegida Parque Nacional El Chico y Reserva de la Biosfera Barranca de Metztitlán por las facilidades otorgadas. A los pobladores de las dos áreas por su colaboración durante nuestras estancias de campo.

REFERENCIAS

[1] Casas-Andreu, G., Valenzuela-López, G y Ramírez-Bautista, A. (1991). Cómo hacer una colección de anfibios y reptiles. Cuaderno No. 10, UNAM, México.

[2] Flores-Villela, O. A. (1993). Herpetofauna Mexicana: Lista anotada de las especies de anfibios y reptiles de México, cambios taxonómicos recientes, y nuevas especies. Special Publication No. 17. Carnegie Museum of Natural History. Pittsburgh, 12-18.

[3] Flores-Villela, O., y Canseco-Márquez, L. (2004), "Nuevas especies y cambios taxonómicos para la herpetofauna de México", Acta Zoológica Mexicana, 20, 115-144.

[4] Flores-Villela O., y U. García-Vázquez. (2014), "Biodiversidad de reptiles en México", Revista Mexicana de Biodiversidad Supl. 85:S467-S475.

[5] García, E. (1973). Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen: Para adaptarlo a condiciones de la República Mexicana. 2da. Edición. Universidad Nacional Autónoma de México, México.

[6] Hernández-Salinas, U. (2009). Estudio herpetofaunístico del estado de Hidalgo, México. (Tesis de Maestría, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo): 45-90.

[7] Leyte-Manrique, A. (2011). Especiación en el complejo *Sceloporus grammicus*: Evidencias morfológicas y ecológicas. (Tesis de Doctorado, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo): 23-45.

[8] Leyte-Manrique, A., y Ramírez-Bautista, A. (2010), "Diet of two populations of *Sceloporus grammicus* (Squamata: Phrynosomatidae) from Hidalgo, Mexico", The Southwestern Naturalist, 55, 8-103.

[9] Magurran, A. (1998). Ecological biodiversity and its measurement. First edition. Princeton University Press, New York, USA, 25-30.

[10] Moreno, C. E. (2001). Métodos para medir la biodiversidad. M y T-Manuales y Tesis SEA, Volumen I. Zaragoza, España, 5-20.

[11] Parra-Olea, G., Flores-Villela, O. y C. Mendoza-Almeralla. (2014), "Biodiversidad de anfibios en México", Revista Mexicana de Biodiversidad Supl. 85:S460-S466.

[12] Ramírez-Bautista A., U. Hernández-Salinas, R. Cruz-Elizalde, C. Berriozábal-Islas, D. Lara-Tufiño, I. Goyenechea Mayer-Goyenechea, y J. M. Castillo-Cerón. (2014). Los anfibios y reptiles de Hidalgo, México: Diversidad, Biogeografía y Conservación. Sociedad Herpetológica Mexicana A.C. Pachuca, Hidalgo, México, 2, 12-25, 45-50.

[13] Ramírez-Bautista, A, Hernández-Salinas, U, García-Vázquez, O, Leyte-Manrique, A., y Canseco-Márquez, L. (2009). Herpetofauna del Valle de México: Diversidad y Conservación. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad, México, 30-45.

[14] Ramírez-Pérez, A. (2008). Herpetofauna del Parque Nacional El Chico, Hidalgo, México. (Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo):29-35.

[15] Rubio-Pérez, I. (2005). Análisis comparativo de la morfología, historia de vida y uso del hábitat de distintas poblaciones del complejo *Sceloporus grammicus*: Un enfoque filogenético. (Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México):7-38.

[16] Rzedowski, J. (1978). Vegetación de México. Limusa, México, D. F.

[17] Sinervo Barry, F. Méndez-de-la-Cruz, D. B. Miles, B. Heulin, E. Bastiaans, M. Villagrán-Santa Cruz, R. Lara-Resendiz, N. Martínez-Méndez, M. L. Calderón-Espinosa,R. N. Meza-Lázaro, H. Gadsden, L. J. Avila, M. Morando, I.J. de la Riva, P. Victoriano Sepulveda, C. F. Duarte-Rocha, N. Ibargüengoytía, C. A. Puntriano, M. Massot, V. Lepetz, † T. A. Oksanen, D. G. Chapple, A.M. Bauer,W. R. Branch, J. Clobert, y 15 J. W. Sites Jr. (2010),"Erosion of Lizard Diversity by Climate Change and Altered Thermal Niches", Science 328, 894-899.

[18] Smith, H. M., y E. H. Taylor. (1966). Herpetology of Mexico. Annoted checklist and keys to amphibians and reptiles. A reprint of Bulletins 187, 194 and 199 of the United States National Museum with a list of subsequent taxonomic innovation. Eric Lundberg, Asthon Maryland, 112-140.

[19] Uribe-Peña, Z, A. Ramírez-Bautista, y G. Casas (1999). Anfibios y reptiles de las Serranías del Distrito Federal, México. Cuadernos del Instituto de Biología No. 32, Universidad Nacional Autónoma de México, 5.

[20] Vite-Silva, V. D., A. Ramírez-Bautista y U. Hernández-Salinas (2010). Diversidad de anfibios y reptiles de la Reserva de la Biósfera Barranca de Metztitlán, Hidalgo, México. Revista Mexicana de Biodiversidad, 81, 473-485.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

POLYCHAETES BURROWS OF THE CLAM LION'S HAND IN THE LAGUNA OJO DE LIEBRE, GUERRERO NEGRO, BAJA CALIFORNIA SUR, MEXICO.

(Poliquetos perforadores de la almeja mano de león en la LAGUNA Ojo de Liebre, Guerrero Negro, Baja California Sur, México)

Laura González Ortiz [a+], Jesús Ángel de León González [a], Jesús E. Mendieta Castillo [a]*

[a] Laboratorio de Biosistemática de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma Nuevo León, Monterrey.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: lauragortiz19@hotmail.com

Área del conocimiento: Biología de Recursos Naturales

ABSTRACT
Problem to solve: Assess the damage clam and the possible consequences that led to the permanent closure aimed at evaluating the impact of borers on Clam Mano de León in the Laguna Ojo de Liebre, Baja California Sur, Hypothesis; Clam capture Mano de León has been affected to the extent that a permanent ban was lifted. The causes could be attributed to climate change, effects of salt brine produced by a company and borers among others. With the development of this research is intended to detect whether the cause of the low population and slow development of the clams are produced by opportunistic organisms. Methodology: Sampling was conducted in Laguna Ojo de Liebre, northwest of Baja California Sur. That material from four areas normally used by locals to extract Mussel fishermen Mano de León is collected. As they are identified and quantified to the taxonomic level of species, the polychaete drillers family Spionidae finding an apparently new species of the genus Polydora. subsequently supported by photographs of both valves in each clam percentages size each mud blisters were calculated, in order to assess the degree of infestation banks sampled at different times of the year finding that the Datil bank was the most affected, distribution ranges of size classes of bivalve in order to compare the abundances of the galleries in each of the banks is calculated as well as the sizes and biomass using ANOVA compare seasonally.

Keywords: *Polydora*, borers, infestation, bivalves.

NUEVO LEON ALGAE: NEW RECORDS IN THE MONTERREY CONURBATION

(Algas de Nuevo León: nuevos registros en el área conurbana de Monterrey)

Diana Elena Aguirre Cavazos[a], Sanjuana Cecilia Galicia Campos[a], Rossana Desaili Bonilla Parra[a], Regina Olvido Martínez Verduzco[a], Sergio Moreno Limón[a], Sergio Salcedo Martínez[a*+]

[a]Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Biológicas. Departamento de Botánica.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: checosalcedo@yahoo.com.mx

Área del conocimiento: Biología de Recursos Naturales.

ABSTRACT
Nuevo Leon algae records collected by Ortega from 1843 to 1995 reach 13 genera and 21 species. The latter represent 0.64% of the continental phycological diversity of Mexico, totaling 3,256 records. If we consider the works of Martínez (1991) on Characeae of Allende and Santiago and that of Salcedo and Martínez (2007) on a swamp of Linares, records reach just 45 genera and 28 species. This lack of knowledge about the group led us to conduct a survey about its presence and distribution in different environments of Monterrey conurbation. Seven sampling sites were shortlisted on a map and included different bodies of water and wet surfaces. The collection was opportunistic and was made along a 100 m stretch in each site. Samples were placed on ice and transported to laboratory where they were sorted, photographed and fixed in 4% formaldehyde. Taxonomic identification was made with dichotomous keys based on the morphology of the specimens. New records include 32 genera and 26 species, bringing the total for the state to 77 genera and 54 species. This is respectively a 71 and 93% of increase over the previous records, which is now a 1.7% of national diversity. Macroalgae with the largest presence in streams and rivers were *Cladophora*, *Rhizoclonium*, *Spirogyra*, *Hydrodictyon* and *Vaucheria*. While *Tetraspora* and *Stigeoclonium lubricum* appeared in the summer on submerged stones and *Batrachospermum* and the characean at suburban places. Common algae were, on sidewalks *Hormidium flaccidum*, on wet walls *Desmococcus*, *Apatococcus*. *Bracteacoccus*, in wet soil *Oscillatoria* and *Chroococcus*, as epiphytes on plants and macroalgae *Fragillaria*, *Synedra*, *Oedogonium* and *Gomphonema* and planktonic *Pediastrum*, *Merismopedia*, *Cosmarium*, *Closterium*, *Microcystis* and *Scenedesmus*. *Microspora* was frecuent in warm months and *Oscillatoria* in reducing anoxic environments. Surely continuous sampling will allow both, the identification of reproductive structures and the increase of records.

Keywords: Freshwater algae; Continental Phycology; Monterrey algae; New algae records; Algae diversity.

GENETIC DIVERSITY OF *Espeletia paipana*, ENDEMIC SPECIES TO THE COLOMBIAN BOYACÁ PÁRAMO

(Diversidad genética de *Espeletia paipana*, especie endémica del Páramo Boyacense Colombiano)

Oscar Eduardo Sepúlveda Salazar[a], Laura Fernanda González Martínez[a], Diana Marcela Arias Moreno[a], Zaida Zarely Ojeda Pérez[a*+]

[a] Escuela de Ciencias Biológicas. Grupo de investigación BIOPLASMA. Facultad de Ciencias Básicas. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. UPTC. Tunja. Boyacá. Colombia.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: zaida.ojeda@uptc.edu.co

Área del conocimiento: Biotecnología vegetal.

ABSTRACT
The paramos are complex and diverse natural systems in which several sources of water from the national water network are generated and born. Colombia is one of the three countries where this ecosystem exists. Despite its usefulness, páramos have been deteriorated by human intervention and natural phenomena, leading to the loss of flora, especially the frailejón. Today, *Espeletia paipana,* an endemic specie of Boyaca, is listed as critically endangered by having less than 30 individuals in a single geographic area. The deficit of molecular studies in the specie and its drastic decline in population motivates studies oriented to the selection of suitable materials for in vitro reproduction, and restocking for conservation purposes. The aim of this paper is to analyze the genetic diversity of *Espeletia paipana,* through the use of RAPDs as molecular markers. In order to obtain DNA, four protocols based on phenol-chloroform extraction, phenol-chloroform- isoamyl alcohol, mercaptoethanol and column were used. For the amplification of RAPD, twelve primers were used which were reported as polymorphic primers from Asteraceae. The results of DNA extraction are crucial for obtaining genetic material of good quality. They showed that the optimal methodology to obtain reliable DNA in the quality and quantity (25ng - 80ng) needed for amplification of molecular markers was the one described in the Qiagen DNAeasy kit. On the other hand, the optimal conditions for amplification of RAPDs were established. The markers used, showed an interesting pattern of polymorphism among the individuals evaluated, suggesting the presence of diversity in the population of *Espeletia Paipana*. These results confirm *Espeletia Paipana* as a valuable genetic resource for reforestation and conservation of this species in páramos ecosystems.

Keywords: Paramos, molecular markers, RAPD, frailejon, conservation.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

EFFECT OF EXTREMES TEMPERATURE ON PHOTOSYNTHETIC EFFICIENCY CACTUS PLANTS

(Efecto de temperaturas extremas en la eficiencia fotosintética de plantas de nopal)

Zarely Ojeda-Pérez Zaida[ab]*, Juan Francisco Jiménez-Bremont[c], Margarita Rodríguez-Kessler[d], Federico Villarreal-Guerrero[e], Pablo Delgado-Sánchez[a+]

[a] Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Soledad de Graciano Sánchez, SLP., México.
[b] Escuela de Ciencias Biológicas. Grupo de investigación BIOPLASMA. Facultad de Ciencias Básicas. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. UPTC. Tunja. Boyacá. Colombia.
[c] División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, San Luis Potosí, SLP., México.
[d] Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, SLP., México.
[e] Facultad de Zootecnia y Ecología, Universidad Autónoma de Chihuahua, Chihuahua, CHIH., México.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: pablo.delgado@uaslp.mx

Área de conocimiento: Biología de Recursos Naturales.

ABSTRACT
Plants of the genus *Opuntia* have adaptations that allow them to survive under extreme temperature conditions. They represent an interesting study model in CAM plants to understand the mechanisms of ecophysiological responses under stress conditions. Currently, one of the ecophysiological main tools used to study stress in plants, is the chlorophyll fluorescence. The parameter most used of this technique is the quantum yield of photosystem II (Φ_{PSII}). This measure allows to evaluate *in vivo* and in a fast way the sensitivity of photosystem II activity under stress conditions. The aim of this study was to evaluate the ΦPSII of *O. streptacantha* seedlings under extreme temperature conditions. The seedlings were subjected to two extremes temperature treatments: cold (4 ° C), heat (40 ° C) and a control (25 ° C) in growth climatic chambers. Fluorescence measurements were performed at 6, 9, 12, 15 and 18 hours at 5, 10 and 15 days. The results for the fifth day in heat and cold treatments showed values of ΦPSII similar to the control. On day 10, there were a greater decrease of ΦPSII values respect to the control. On day 15 ΦPSII values drastically decreased with the increase of temperature (0.35 - 0.22), while at low temperatures generates a smaller decrease (0.66 to 0.51) respect to the control (0.82-.78). These results agree with the reported by several authors, who reports that when plants are under stress, ΦPSII values decreases as an immediate response to the photoprotection. This could indicate that the sensitivity of photosystem II of the genus *Opuntia* seedlings at higher temperatures is greater than at low temperatures, showing that these plants exhibit increased tolerance to cold stress.

Keywords: *Opuntia streptacantha,* Chlorophyll fluorescence, Photosynthesis, Abiotic stress.

EFFECT OF THE STOCKING DENSITY ON GROWTH AND SURVIVAL OF THE JAPANESE OYSTER *Crassostrea gigas* IN NAVOLATO, SINALOA

(Efecto de la densidad en el crecimiento y supervivencia del ostión japonés *Crassostrea gigas* en Navolato, Sinaloa)

Manuel GarcíaUlloa Gómez[a*+], Andrés Martín Góngora Gómez[a], Brenda Paulina Villanueva Fonseca[a], María Isabel Sotelo Gonzalez[a]

[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 que presentará trabajo:
Autor para correspondencia: turbotuag@hotmail.com

Área del Conocimiento: Biología de Recursos Naturales.

ABSTRACT
The Japanese oyster *Crassostreagigas*, is a shellfish species with high aquaculture potential due to its growing and constant national and international market demand. However, there are technical factors that should be evaluated to optimize its culture management and growth until reach the commercial size at each specific culture site. An oyster culture was carried out at the Península de Lucernilla, Navolato, Sinaloa, from March 2010 to March 2011. The initial stocking densities were: 14, 28 and 42 organisms/tray.Oyster growth (shell length, mm; weight, g) was registered, as well as the physical and chemical water parameters and food availability. Water temperature oscillated from 18 to 32.7°C, salinity from 34 to 40‰, dissolved oxygen from 2.93 to 8.25 mgL^{-1}, and chlorophyll *a* concentration from 2.28 to 6.17mg m^{-3}. All parameters were found within the proper growth range of the oyster species. The mean initial oyster length was 4-6 mm. After 13 culture months, the oysters from the 42 density reached the highest length (118.3 mm)and weight (146.38 g), showing significant differences(*P=0.046*) among the tested densities. Oysters from the 28 density obtained the highest mortality (18.36%). Results suggest adjust an initial stocking density of 42 oysters per tray. It is recommended to clean the trays every 15 days to avoid clogging by organic matter and suspended solids from biofouling.

Keywords: *Crassoatrea gigas*, Stocking density, Bivalves, Sinaloa.

ASPECTS OF THE HOST-COMMENSAL RELATIONSHIP BETWEEN A PALAEMONID SHRIMP (*Pontonia margarita*) IN THE PEN SHELL (*Atrina tuberculosa*)

[Aspectos de la relación huésped-comensal entre el camarón Palaemonido (*Pontonia margarita*) en el callo de hacha (*Atrina tuberculosa*)]

Manuel GarcíaUlloa Gómez[a*+], Andrés Martín Góngora Gómez[a], Ana Laura Domínguez Orozco[a], Manuel García Ulloa Jr[b]

[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
[b]Universidad Nacional Autónoma de México, Departamento de Ecología. México D. F.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: turbotuag@hotmail.com

Área del Conocimiento: Biología de Recursos Naturales.

ABSTRACT
It is recognized that some bivalves harbor small shrimps in a biological association since the mantle cavity of formers offer space, food, protection and reproductive opportunities to the crustaceans. In this case, we refer as symbiosisto a relationship between small organisms (symbionts) and larger partners that serve as host.The objective of this research was to study the symbiotic relationship between the pontonnid shrimp,*Pontonia margarita,*and the pen shell,*Atrinatuberculosa,*in the Jitzamuri Bay, Ahome, Sinaloa.25pen shells were collected while SCUBA diving over a sand bank, and then, were individually placed in plastic bags and transported to the laboratory.Then, the shell height, length and wide were measured, as well as the total body length, cephalothorax length and length of the major chelae of the second pereiopod of each shrimp. Shrimp size increased with the size of the host pen shell (r^2 = 81.95% for males, and r^2 = 76.61% for females, P< 0.05). *P. margarita* measurements indicated that males were smaller than females. *P. margarita* is a gonochoric species with reversed sexual dimorphism. The positive relationship between shrimp size and pen shell size, a prevalence of male-female pairs of shrimp (sex-ratio was 50% males and 50% females) and other observations, suggest that a long-term association exists between them, and that the mating system of the shrimp involves social monogamy.

Keywords: *Pontonia margarita*; *Atrina tuberculosa*; Symbiosis; Monogamic.

INFECTION OF THE PROTOZOAN *Perkinsus* sp. TO THE CALLISTA CLAM *Megapitaria squalida* IN THE ESTERO BACOREHUIS, AHOME, SINALOA

(Infección del protozoario *Perkinsus* sp. en la almeja chocolata *Megapitaria squalida* en el Estero Bacorehuis, Ahome, Sinaloa)

Andrés Martín Góngora Gómez[a*+], Lizeth Carolina Villanueva Fonseca[a], Manuel García Ulloa[a], Ana Laura Domínguez Orozco[a]

[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 que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: gogam69@hotmail.com

Área del Conocimiento: Biología de Recursos Naturales.

ABSTRACT
Production and capture of bivalve mollusks in the northwest of Mexico represent important aquatic activities. However, there has been affected by pathogens such as the protozoa *Perkinsus* sp. that causes the Perkinsiosis disease in oysters, clams, mussels and pen shells. The objective of this study was to detect and determine the incidence of *Perkinsus* sp. in the callista clam *Megapitaria squalida* populations of the Estero Bacorehuis, Ahome, Sinaloa. The prevalence and intensity of the parasite were evaluated in 2013. 30 callista clams (n = 360) were collected monthly. Individuals were measured and weighed. Water temperature, dissolved oxygen, salinity, pH, depth and transparency were monitored each month. Identification and prevalence of *Perkinsus* sp. was obtained according to the World Organization of Animal Sanitation (OIE) using the fluid thioglycolate medium method. The mean prevalence and intensity of *Perkinsus* sp. were 31.38% and 2-3 (Mackin's scale), respectively. The higher prevalence was observed in May (70%) when water temperature reached 30°C. Mean intensity indicates that infection of *Perkinsus* sp. In *M. squalida* was low. There were no significant correlations ($P > 0.05$) of ambient variables with the intensity of parasite. This report represents the first record of infection caused by the protozoan *Perkinsus* sp. in the callista clam *M. squalida*. It is recommended a continuous monitoring program of the protozoan in the Estero Bacorehuis, Sinaloa, to favor the aquatic activity by establishing biosecurity regulations.

Keywords: *Perkinsus* sp; *Megapitaria squalida;* Fluid Thioglycolate Medium; Clam culture

RESUMEN
La captura y producción de moluscos bivalvos en el noroeste de México representan importantes actividades acuícolas. Sin embargo, han sido afectada por patógenos como el protozoario *Perkinsus* sp., causante de la enfermedad de Perkinsiosis en ostiones, almejas, mejillones y callos de hacha. El objetivo del estudio fue determinar la incidencia de *Perkinsus* sp. en la población de la almeja chocolate *Megapitaria squalida* del Estero Bacorehuis, Ahome, Sinaloa. La prevalencia e intensidad del protozoario fueron evaluadas en el año 2013. Se analizaron 30 organismos por mes (n = 360). Los especímenes

fueron medidos y pesados. Cada mes, se obtuvo la temperatura del agua, oxígeno disuelto, salinidad, pH, profundidad y transparencia. La detección y obtención de la prevalencia de *Perkinsus* sp. se realizó de acuerdo a los protocolos de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) aplicando la técnica de Medio Fluido de Tioglicolato (MFT). La prevalencia e intensidad promedio de *Perkinsus* sp. fueron 31.38% y 2-3 (escala de Mackin), respectivamente. Las mayor prevalencia se observó en mayo (70%) cuando se registró la temperatura más alta (30°C). La intensidad promedio indica que la infección de *Perkinsus* sp. en *M. squalida* fue baja. No existió correlación (P> 0.05) de los parámetros ambientales con la intensidad del parásito. Este trabajo representa el primer reporte de infección provocado por el protozoario *Perkinsus* sp. en la almeja chocolate *M. squalida*. Se recomienda el monitoreo continuo del patógeno en el Estero Bacorehuis, Sinaloa, para establecer medidas de bioseguridad que favorezcan la actividad acuícola.

Palabras Clave: *Perkinsus* sp; *Megapitaria squalida;* Medio Fluido de Tioglicolato; Cultivo de almejas

INTRODUCCIÓN

La almeja chocolate *Megapitaria squalida* es un molusco que se encuentra distribuido desde Baja California hasta Mancora, Perú. Actualmente, es un recurso muy apreciado para el consumo humano y es muy importante para la economía de los pescadores debido a su gran demanda ya que se extrae durante todo el año y funciona como un recurso alternativo, es decir, se captura cuando las especies de mayor valor comercial como el camarón, langosta, abulón no están disponibles debido a las regulaciones pesqueras (vedas) [1].

Los primeros estudios de *M.squalida* abordan aspectos biológicos y de distribución con respecto al sedimento en bahías del estado de Guerrero [2]. Mientras, en Baja California Sur se han realizado algunos estudios de dinámica poblacional [3]. La biología reproductiva de la especie ha sido bien documentada en Bahía de La Paz [4]. La pesquería de la almeja chocolata no ha quedado exenta de la captura inmoderada, ya que es un recurso que incide en agua poco profunda por lo que es muy vulnerable a la extracción, hecho que sumado a una demanda cada vez más creciente y a los escasos estudios relacionados a su biología y dinámica poblacional para un adecuado manejo, ha ocasionado que actualmente bancos antes importantes hayan sido abandonados. Aunado a esa problemática, no existen estudios que evalúen el estado sanitario de las poblaciones de *M. squalida*, a pesar de que se han observado episodios de mortalidades en diferentes sitios. Hasta ahora, las causas de las altas mortalidades son desconocidas, pero es posible que factores ambientales (alta temperatura del agua, presencia de contaminantes) y/o bióticos (estrés asociado a la madurez sexual y reproducción, disponibilidad de alimento, o la acción de patógenos), sean responsables de tales pérdidas [5]. Entre los patógenos de moluscos que se han detectado en México, se encuentra el protozoario *Perkinsus*, siendo uno de los más importantes causantes de mortalidad, por lo que se encuentra sujeto a declaración obligatoria por la OIE (Organización Internacional de Epizootias). El objetivo del presente trabajo es detectar la presencia del protozoario *Perkinsus* sp. y relacionar su presencia con los factores ambientales, en la población de almeja del estero Bacorehuis, Ahome, Sinaloa.

MÉTODOS

Durante 2013, se recolectaron treinta organismos cada mes mediante buceo libre en el Estero Bacorehuis, ubicado en el muncipio de Ahome en el estado de Sinaloa (26°16´ 0” de Latitud Norte y 109° 7´ 59” Latitud Oeste). En el sitio de colecta se tomaron los parámetros físicos del agua: temperatura y el oxígeno disuelto con un oxímetro, (YSI, 55/12 FT, Ohio 45387), la salinidad con un

refractómetro de precisión (Atago, S/Mill), el pH con un potenciómetro (Hanna, HI 8314), profundidad y transparencia con un Disco de Secchi. Se realizaron biometrías a las almejas con un vernier digital (Mitutoyo, CD–8" CS) para determinar su longitud, largo y ancho, y para estimar el peso se usó una balanza granataria (OHAUS, Scout Pro SP 2001). Posteriormente, cada almeja fue abierta y los tejidos blandos se depositaron en una caja Petri para su revisión en estereoscopio y detectar anomalías en el cuerpo, así como la presencia de patógenos. Para observar las hipnosporas del parásito, pedazos de branquia y manto de cada organismo se incubaron en oscuridad incluyendo el medio fluido de Tioglicolato (MFT) por un periodo de cinco días, a 24°C. Después de la incubación, se recogieron los fragmentos de tejido y se maceraron con una hoja de escalpelo en un portaobjetos de vidrio, se añadió una gota de solución yodada de Lugol y se observó al microscopio compuesto con objetivo de 10X y 40X, respectivamente. Durante esta observación, se contaron las células de *Perkinsus* sp., definiéndose la prevalencia y el grado de intensidad de la infección [6]. El cálculo de la prevalencia (%) se realizó mediante la fórmula de Thursfield [7]. La intensidad de la infección fue registrada de acuerdo al grado de daño del tejido suave, reportada de acuerdo a la escala de Mackin[8].

RESULTADOS

A simple vista, se encontraron signos que indicaron la posible presencia de *Perkinsus* sp., como: poca resistencia del organismo a su apertura, branquias laceradas y sucias, músculo delgado y palidez del cuerpo blando. Los resultados con el MFT confirmaron la presencia de *Perkinsus* sp. en *M. squalida* mediante la observación de células esféricas de color negro o azulado con un diámetro entre 10 y 100 µm. La intensidad de la infección general fue en nivel 2 y 3 de acuerdo a la escala de Mackin. La prevalencia general del parásito durante el estudio fue de 31.38%, encontrándose el valor más alto en el mes de mayo con un 70%. En cuanto a los parámetros físicos, la temperatura del agua (34°C en agosto) y la salinidad (40 ups en abril) sobrepasaron los límites de tolerancia para la especie, pero no mostraron una correlación significativa con la prevalencia de la infección, aunque se mostró una tendencia donde las mayores prevalencias se encontraron en los meses más calurosos del ciclo.

DISCUSIONES

Con el presente trabajo, se contribuye a ampliar el número de especies de moluscos afectados que resultan susceptibles y hospederos potenciales para la infección causada por el protozoario *Perkinsus* sp., además de ampliar el área de registro del patógeno en el Estado de Sinaloa, como el caso del reciente registro de *Perkinsus* sp. en poblaciones naturales y cultivadas de ostión *Saccostrea palmula* en cuatro zonas costeras de Sinaloa [9]. En otro estudio realizado en el estero La Pitahaya (Guasave, Sinaloa), se detectó el patógeno en el ostión de cultivo, *Crassostrea gigas* [10], mientras que el más reciente hallazgo del patógeno se reportó en cultivos del callo de hacha *Atrina maura,* también en costas del Municipio de Guasave, específicamente, en el Estero La Piedra[11].

CONCLUSIONES

El protozoario *Perkinsus* sp. se encontró infectando a la almeja chocolate *M. squalida* en el Estero Bacorehuis, Ahome, Sinaloa, con una prevalencia promedio de 31.38% y una intensidad de infección de 2-3 en la escala de Mackin. Esto indica que *M. squalida* es susceptible a la infección por *Perkinsus* sp. y que dicho patógeno tiene la capacidad de parasitar diferentes especies de moluscos distintas a las ya reportadas. Por lo tanto, es recomendable implementar un monitoreo continuo en esta zona para favorecer la actividad acuícola estableciendo medidas sanitarias.

REFERENCIAS

[1] Schweers, T., M. Wolff, V. Koch & F. Sinsel-Duarte. 2006. Population dynamics of *Megapitaria squalida* (Bivalvia: Veneridae) at Magdalena Bay, Baja California Sur, Mexico. Rev. Biol. Trop. 54: 1003-1017.

[2] Stuardo, J. & A. Martinez. 1975. Resultados generales de una prospección de los recursos biológicos y pesqueros del sistema lagunar costero de Guerrero, México. Acta Politécnica Mexicana. 99 (72) 2a. época, 16.

[3]Singh, C.J., B.J.A. Vélez & L.M.C. Fajardo. 1991. Estudio poblacional de la almeja chocolata *Megapitaria squalida* (Sowerby, 1835) en Punta Coyote, Bahía de la Paz B.C.S., México. Cien. Pesq. 8: 7-22.

[4] Baqueiro, E. 1978. Sobre la distribución de *Megapitaria aurantiaca* (Sowerby), *M. squalida* (Sowerby) y *Dosinia ponderosa* (Gray) en relación a la granulometría del sedimento (Bivalvia: Veneridae): Nota Científica. An. Cent. Cienc. Mar Limnol. 6: 25-31.

[5] Baqueiro, E. & J. Stuardo. 1977. Observaciones sobre la biología, ecología y explotación de *Megapitaria aurantiaca* (Sowerby 1831), *M. squalida* (Sowerby 1835) y *Dosinia ponderosa* (Gray 1838) (Bivalvia: Veneridae) de la Bahía de Zihuatanejo e Isla Ixtapa, Gro., México. An. Cent. Cienc. Mar. Limnol. 4:161-208.

[6] Fisher, W. S & Oliver, L. M. 1996. A whole oster procedure of diagnosis of *Perkinsus marinus* diseases using Ray´s fluid thioglycollate culture medium. J. Shellfish. Res. 15:109-117.

[7] Thrusfield, M. 1995.Vetererinary Epidemiology. Second edition.348-352.

[8] Mackin, J. G. & Hopkins, S. H. 1962. Studies on oyster mortality in relation to natural environments and to oil fields in Louisiana.Publs. Inst mar. Sci. Univ Tex. 7: 1-131.

[9] Cáceres-Martínez, J., García-Ortega, M., Vásquez-Yeomans, R., Pineda-García, T., Stokes, N. A & Carnegie, R. B. 2012. Natural and cultured populations of the mangrove oyster *Saccostrea palmula* from Sinaloa, Mexico, infected by *Perkinsus marinus*. Journal of Invertebrate Pathology. 110(3): 321-325.

[10] Villanueva-Fonseca, L. C. 2012. Detección de los protozoarios patógenos *Perkinsus* sp. y *Haplosporidium* sp. y su relación con los parámetros ambientales en un cultivo experimental del ostión japonés *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1851) en el estero “La Pitahaya”, Guasave, Sinaloa. Tesis de Maestría. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Sinaloa. IPN. 60 p.

[11] Rubio-Zepeda, F. 2013. Primer registro de la infección por *Perkinsus* sp. en el callo de hacha *Atrina maura* (Sowerby, 1835) en el estero La Piedra, Guasave, Sinaloa. Tesis de Licenciatura. Universidad de Occidente. Guasave. Sinaloa, México.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

REPRODUCTIVE CYCLE OF THE PEN SHELL *Atrina maura* (MOLLUSCA: PINNIDAE) IN ISLA LOS REDOS, NAVOLATO, SINALOA

(Ciclo reproductivo del molusco callo de hacha *Atrina maura* (Mollusca: Pinnidae) en Isla Los Redos, Navolato, Sinaloa)

Andrés Martín Góngora Gómez*[a], Manuel García Ulloa Gómez[a], Ana Laura Domínguez Orozco[a], Lizeth CarolinaVillanueva Fonseca[a]

[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 que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: gogam69@hotmail.com

Área del Conocimiento: Biología de los Recursos Naturales.

ABSTRACT
It is well known that the reproductive cycle of marine invertebrates is affected by environmental factors such as water temperature, latitude, salinity, photoperiod and food availability among others, which directly influence the processes involved on their physiology of reproduction, as gonad development, production of gametes, spawning, etc. The reproductive cycle of the pen shell, *Atrinamaura*, cultured in Isla Los Redos, Navolato, Sinaloa, is described from March 2008 to March 2009. Histological techniques (n = 18 organisms/month) and the condition index (CI, n = 15 organisms/month) were used to determine its reproductive condition. Sexual ratio was 0.57 females: 1.72 males within the population studied. Mean length of sampled organisms ranged between 50.99 ± 486 and 218.16 ± 8.87 mm along the cultured time. Histological results revealed that *A. maura* is an apparent gonochoristic organism that presents synchronic development of the gonads. Maturity and spawning phases were observed throughout the study period with the exception of March and May 2008. The frequency of gonad development stages obtained per month suggest that this species reproduced all year round in Isla Los Redos, Sinaloa, showing one important reproductive period from June to September, and a partial reproductive cycle from November to February, and two resting periods: July to August, and January to February 2009. There were no correlation ($P > 0.05$) of the CI with temperature ($r^2 = 0.03\%$) nor chlorophyll *a*($r^2 = 11.03\%$). *A. maura* reached its commercial size (200 mm shell height) after nine culture months.

Keywords: *Atrina maura;* Ciclo reproductivo; Bivalvos; Sinaloa.

HEAVY METALS CONCENTRATIONS (COPPER, CADMIUM, LEAD, ZINC AND MERCURY) IN *Atrina maura* CULTURED IN THE ESTERO ALPATAGUA, GUASAVE, SINALOA

(Concentración de metales (cobre, cadmio, plomo, zinc y mercurio) en *Atrina maura* cultivado en el Estero Alpatagua, Guasave, Sinaloa)

Juan Antonio Hernández Sepúlveda[a]*, Andrés Martín Góngora Gómez[a+], Brenda Paulina Villanueva Fonseca[a], Manuel GarcíaUlloa Gómez[a]

[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 que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: gogam69@hotmail.com

Área del Conocimiento: Biología de Recursos Naturales.

ABSTRACT
The study of heavy metals in aquatic ecosystems represents a very important aspect for both ecological and human health. Trace metals leached to the estuaries, rivers, lakes and oceans are bioaccumulated by the food web, firstly beingintaken by phytoplankton and going through the next organisms such as filter feeders. Evaluated metal burden in bivalve molluscs can pose potential risks to public health as a result of their frequent consumption. In this study, concentrations of five trace elements (copper, Cu;cadmium, Cd;zinc, Zn;lead, Pb;mercury, Hg) were determined in samples of muscle and viscera of the bivalve *Atrinamaura*, cultured in Estero Alpatagua, Guasave, Sinaloa, during summer 2012 to summer 2013. The average concentrations of the heavy metals in muscle were: 54.54, 2.04, 267.16, 0.571 and 0.250 mg kg^{-1} for Cu, Cd, Pb, Zn and Hg, respectively.For the viscera, the Cu, Cd, Pb, Zn and Hg concentrations were: 52.00, 4.10, 250.30, 52.50 and 270.30 mg kg^{-1}.Based on the NOM-031-SSA1-1993, NOM-129-SSA1-1995 and NOM-242-SSA1-2009 Mexican normative, metal concentrations in muscle do not represent risk for human health through *A. maura* consumption. The results suggest that heavy metal concentrations appear to depend on the rainy season, when water from precipitation infiltrates through agriculture lands and take with it fertilizers and pesticides, as well as anthropogenic waste derived from aquaculture activities.

Keywords: *Atrina maura,* Heavy metals, enclosure culture, Sinaloa.

NEW DISTRIBUTION OF THE SIPHON CLAM *Panopea globose* IN THE NORTHWEST OF MEXICO

(Nueva distribución de la almeja sifón *Panopea globosa* en el noroeste de México)

Juan Antonio Hernández Sepúlveda[a]* Andrés Martín Góngora Gómez[a+], María Isabel Sotelo Gonzalez[a], Manuel GarcíaUlloa Gómez[a]

[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 que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: gogam69@hotmail.com

Área del Conocimiento: Biología de Recursos Naturales.

ABSTRACT
The siphon clam *Panopeaglobosa* (Dall, 1898) is a northwest Pacific bivalve that is naturally distributed within the Gulf of California. Their shells are thin, grey to whitish color and globe-shaped, and join with its siphon grow up to 100 cm length. Due to its size, valves remain always opened. *P.globosa* (Dall, 1898), a bivalve of the family Hiatellidae, is recorded for the first time in La Tonina, Navolato, Sinaloa, Mexico. During twelve months of sampling, 100 specimens were captured by autonomous diving at one site. All the bivalves were associated with sand-lime-clay substrates at depth of 3.2-4 meters. Water temperature varied from 20.75 to 30.75°C, dissolved oxygen from 4.02 to 9.26 mg L^{1}, salinity from 31 to 36‰, pH from 7.33 to 8.45, depth from 0.4 to 4.0 m and transparency from 0.4 to 1.2 m. The clam length fluctuated from 77.83 to 88.68 mm, width from 65.60 to 75.83 mm, weight from 501.39 to 786.50 g, and the total length considering the siphon was from 118.29 to 128.91 mm.The sampling station was located between 24°20´ and 24°35´ N, and 107°20´ and 107°55´ W. Its original geographical distribution to the south of the Mexican coast, corresponded to the register reported at the Guaymas Bay, located in the central part of the Sonora state (27° 55” and 27°51 N, and 110° 45” and 110°40” W), in the Baja California Gulf, where *P. globosa* was collected at depth of 8-13 meters. With this new register of *P. globosa*, its geographical distribution extends about 474 km southwards and expands its bathymetric range as well.

Keywords: *Panopea globosa;* Distribution; Bivalve; Sinaloa.

POPULATION STRUCTURE AND REPRODUCTIVE POTENTIAL OF *ARACHNOTHRYX JALISCENSIS* BORHIDI ET E MARTINEZ (RUBIACEAE) IN THE SANTIAGO RIVER CANYON.

(Estructura poblacional y potencial reproductivo de *Arachnothryx jaliscensis* Borhidi et E Martinez (Rubiaceae) en la Barranca del Rio Santiago)

Ana Florencia Ayala-Jauregui[a]*, Eduardo Sahagun- Godinez[a,+] Oscar David Cibrian-Ornelas[b], Roberto Conejo-Camargo[b]

[a] Jardín Botánico. Escuela de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Guadalajara.
[b] Escuela de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Guadalajara.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: esahagun@gmail.com

Área de conocimiento: Biología de Recursos Naturales.

ABSTRACT
The genus *Arachnothryx* (Rubiaceae) is composed mainly by shrubs or small trees and is distributed from Mexico to northern Brazil and Peru. Based on molecular, morphological and anatomical criteria it has now been definitely separated from *Rondeletia*. It is a Neotropical genus with about 75-80 species, with centers of diversification in Mexico and Central America. In Mexico alone 60 species have been reported, 44 of which are endemic. *Arachnothryx jaliscensis* was recently described from specimens collected in San Cristóbal de la Barranca, not far from Guadalajara. This presents us with an opportunity to study its ecology and biology. In fact most species of *Arachnothryx* are rather poorly known in almost any respect. With the results presented in this report, *A. jaliscensis* will be one of the best known species in the genus, which will help to develop better programs of conservation and management. *A. jaliscensis* has high requirements of soil moisture and humidity and has turned out to be difficult to cultivate, since in the botanic garden at UAG a plant is precariously maintained, with slow growth and has only bloomed in the last four years, however scarcely. It has not produced any fruits. In the field the population blooms and fruits profusely despite signs of environmental stress, because the plants growing in the lower part of the creek with large boulders providing shelter and a microclimate that is cooler and more humid are larger and flower more profusely than those in the upper part of the creek, that is more exposed to the wind and sun.

Keywords: Population structure; *Arachnothryx*; Rubiaceae; conservation.

RESUMEN
El género *Arachnothryx* (Rubiaceae) está compuesto principalmente por arbustos o pequeños árboles y se distribuye desde México hasta el norte de Brasil y Perú. Con base en criterios moleculares, morfológicos y anatómicos recientemente se separó en definitiva del género *Rondeletia.* Es un género neotropical con unas 75 a 80 especies con centros de diversificación en México y Centroamérica. Tan sólo en México se han reportado 60 especies, 44 de ellas endémicas. *Arachnothryx jaliscensis* fue descrita recientemente a partir de especímenes recolectados en un área cercana a San Cristóbal de la

Barranca, no muy lejos de Guadalajara. Esta cercanía presenta una oportunidad para estudiar su ecología y biología. De hecho, se conoce muy poco sobre casi cualquier aspecto de la mayoría de las especies de *Arachnothryx*. Con los estudios presentados en este reporte, *A. jaliscensis* será una de las especies mejor conocidas del género lo que ayudará a diseñar mejores programas de conservación y manejo. *A. jaliscensis* tiene requerimientos muy altos de humedad en el suelo y en el aire y ha resultado ser una planta difícil de cultivar, puesto que en el Jardín Botánico de la UAG se mantiene de manera precaria, con crecimiento lento y sólo ha florecido en los cuatro últimos años de manera muy escasa. Nunca ha producido frutos. En el campo la población florece y fructifica abundantemente, a pesar de mostrar señales de estrés ambiental, puesto que las plantas que crecen en la parte inferior del arroyo donde hay rocas muy grandes que proporcionan abrigo y un microclima que es más fresco y húmedo, crecen hasta alcanzar un mayor tamaño y florecen más profusamente que las de la parte más alta de la cañada, que está más expuesta al viento y al sol. En la estación de estiaje muestran muchas hojas total o parcialmente secas.

Palabras Clave: Estructura poblacional; *Arachnothryx*; Rubiaceae; conservación

INTRODUCCIÓN

El género *Arachnotrhryx* (Rubiaceae) está compuesto principalmente por arbustos o pequeños árboles y se distribuye desde México hasta el norte de Brasil y Perú. Con base en criterios moleculares, morfológicos y anatómicos recientemente se separó en definitiva del género *Rondeletia;* es un género neotropical con unas 75 a 80 especies con centros de diversificación en México y Centroamérica [1]. Tan sólo en México, se han reportado 60 especies, 44 de las cuales son endémicas [2, 4].

Recientemente se han descrito especies nuevas de *Arachnothryx* en la vertiente pacífica de México, como es el caso de *A. michoacana* con base en ejemplares botánicos provenientes del estado de Michoacán, y de otras dos especies endémicas del estado de Guerrero, *Arachnothryx latiloba* y *A. monticola* [3]. Más recientemente se describió *A. jaliscensis* [4] con base en ejemplares de la barranca del Río Santiago, en el estado de Jalisco. Esta especie es de particular interés, ya que por su cercanía con el área metropolitana de Guadalajara es posible realizar estudios de biología y ecología de la especie, y contribuir así al conocimiento de este género tan pobremente estudiado. Existe una carencia de información sobre la ecología del género *Rondeletia* y más aún sobre *Arachnotrhryx.* No fue posible localizar ninguna publicación sobre la ecología de este género y mucho menos de su potencial reproductivo que serían necesarias para determinar su estado de conservación y un posible programa de manejo. Los objetivos de esta investigación fueron determinar la densidad, estructura poblacional y potencial reproductivo en el microhábitat donde se encuentra *Arachnotrhyx jaliscensis.*

MATERIALES Y MÉTODOS

Para determinar la densidad y estructura poblacional se tomaron datos de los arbustos presentes en cinco parcelas de 10x30 m a lo largo del arroyo donde se encontró la población. No fue posible establecer un mayor número de parcelas por lo reducido de la superficie que ocupa la población.

Utilizando un flexómetro se midió la altura de cada individuo (h), desde la raíz hasta la punta de la rama más alta. Además, se midieron dos diámetros de copa perpendiculares entre sí (D1 y D2). El promedio

entre ambos se tomó como el diámetro de la copa de cada arbusto. Para calcular el volumen de cada individuo se usó la fórmula de volumen para un elipsoide y finalmente cada arbusto se asignó a una categoría según su volumen. El total de arbustos medidos fueron 123.
Se contaron también el número de flores y de frutos en cada uno de los arbustos de las diferentes parcelas.
Para determinar el potencial reproductivo se recolectaron 30 frutos de las diferentes parcelas, se guardaron en bolsas de papel y una vez secos, se hizo el conteo de las semillas en cada uno de los frutos, finalmente este número se extrapoló al número de frutos promedio que produjeron los distintos arbustos.

RESULTADOS

Arachnothryx jaliscensis es una planta arbustiva que puede medir hasta 3.5 m de altura; sus hojas son opuestas, presenta estípulas interpeciolares y sus flores son pequeñas, se desarrolla en lugares frescos y húmedos en el lecho de arroyos entre grandes rocas donde recibe sombra intermitente de los árboles que crecen en las márgenes. Se encontraron arbustos hasta de 4m en las partes más soleadas y arbustos muy pequeños en las partes muy húmedas protegidos por las rocas. La mayor cantidad de arbustos se encontraron en la parcela 1 (parte media del arroyo). La menor cantidad de arbustos se presentaron hacia la parte baja del arroyo, junto a la terracer.
En cuanto al conteo de semillas, la mayor cantidad se presentó en los frutos de la parcela 4 y la menor en los frutos de la parcela 2.

Las plantas de *A. jaliscensis* más protegidas entre las rocas grandes presentaron mejores condiciones y floración más abundante que las más expuestas a la intemperie, aparentemente debido a un microclima más fresco y húmedo.

En total se realizaron 5 salidas al campo en diferentes fechas para hacer los muestreos y el conteo de semillas se hizo en el laboratorio.

Los cuadros del 1 al 7 consecutivamente muestran los datos recabados en el muestreo de arbustos en las parcelas 0 a 4:

DENSIDAD Y ESTRUCTURA POBLACIONAL DE ARACHNOTHRYX JALISCENSIS

FECHA	28-sep-13	AREA	10 x 30m	COORDENADAS	N20° 56'07.3'' W103°23'58.6''
No PARCELA	0	COLECTORES	Oscar Cibrian, Roberto Conejo y Flor Ayala		
ALTITUD	1360-1380 m.		VEGETACION	Bosques de elementos mesofilos	
CATEGORIA	**1)** < 0.01 **2)** 0.01-0.05 **3)** 0.05 - 0.1 **4)** 0.1 - 0.5 **5)** 0.5 - 1 **6)** 1 - 5 **7)** 5 - 10				
	8) 10 -20 **9)** 20-30 **10)** 30 - 40 **11)** > 40 m3			$V = \frac{1}{6\pi h\,(3r2 + h2)}$	
Tamaño de la parcela: 10 x 30 m			*volumen basado en una elipsoide		

ARBUSTO	D1 (en m)	D2 (en m)	r^2	h(en m)	V	Cat.
1	0.73	0.75	0.14	1.59	0.0114	2
2	1.82	1.60	0.73	2.27	0.0032	1
3	1.18	0.94	0.28	1.40	0.0135	2
4	2.26	2.35	1.33	2.70	0.0017	1
5	0.52	0.62	0.08	0.83	0.0685	3
6	1.23	1.83	0.59	1.68	0.0069	1
7	0.16	0.18	0.01	0.15	8.0063	7
8	0.79	1.12	0.23	1.12	0.0244	2
9	2.25	1.72	0.99	2.44	0.0024	1

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

DENSIDAD Y ESTRUCTURA POBLACIONAL DE ARACHNOTHRYX JALISCENSIS

FECHA	24-ago-13	AREA	10 x 30 m	COORDENADAS	N20° 56'05.9'' W103°23'59.5''
No PARCELA	1	COLECTORES	Oscar Cibrian , Roberto Conejo Y Flor Ayala.		
ALTITUD	1386 m		VEGETACION	Bosques de Quercus y elementos mesofilos	

CATEGORIA **1)** < 0.01 **2)** 0.01-0.05 **3)** 0.05 - 0.1 **4)** 0.1 - 0.5 **5)** 0.5 - 1 **6)** 1 - 5 **7)** 5 - 10
8) 10 -20 **9)** 20-30 **10)** 30 - 40 **11)** > 40 m3

$$V = \frac{1}{6\pi h(3r2 + h2)}$$

Tamaño de la parcela: 10 x 30 m

*basado en el volumen de una elipsoide

ARBUSTO	D1 (m)	D2 (m)	r^2	h (m)	V	Cat.
1	1.31	1.10	0.36	1.85	0.0064	1
2	2.53	2.28	1.45	2.85	0.0015	1
3	2.22	2.54	1.42	2.73	0.0017	1
4	4.93	6.10	7.60	6.00	0.0002	1
5	3.83	2.92	2.85	3.88	0.0006	1
6	0.89	1.10	0.25	0.88	0.0397	2
7	0.5	0.62	0.08	0.57	0.1662	4
8	0.39	0.41	0.04	0.20	1.6579	6
9	0.38	0.34	0.03	0.32	0.8306	5
10	0.16	0.38	0.02	0.54	0.2837	4
11	0.61	0.63	0.10	0.34	0.3863	4
12	0.49	0.62	0.08	0.30	0.5509	5
13	0.23	0.26	0.02	0.27	1.6663	6
14	0.37	0.61	0.06	0.23	0.9901	5
15	0.54	0.78	0.11	1.20	0.0250	2
16	1.35	1.25	0.42	1.78	0.0067	1
17	2.04	2.39	1.23	3.74	0.0008	1
18	1.08	0.61	0.18	1.40	0.0152	2
19	0.18	0.13	0.01	0.70	0.1492	4
20	2.52	1.44	0.98	1.93	0.0041	1

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

DENSIDAD Y ESTRUCTURA POBLACIONAL DE ARACHNOTHRYX JALISCENSIS

FECHA	24-ago-13	AREA	10 x 30	COORDENADAS	N20° 56'05.4'' W103°23'58.5''
No PARCELA	1	COLECTORES	Oscar Cibrian , Roberto Conejo y Flor Ayala		
ALTITUD	1386 m		VEGETACION	Bosques de Quercus y elementos mesofilos	
CATEGORIA	**1)** < 0.01 **2)** 0.01-0.05 **3)** 0.05 - 0.1 **4)** 0.1 - 0.5 **5)** 0.5 - 1 **6)** 1 - 5 **7)** 5 - 10				
	8) 10 -20 **9)** 20-30 **10)** 30 - 40 **11)** > 40 m3			$V = \frac{1}{6\pi h\,(3r2 + h2)}$	
	Tamaño de la parcela: 10 x 30 m			*basado en el volumen de una elipsoide	

ARBUSTO	D1 (en m)	D2 (en m)	r^2	h(en m)	V	Cat.
21	2.15	3.38	1.91	3.90	0.0006	1
22	0.52	0.49	0.06	0.88	0.0624	3
23	1.17	1.05	0.31	2.10	0.0047	1
24	0.70	0.50	0.09	0.37	0.3524	4
25	0.28	0.20	0.01	0.22	2.6326	6
26	3.60	3.70	3.33	3.80	0.0006	1
27	0.65	0.48	0.08	1.09	0.0341	2
28	0.97	0.67	0.17	1.09	0.0288	2
29	1.08	1.23	0.33	0.91	0.0319	2
30	0.95	0.84	0.20	1.58	0.0108	2
31	1.73	1.38	0.60	1.97	0.0047	1
32	0.57	0.58	0.08	0.81	0.0724	1
33	0.91	0.49	0.12	1.15	0.0273	2
34	0.21	0.15	0.01	1.10	0.0391	2
35	0.30	0.20	0.02	0.70	0.1412	4
36	2.31	1.97	1.14	2.82	0.0017	1
37	0.64	0.62	0.10	1.36	0.0182	2
38	0.79	0.62	0.12	1.18	0.0255	2
39	1.13	1.34	0.38	1.32	0.0139	2
40	1.02	1.04	0.27	1.65	0.0091	1

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

DENSIDAD Y ESTRUCTURA POBLACIONAL DE ARACHNOTHRYX JALISCENSIS

FECHA	24-ago-13	AREA	10 x 30m	COORDENADAS	N20° 56'05.4'' W103°23'58.5''
No PARCELA	1	COLECTORES	Oscar Cibrian, Roberto Conejo Y Flor Ayala.		
ALTITUD	1366 m		VEGETACION	Bosque de Quercus y elementos mesofilos	

CATEGORIA **1)** < 0.01 **2)** 0.01-0.05 **3)** 0.05 - 0.1 **4)** 0.1 - 0.5 **5)** 0.5 - 1 **6)** 1 - 5 **7)** 5 - 10
8) 10 -20 **9)** 20-30 **10)** 30 - 40 **11)** >40 m3

$$V = \frac{1}{6\pi h\,(3r2 + h2)}$$

Tamaño de la parcela: 10 x 30 m

*basado en una elipsoide

ARBUSTO	D1 (en m)	D2 (en m)	r^2	h(en m)	V	Cat.
41	0.24	0.38	0.02	1.18	0.0307	2
42	2.49	1.82	1.16	2.14	0.0031	1
43	0.82	0.88	0.18	1.28	0.0190	2
44	3.20	1.95	1.66	2.63	0.0017	1
45	1.12	0.53	0.17	0.32	0.2705	4
46	1.74	1.42	0.62	2.32	0.0032	1
47	1.45	1.52	0.55	1.31	0.0120	2
48	2.07	1.80	0.94	2.60	0.0021	1
49	3.06	2.52	1.95	2.44	0.0018	1
50	1.30	1.45	0.47	2.40	0.0031	1

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

DENSIDAD Y ESTRUCTURA POBLACIONAL DE ARACHNOTHRYX JALISCENSIS

FECHA	24-ago-13	AREA	10 x 30m	COORDENADAS	N20° 56'04.8'' W103°23'58.0''
No PARCELA	2	COLECTORES	Oscar Cibrian, Roberto Conejo Y Flor Ayala.		
ALTITUD	1388 m- 1393m		VEGETACION	Bosques de Quercus y elementos mesofilos	
CATEGORIA	**1)** < 0.01 **2)** 0.01-0.05 **3)** 0.05 - 0.1 **4)** 0.1 - 0.5 **5)** 0.5 - 1 **6)** 1 - 5 **7)** 5 - 10				
	8) 10 -20 **9)** 20-30 **10)** 30 - 40 **11)** > 40 m3				
Tamaño de la parcela: 10 x 30 m			*basado en la formula de elipsoide	$V = \frac{1}{6\pi h\,(3r2 + h2)}$	

ARBUSTO	D1 (en m)	D2 (en m)	r^2	h (en m)	V	Cat.
1	1.30	1.79	0.60	2.99	0.0017	1
2	3.05	2.51	1.93	2.92	0.0013	1
3	3.00	2.06	1.60	3.20	0.0011	1
4	0.92	1.20	0.28	1.30	0.0161	2
5	1.05	1.32	0.35	1.38	0.0130	2
6	1.59	1.75	0.70	3.05	0.0015	1
7	2.90	2.06	1.54	1.60	0.0046	1
8	1.56	1.92	0.76	3.61	0.0010	1
9	2.14	2.67	1.45	3.50	0.0009	1
10	1.90	1.82	0.86	1.62	0.0063	1
11	1.98	1.95	0.97	2.39	0.0026	1
12	1.42	1.84	0.66	1.94	0.0048	1
13	1.35	1.76	0.60	1.96	0.0048	1
14	1.40	1.32	0.46	1.40	0.0113	2
15	2.13	3.65	2.09	3.40	0.0009	1
16	2.26	2.64	1.50	3.42	0.0010	1
17	1.10	1.19	0.33	1.51	0.0108	2
18	0.88	0.54	0.13	0.58	0.1280	4
19	1.60	1.15	0.47	2.30	0.0034	1

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

DENSIDAD Y ESTRUCTURA POBLACIONAL DE ARACHNOTHRYX JALISCENSIS

FECHA	28-sep-13	AREA	10 x 30m	COORDENADAS	N20° 56'04.6'' W103°23'58.3''
No PARCELA	3	COLECTORES	Oscar Cibrian, Roberto Conejo y Flor Ayala		
ALTITUD	1380-1425 m.		VEGETACION Bosque de Quercus y elementos mesofilos		
CATEGORIA	**1)** < 0.01 **2)** 0.01-0.05 **3)** 0.05 - 0.1 **4)** 0.1 - 0.5 **5)** 0.5 - 1 **6)** 1 - 5 **7)** 5 - 10				
	8) 10 -20 **9)** 20-30 **10)** 30 - 40 **11)** > 40 m3				
Tamaño de la parcela: 10 x 30 m			* volumen basado en una elipsoide		$V = \frac{1}{6\pi h\,(3r2 + h2)}$

ARBUSTO	D1 (en m)	D2 (en m)	r^2	h (en m)	V	Cat.
1	2.10	2.30	1.21	1.63	0.0052	1
2	2.36	2.53	1.49	2.38	0.0022	1
3	2.10	2.13	1.12	2.04	0.0035	1
4	1.32	2.91	1.12	3.18	0.0012	1
5	2.15	1.94	1.05	2.75	0.0018	1
6	2.14	1.86	1.00	2.81	0.0017	1
7	0.26	0.24	0.02	0.32	1.1106	6
8	2.50	2.52	1.58	2.30	0.0023	1
9	0.94	0.92	0.22	1.80	0.0076	1
10	0.38	0.32	0.03	0.40	0.5266	5
11	0.80	0.81	0.16	1.70	0.0092	1
12	2.60	2.43	1.58	3.44	0.0009	1
13	2.53	3.10	1.98	3.75	0.0007	1
14	0.41	0.36	0.04	0.54	0.2439	4
15	3.23	2.07	1.76	2.81	0.0014	1
16	1.30	2.25	0.79	3.22	0.0013	1
17	0.68	0.57	0.10	0.86	0.0597	3
18	0.33	0.28	0.02	0.60	0.2057	4
19	0.39	0.43	0.04	0.38	0.5162	5
20	0.34	0.24	0.02	0.26	1.5615	6

DENSIDAD Y ESTRUCTURA POBLACIONAL DE ARACHNOTHRYX JALISCENSIS

FECHA	28-sep-13	AREA	10 x 30m	COORDENADAS	N20° 56'03.9'' W103°23'59.0''
No PARCELA	4	COLECTORES	Oscar Cibrian, Roberto Conejo y Flor Ayala		
ALTITUD	1425-1460 m.		VEGETACION	Bosques de elementos mesofilos	
CATEGORIA	**1)** < 0.01 **2)** 0.01-0.05 **3)** 0.05 - 0.1 **4)** 0.1 - 0.5 **5)** 0.5 - 1 **6)** 1 - 5 **7)** 5 - 10				
	8) 10 -20 **9)** 20-30 **10)** 30 - 40 **11)** > 40 m3				
Tamaño de la parcela: 10 x 30 m			*volumen basado en una elipsoide		$V = \frac{1}{6\pi h\,(3r2 + h2)}$

ARBUSTO	D1 (en m)	D2 (en m)	r^2	h(en m)	V	Cat.
1	0.71	0.74	0.13	0.78	0.0678	3
2	0.49	0.51	0.06	0.62	0.1496	4
3	0.62	0.64	0.10	0.88	0.0562	3
4	0.63	0.61	0.10	0.51	0.1897	4
5	2.20	2.70	1.50	3.02	0.0013	1
6	2.05	3.21	1.73	3.40	0.0009	1
7	1.91	1.73	0.83	2.03	0.0040	1
8	2.42	1.83	1.13	3.22	0.0012	1
9	2.44	2,75	1.49	3.05	0.0013	1
10	1.82	1.52	0.70	1.62	0.0069	1
11	2.06	1.74	0.90	2.40	0.0026	1
12	1.10	0.76	0.22	1.23	0.0200	2
13	0.82	0.86	0.18	0.95	0.0390	2
14	2.92	3.54	2.61	4.04	0.0005	1
15	0.38	0.42	0.04	0.45	0.3656	4
16	0.16	0.22	0.01	0.15	7.1342	7
17	0.71	0.43	0.08	0.82	0.0706	3
18	1.78	1.82	0.81	3.01	0.0015	1
19	1.18	0.87	0.26	1.22	0.0191	2
20	3.83	3.18	3.07	4.10	0.0005	1
21	1.10	0.97	0.27	1.15	0.0217	2
22	1.97	1.03	0.56	1.52	0.0087	1
23	0.13	0.18	0.01	0.14	10.0732	8
24	0.72	0.78	0.14	0.41	0.2193	4
25	1.47	1.57	0.58	0.63	0.0395	2

Cuadro 8 muestra los totales de arbustos que presentaron flor.

	ARBUSTOS			PORCENTAJES	
PARCELA	TOTALES	CON FLOR	SIN FLOR	CON FLOR	SIN FLOR
0	9	6	3	67%	33%
1	50	18	32	36%	64%
2	19	13	6	68%	32%
3	20	13	7	65%	35%
4	25	13	12	52%	48%

Cuadro 9 muestra los totales de arbustos que presentaron frutos.

	ARBUSTOS			PORCENTAJES	
PARCELA	TOTALES	CON FRUTO	SIN FRUTO	CON FRUTO	SIN FRUTO
0	9	0	9	0%	100%
1	50	16	34	58%	42%
2	19	11	8	65%	35%
3	20	13	7	52%	48%
4	25	13	12	32%	68%

Cuadro 10 registra el numero de semillas en los frutos de cada parcela.

No de Fruto	No de semillas	Parcela	Prom de semillas	Desviación estándar
1	322	1	377.29	51
2	388			
3	345			
4	337			
5	399			
6	475			
7	375			
1	285	2	294.20	33
2	295			
3	292			
4	294			
5	291			
6	223			
7	275			
8	311			
9	350			
10	326			
1	368	3	312.60	67
2	256			
3	245			
4	397			
5	297			
1	451	4	470.00	34
2	465			
3	515			
4	439			
5	464			
6	423			
7	515			
8	488			
MINIMO	223			
MAXIMO	515			
DESV STANDART	84			
MEDIA	345			

CONCLUSIONES

Con los resultados presentados se puede concluir que la población de *Arachnothryx jaliscensis* reportada en Jalisco es muy reducida y se encuentra restringida a un solo arroyo con clima fresco y húmedo en la Barranca del Río Santiago. La población además muestra señales de estrés ambiental ya que presentaron mejores condiciones los arbustos de la parte baja del arroyo donde la zona era más sombreada y húmeda que en la zona más alta y soleada, donde sin embargo se observó el mayor número de arbustos altos con una mayor floración, posiblemente debido a una mayor iluminación. En la parte media del arroyo donde había más humedad, la densidad de arbustos pequeños fue mayor y por lo mismo hubo poca floración. Los frutos que tuvieron mayor número de semillas fueron los de la parcela 4 que se encontraba en la parte más alta del arroyo y los de menor cantidad de semillas fueron en la parcela 2 donde hubo mayor humedad pero las plantas eran aun pequeñas. La distribución local de este género es limitada ya que solamente se encontró en este lugar después de buscar en ocho arroyos de condiciones variables de altitud, humedad y temperatura en esta misma barranca.

REFERENCIAS

[1]Borhidi, A.; J. Darók; M. Kocsis; Sz. Stranczinger, y F. Kaposvári. (2004). El *Rondeletia* complejo en México. *Acta Botanica Hungarica* **46** (1-2), 91-135.

[2]Borhidi, A. (2006). *Rubiáceas de México*, Casa Editorial de la Academia de Ciencias de Hungría, Akadémiai Kiadó: Budapest, Hungría; pp. 34-69.

[3]Borhidi, A., M. de la Luz Arreguín-Sánchez, y R. Galván Villanueva. (2004). Rubiáceas nuevas en el herbario de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB) de México. *Acta Botanica Hungarica* **46** (1-2): 55-68.

[4]Borhidi, A. y E. Martínez Salas. (2013). Estudios sobre rubiáceas mexicanas XLII. Una nueva especie del género *Arachnothryx* (Rubiaceae, Guettardeae) en Jalisco, México. *Acta Botanica Hungarica* **55** (3-4): 223-226.

EVALUATION OF THE ACTIVITY OF LIPOLYTIC COMPLEX IDENTIFIED IN LATEX JACA, *Artocarpus heterophyllus* L.

(Evaluación de la actividad del complejo lipolítico identificado en el látex de jaca, *Artocarpus heterophyllus* L.)

Victoria Martínez Acebedo[a*+], Leticia Mónica Sánchez-Herrera[a], María Teresa Sumaya-Martínez[a], Edgar Iván Jiménez-Ruiz[a], Leticia Guerrero Rosales[a], Mónica Elizabeth Martínez González[a], Rosendo Balois-Morales[a], Yolotzin Apatzingan Palomino-Hermosillo[a]

[a] Posgrado en Ciencias Biológico agropecuarias (CBAP) de la Universidad Autónoma de Nayarit. Unidad de Tecnología de Alimentos-UAN.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: vicky_16900@hotmail.com

Área del Conocimiento: Biotecnología Alimentaria.

ABSTRACT
The research of hydrolytic enzymes present in the latex jackfruit of *Artocarpus heterophyllus*, of the family Moraceae, showed the presence of an enzyme complex proteolytic and lipolytic activity. The characterization of lipases from plant source can lead to the possibility of use as potential catalyst in the different processes of transformation; these have advantages over chemical catalysts, exhibit high substrate specificity, enables the use of milder reaction conditions and have low cost. The aim of this study is to evaluate the lipolytic activity of the enzyme complex. For the characterization, was obtained the extract crude from latex, the separation of proteins was performed by gel chromatography using as matrix Sefinose Fast Flow, the identification of the lipase activity was carried out using agar plates with tributyrin (0.5 %) and tween 20 (0.1 %) as substrate, bromocresol purple as an indicator. The confirmatory tests were conducted using olive oil to the 1% and rhodamine B as an indicator. The quantification of the lipase activity was determined by measurement of the increase in absorbance at 410 nm produced by the release of p-Nitrophenol as a result of hydrolysis of the ester 1 mM p-Nitrophenyl palmitate in 25 mM Tris-HCl buffer, pH 8.8 at 28 °C for 10 min. The results obtained in the tests of hydrolysis in plate with bromocresol purple as indicator, showed a change in color from purple to yellow due to the hydrolysis of the tributyrin, In the plates of oil-rhodamine B, fluorescent halos were observed due to the formation of free fatty acids. The results of the activity of the complex on the p-Nitrophenyl palmitate, assessing the amount of p-Nitrophenol released in the course of the time, showed an initial speed of 2.87 µmol /ml. min, where a concentration of 1 mM p-Nitrophenyl palmitate is used.

Keywords: *Artocarpus heterophyllus*; lipases, latex, enzyme complex

RESUMEN
La investigación de enzimas hidrolíticas presentes en el látex de *Artocarpus heterophyllus,* de la familia Moraceae, mostraron la presencia de un complejo enzimático con actividad proteolítica y lipolítica. La caracterización de lipasas de origen vegetal puede conducir a la posibilidad de utilizarse como catalizador potencial en los diferentes procesos de transformación, estos ofrecen ventajas sobre los

catalizadores químicos, presentan alta especificidad por sustrato, permiten utilizar condiciones de reacción más suaves y tienen menor costo. El objetivo del presente trabajo es evaluar la actividad lipolítica del complejo enzimático. Para la caracterización se obtuvo el extracto crudo a partir del látex, la separación de las proteínas se realizó por cromatografía en gel utilizando como matriz Sefinose Fast Flow, la identificación de la actividad lipasa se realizó utilizando placas de agar con tributirina (0.5%) y tween 20 (0.1%) como sustrato, púrpura de bromocresol como indicador. Las pruebas confirmatorias se realizaron utilizando aceite de oliva al 1% y rodamina B como indicador. La cuantificación de la actividad lipasa se determinó por medición del incremento de la absorbancia a 410 nm producido por la liberación del p-Nitrofenol como resultado de la hidrolisis de 1 mM del p-Nitrofenil palmitato en solución Tris-HCl 25 mM pH 8.8 a 28 °C por 10 min. Los resultados obtenidos en los ensayos de hidrólisis en placa con púrpura de bromocresol como indicador, mostraron un cambio de la coloración de púrpura a amarillo debido a la hidrolisis de la tributirina. En las placas de aceite-rodamina B, se observaron halos fluorescentes debido a la formación de ácidos grasos libres. Los resultados obtenidos de la actividad del complejo sobre el p-Nitrofenil palmitato evaluando la cantidad de p-Nitrofenol liberado en el transcurso del tiempo, mostraron una velocidad inicial de 2.87 µmol /mL. min cuando una concentración de 1 mM de p-Nitrofenil palmitato es utilizada.

Palabras Clave: *Artocarpus heterophyllus,* lipasas, látex complejo enzimático.

INTRODUCCIÓN

Las lipasas están ampliamente distribuidas en la naturaleza, y se encuentran en microorganismos, animales y plantas, catalizan la hidrólisis y la síntesis de ésteres formados a partir de glicerol y ácidos grasos. Actúan en la interface agua-lípido, por lo que no requieren sustratos especialmente solubles en agua, poseen alta especificidad y actúan en condiciones reacción moderada a pH entre 7 y 8, resultando ser una alternativa a los procesos químicos, debido a su eficiencia y que son amigables con el medio ambiente [1, 2, 3]. Con respecto a su estructura todas las enzimas lipolíticas presentan el plegamiento típico de las α/β hidrolasa, y la estructura comúnmente contiene una pequeña hélice α, conocida como tapa, la cual cubre al sitio activo. Esta conformación es llamada la conformación cerrada. Cuando la lipasa es adsorbida a una interfase, la tapa es desplazada para que el sitio activo se vuelva accesible al sustrato. Esta conformación es llamada la conformación abierta. La actividad funcional está dada por en la tríada de aminoácidos serina nucleofílica, un ácido aspártico/glutámico y una histidina [4].

Las lipasas más comúnmente utilizadas en la industria son las producidas a partir de microorganismo tales como hongos, levaduras y bacterias. Las lipasas de origen vegetal han sido poco estudiadas y constituyen un punto de partida en la generación de nuevo conocimiento en relación a sus propiedades catalíticas, lo que conduce a la posibilidad de utilizarse como catalizador potencial en la aplicación como aditivo en alimentos (modificación de los sabores), síntesis química (obtención de ésteres), detergentes (hidrólisis de grasas), pre-tratamiento de aguas residuales (descomposición y remoción de sustancias oleosas), en la industria cosmética y farmacéutica. Adicionalmente, las lipasas tienen importante aplicación en el campo de la bioenergía, especialmente en la producción de biodiesel, que es un sector en expansión, como resultado de la creciente demanda mundial del uso de energías renovables [5].

La jaca (*Artocarpus heterophyllus* L.) pertenece a la familia Moraceae, se cultiva ampliamente en regiones con clima tropical y produce látex en todas sus partes. La investigación de enzimas hidrolíticas en el látex, ha reportado la presencia de proteasas de interés en el área de la salud [6, 7]. La investigación, realizada por el grupo de investigadores de la Universidad Autónoma de Nayarit, identifico la presencia de un complejo enzimático con actividad de proteasa y lipasa [8]. Por lo que el objetivo del presente es evaluar la actividad del complejo lipolítico identificado en el látex de la jaca, *Artocarpus heterophyllus* L.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para realizar la evaluación bioquímica del complejo lipolítico se efectuaron una serie de procedimientos que incluyen la obtención del extracto crudo a partir del látex descartando los materiales insolubles.

Extracto crudo

El látex se obtuvo a partir del pedúnculo de los frutos de jaca, *Artocarpus heterophyllus L*. Se recuperó en tubos de centrifuga que contenían buffer de fosfato 0.2 M, ácido cítrico 0.1M, EDTA 5mM y cisteína 5mM, pH 6.4. La suspensión fue sometida a centrifugación en frio (4°C) a 9000 rpm por 20 minutos (HERMLE, Z 326 K, rotor 221.18), se descartaron los materiales insolubles obteniendo así el extracto crudo.
La separación de las proteínas se realizó por medio de cromatografía en columna (Econo-Column Bio-Rad) empacada con Sefinose Fast Flow *SF006-6F* (Bio Basic Inc.), la elución de proteínas se realizó con buffer Tris-HCl 25 mM, pH 8.8. La velocidad de flujo utilizada fue de 1ml/min.

Cuantificación de proteína soluble en el extracto crudo.

La cuantificación de proteína en el extracto crudo se realizó empleando el método de Bradford [9]. Utilizando el reactivo de Bradford (sigma-aldrich N°.Cat. B6916), se construyó una curva estándar BSA (albumina de suero bovino) en una concentración de 1mg/ml.

Caracterización de la actividad lipolítica.

La caracterización de la actividad lipolítica se realizó utilizando placas con agar al 1.5%, purpura de bromocresol como indicador, tributirina al 0.5% y tween 20 al 0.1% como sustrato, las placas fueron incubadas a temperatura ambiente (28 °C). Cada una de las fracciones obtenidas por cromatografía en columna, fueron utilizadas para identificar la presencia de actividad lipolítica.

Se realizó una prueba confirmatoria utilizando aceite de oliva al 1% y rodamina B como indicador [10]. El aceite se preparó al 1 % en buffer Tris-HCl pH 8.8 al cual se le añadió 0.1% de goma arábiga, agar (1.5%) y 0.001% de rodamina B, la actividad lipolítica fue probada en placa utilizando cada una de las fracciones obtenidas por columna. Las placas fueron colocaron a temperatura ambiente (28 °C). La actividad lipolítica se monitoreo irradiando las placas con luz Uv, tomando como positivas aquellas fracciones en las que se observó la presencia de halos fluorescentes de color naranja.

Se realizaron pruebas de hidrólisis utilizando p-Nitrofenil palmitato como sustrato [11]. Se preparó una solución de p-Nitrofenil palmitato 10 mM en 2-propanol, de ésta solución un volumen se diluyo con 9 volumenes de una solución amortiguadora de Tris-HCl 25 mM, pH 8.8 la cual contenía 0.4% de tritón X-100. Se depositó 100 µL de la solución de sustrato en una microplaca de 96 pocillos, se pre-incubo a 27

°C por 5 min. Para comenzar la reacción se añadió 100 µL del complejo enzimático (0.1mg/mL proteína, Tris-HCl 25 mM de pH 8.8), la absorbancia se midió a 410 nm cada minuto durante 10 min. La actividad se determinó midiendo la velocidad inicial de hidrólisis de p-Nitrofenil palmitato.

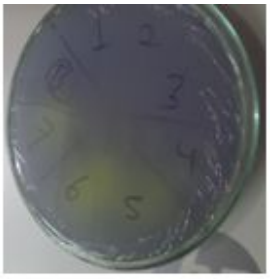
RESULTADOS

Contenido de proteínas totales

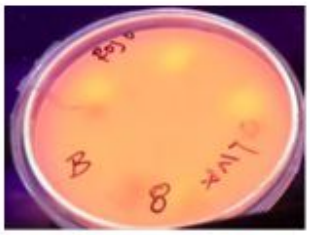
El contenido proteico en el extracto crudo obtenido a partir del látex de la jaca *Artocarpus heterophyllus* L. fue de 3.3 mg/mL.

Determinación de la actividad lipolítica

Los resultados obtenidos en los ensayos de hidrólisis en placa con púrpura de bromocresol como indicador, mostraron un cambio de la coloración de púrpura a amarillo, lo que permitió identificar las fracciones que presentaban la actividad lipolítica (Fig. 1 A). En las pruebas en las que se utilizó aceite de oliva y rodamina B como indicador se detectó la actividad de hidrolisis por la presencia de halos fluorescentes (Fig. 1 B).



A)



B)

Fig. 1A. Actividad de hidrólisis de tributirina: cambio de púrpura a amarillo. Fig.1B. Actividad de hidrólisis de triglicéridos presentes en el aceite de oliva. Presencia de halos fluorescentes.

Método p-Nitrofenil palmitato

La actividad enzimática medida en µmoles (Tabla N°1) se determinó a partir de la construcción de una curva estándar de p-Nitrofenol. Los datos obtenidos muestran que la velocidad inicial (Vo) es de 2.87 µmol/ml-min cuando se utiliza una concentración de 1mM del sustrato p-Nitrofenil palmitato.

Tabla. N° 1 µmol/min p-Nitrofenol liberado por el complejo enzimático.

tiempo (min)	µmol p-Nitrofenol
1	24.8835
2	25.2718
3	25.6602
4	26.2427
5	26.6311

6	27.0194
7	27.6019
8	27.8932
9	28.3786
10	28.7670

DISCUSIÓN

El método en placa es ampliamente utilizado por la rapidez con la que se puede identificar la presencia de actividad lipolítica. Como resultado se observó que en el método en placa utilizando púrpura de bromocresol como indicador, a las 4 h presentó cambio de color de púrpura a amarillo debido a la alteración del pH del medio cuando ocurre la hidrólisis del sustrato tributirina, Fig. 1A. En el método donde rodamina B fue utilizado como indicador y aceite de oliva como sustratos, se observaron halos fluorescentes de color naranja en zonas donde ocurrió la liberación de ácidos grasos según lo describen Kouker y Jaeger [10] (Fig.1. B), esto sugiere la posibilidad de que el complejo lipolítico sea capaz de actuar sobre ácidos grasos de cadena larga presentes en el aceite [12, 13]. Son diversos los métodos aplicados en el estudio de la actividad lipasa, incluso para determinar la especificidad por sustrato se han probado diferentes ésteres de p-Nitrofenol de cadena corta-media y larga; p-Nitrofenil acetato, p-Nitrofenil butirato, p-Nitrofenil caprilato, p-Nitrofenil laurato, p-Nitrofenil miristato y p-Nitrofenil palmitato [14]. Las lipasas son principalmente activas sobre sustratos insolubles en agua, tales como triglicéridos compuestos por ácidos grasos de cadena larga, mientras que las esterasas hidrolizan preferentemente ésteres simples, y por lo general solo triglicéridos compuestos de ácidos grasos de cadena corta. Las lipasas se pueden distinguir de las esterasas por la gama de sustrato hacia la cual presentan especificidad, tal es el caso del uso de p-Nitrofenil palmitato (lipasas) frente a p-Nitrofenil butirato hidrolizado por esterasas, tal como lo menciona Bornscheuer, (2002) [15]. En contraste, de acuerdo a los resultados obtenidos respecto a la capacidad del complejo lipolítico del látex de la jaca para hidrolizar triglicéridos presentes en el aceite de oliva, en conjunto con los resultados obtenidos en el método donde p-Nitrofenil palmitato fue utilizado como sustrato (Vo 2.87 µmol/ml-min), conducen a la actividad lipasa (no solo actividad esterasa). En un estudio en donde se reporta una lipasa del látex de *Araujia sericifera*, no se detectó actividad de hidrólisis cuando p-Nitrofenil palmitato fue utilizado como sustrato, no obstante, cuando se utilizaron otros ésteres de p-Nitrofenol de menor tamaño (número de carbonos) como el p-Nitrofenil butirato y p-Nitrofenil laurato se encontró actividad de hidrólisis, obtuvieron la mayor actividad con p-Nitrofenil butirato para lo cual describen que cuanto mayor sea el tamaño del éster, mayor será el impedimento estérico, es decir, habrá mayor dificultad para que el sitio activo de la lipasa tenga acceso al sustrato, según lo demuestra Di Santo [16]. Por otra parte, en otro estudio realizado reportan una lipasa de *Thermomyces lanuginosus* que mostró una velocidad inicial de hidrólisis de p-Nitrofenil palmitato mayor a 6 µmol/min cuando una concentración de 0.1 mg de enzima comercial es utilizada [17]. En nuestro estudio se ha utilizado una concentración de 0.1 mg de enzima purificada a homogeneidad, por tanto la actividad estará dada por las condiciones de reacción, tipo de enzima que se utiliza y tipo de sustratos.

AGRADECIMIENTOS
Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y al Laboratorio de Análisis Especiales de la Unidad de Tecnología de Alimentos, por las facilidades proporcionadas para realizar los experimentos.

REFERENCIAS

[1] Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U. C. (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipases. Biotechnology advances, 19(8), 627-662.

[2] Lehninger, A. L. (2009). Principios de Bioquímica. Barcelona, España. Omega, 1296 p.

[3] Domínguez M, B., Tuin, G., Bargeman, A., Van Der M, R., Van G, J. (2006). Biotechol. 126, 140-151.

[4] Mogensen, J.E., Sehgal, P., Otzen, D.E. (2005). Activation, inhibition, and destabilization of Thermomyces lanuginosus lipase by detergents. Biochemistry 44(5): 1719-1730.

[5] Salihu, A., Alam, M. Z., Abdul Karim, M. I., Salleh, H. M. (2012). Caracterization of Candida cylindracea lipase produced from palm oil mill effluent based medium IJCBS, 2(2012):24-31

[6] Prasad, K., Virupaksha, T. (1990). Purification and characterization of a protease from jackfruit latex. Phytochem. 29:1763–1766.

[7] Siritapetawee, J., Thammasirirak, S., Samosornsuk, W. (2012). Antimicrobial activity of a 48-kDa protease (AMP48) from *Artocarpus heterophyllus* latex. Eur. Rev. Med. 426 Pharmacol. Sci. 16:132–137.

[8] Martínez G, M. E., (2013). Identificación y caracterización de las proteínas con actividad de proteasa y lipasa del látex de Jaca (*Artocarpus Heterophyllus L.)* Tesis de Maestría en Ciencias Agrícolas, CBAP-UAN.

[9] Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analyt. Biochem. 72:248-254.

[10] Kouker, G. y Jaeger, K.(1987). Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. Applied and environmental microbiology, 53(1), 211-213.

[11] Winkler UK, Stuckmann M. (1979). Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by Serratia marcescens. J Bacteriol;138:663–70.

[12] Carissimi, M. Stopiglia, C. Souza, T. Corbellini, V. Scroferneker, M. (2007). Comparison of lipolytic activity of Sporothrix schenckii strains utilizing olive oil-rhodamine B and tween 80. Tecno-Lógica, 11, 33-36.

[13] Samad, M. Razak, C. N. Salleh, A. Yunus, W. Ampon, K., Basri, M. (1989). A plate assay for primary screening of lipase activity. Journal of microbiological methods, 9(1), 51-56.

[14] Bendikienė, V., Juodka, B., Surinėnaitė, B., Dienys, G. (2008). Lipases in conversion of oils. Experimental screening of enzymes and substrates for biodiesel production. biologija, 4, 247-252.

[15] Bornscheuer, U. (2002). Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. FEMS Microbiology Reviews, v. 26, n. 1, p. 73-81. PMid: 12007643

[16] Di Santo, P., Fait, M.E., Foresti, M. L., Morcelle, S. R. (2014). Biocatalytic characterization of a naturally immobilized lipase found in Araujia sericifera Brot.(Apocynaceae) latex. Catalysis Science Technology, 4(5), 1386-1394.

[17] Cruz, B. R., Ríos, L. J., García, Y. G., Antonio, J., de la Garza, R., Rodríguez, J. (2011). Immobilization of Thermomyces lanuginosus Lipase in PVA-alginate Beads. Journal of the Mexican Chemical Society, 55(3), 176-180.

DETERMINATION OF THE INFLUENCE OF THREE PROCESS VARIABLES IN OSMOTIC DEHYDRATION OF *Granny Smith* APPLE CUBES

(Determinación de la influencia de tres variables de proceso en la deshidratación osmótica de cubos de manzana *Granny Smith)*

Marcos Antonio Godoy Zaragoza[a*+], Jesús Cervantes Martínez[a], Jorge Alberto García Fajardo[a]

[a] Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C., Camino El Arenero #1227, CP 45019, Col. El Bajío del Arenal, Zapopan, Jalisco, México.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: mgodoy@ciatej.mx

Área del Conocimiento: Biotecnología Alimentaria.

ABSTRACT
Osmotic dehydration is the partial removal of water by direct contact of plant tissue with hypertonic solutions. Mass transfer during osmotic dehydration is complex due to the nature of the plant tissue and the number of process variables that affect the system. The objetive of this work was to determine the variables that have the greatest impact on mass transfer in the process and their interrelationships. Granny Smith apple cubes of 3/8 pg were immersed in sucrose syrup. The factors studied were the concentration of syrup, syrup-fruit ratio and immersion time and its effect on the final moisture content of the fruit, water activities and final concentration in fruit and syrup. An 2^3 experimental factorial design with center point was used and analyzed with Statgraphics Centurion XV. It was found that the initial concentration of syrup influenced all response variables as time factor influenced only water activities and fruit syrup and the final moisture of the sample. However, interactions of the variables studied had a significant effect the ºBx of fruit. With these results we can generate further study to optimize an industrial process of osmotic dehydration of apple.

Keywords: Osmotic dehydration; mass transfer; apple.

RESUMEN
La osmodeshidratación es la eliminación parcial del agua de tejidos vegetales mediante contacto directo con soluciones hipertónicas. La transferencia de masa que ocurre durante la deshidratación osmótica es compleja debido a las variables que inciden en el proceso. El objetivo de este trabajo es el de determinar las variables que tienen mayor incidencia en la transferencias de masa en el proceso y sus interrelaciones. Se utilizó como materia prima manzana *Granny Smith* en cubos de 3/8 pg y soluciones de azúcar como jarabe de inmersión. Los factores estudiados fueron la concentración de jarabe, relación jarabe-fruta y el tiempo de inmersión y sus efectos en la humedad final de la fruta, actividades de agua y ºBx finales en fruta y jarabe. Se utilizó un diseño experimental 2^3 con punto central, por triplicado. Se utilizó el software Statgraphics Centurion XV para el análisis experimental. Se encontró que la concentración inicial del jarabe influenció en todas las variables de respuesta, mientras que el factor tiempo solo influenció en las actividades de agua de jarabe y fruta y en la humedad final de la muestra. En cambio, las interacciones de las variables estudiadas, tuvieron un efecto significativo los ºBx de la

fruta. Con estos resultados se puede generar un estudio posterior para optimizar un proceso industrial de osmodeshidratación de manzana.

Palabras Clave: Deshidratación osmótica; Transferencia de masa; Manzana.

INTRODUCCIÓN

La inclusión de frutas y vegetales en la dieta diaria son muy recomendables para mantener un buen estado de salud y nutrición. Principalmente las frutas se consumen tanto frescas como procesadas en diferentes productos: jugos, mermeladas, jaleas, deshidratados, principalmente. Desde este punto de vista es deseable desarrollar productos novedosos a partir de frutas, que tengan alta calidad, que sean atractivos y que satisfagan una necesidad del mercado.

La deshidratación de frutas es un método de conservación muy conocido debido a que se elimina una gran cantidad de agua y se baja su actividad de agua, reduciendo el riesgo de crecimiento microbiano. Las frutas secas son ampliamente usadas como ingredientes en muchas formulaciones de alimentos como en repostería, productos de confitería, helados, postres congelados y yogurts [1]. En años recientes se le ha dado mucha importancia a la calidad de los alimentos durante el deshidratado. La calidad del producto deshidratado puede ser afectado por los cambios que ocurren en el tejido, ya sea debido al método de secado o a los cambios fisicoquímicos que ocurren durante su procesamiento [2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9].

Existen diversos métodos para deshidratar un alimento que le imparten diferentes características y efectos. Con la liofilización (freeze drying) se producen productos porosos de muy alta calidad, matrices con una alta retención de aromas y con buenas propiedades de rehidratación [10]. Con el secado a alta temperatura y tiempos largos se puede causar daño a las características nutricionales y sensoriales, afectando el sabor, color y los nutrientes de los alimentos deshidratados [11, 12].

Una manera de producir frutas deshidratadas de buena calidad es usar tratamientos previos a la deshidratación, con el objetivo de obtener productos con características organolépticas muy similares a los productos frescos originales [13]. La aplicación de una infusión de azúcar como pretratamiento, puede afectar significativamente el intercambio de agua y soluto, con la consecuente depresión parcial de la actividad de agua antes de la etapa de deshidratación, a esto se le llama deshidratación osmótica.

La deshidratación osmótica es un proceso de remoción de agua, el cual se basa en la inmersión de trozos de fruta fresca en una solución con una presión osmótica más alta, y por consecuencia con una actividad de agua más baja que el alimento [13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20] previniendo el oscurecimiento no enzimático, disminuyendo la actividad enzimática y disminuyendo el colapso estructural en procesos posteriores como el secado por aire caliente [21, 22, 23].

Este proceso osmótico también permite infusionar dentro del producto no solamente los que se usan para controlar la actividad de agua (principalmente azúcar para el caso de frutas) sino cualquier soluto que sirva para mejorar la calidad sensorial y nutricional (agentes antipardeamiento, compuestos bioactivos o agentes para mejorar o mantener la firmeza y la estabilización de los pigmentos). Así, es posible cambiar, hasta cierto punto, la formulación del sistema del alimento, haciéndolo más conveniente para la transformación posterior [24]. Seleccionando apropiadamente el método de secado en la segunda etapa y sus condiciones de operación, se puede controlar la calidad del producto final. En las investigaciones en deshidratación osmótica normalmente se utilizan relaciones altas de Jarabe/fruta (≥ 10) [25, 26] para hacer despreciable el efecto de la concentración final de los jarabes utilizados, sin

embargo, a nivel industrial, esto no es factible económicamente debido a que los jarabes tienen que ser desechados.

El objetivo de este trabajo fue el de determinar la influencia de la concentración del jarabe, la relación jarabe/fruta y el tiempo de proceso en la transferencia de masa a la fruta medido como humedad y ^{o}Bx a una relación más adecuada para ser utilizada industrialmente.

METODOLOGÍA

A manzanas *Granny Smith* se les eliminó la cáscara mediante pelador de acero inoxidable, se cortaron en cuartos y se cubicaron utilizando un procesador de alimentos marca Hobart, modelo FP100 a un tamaño de 3/8 de pg. Las variables estudiadas fueron: Concentración de azúcar en Jarabe, relación jarabe/fruta (g/g) y tiempo de inmersión. El experimento se realizó mediante un diseño 2^3 con punto central por triplicado (ver tabla 1). Se prepararon jarabes con azúcar comercial a 30, 55 y 42.5 ^{0}Bx. La relación jarabe/fruta fue de 2, 10 y 6 (g/g). Las muestras de manzana cubicadas fueron colocadas en recipientes a temperatura ambiente durante tiempos de 30, 75 y 120 min de inmersión.

Tabla 1
Diseño experimental

BLOQUE	Concentración Jarabe ^{o}Bx	Relación Jarabe:Fruta g/g	Tiempo min
1	30.0	2	30
1	55.0	10	120
1	55.0	10	30
1	30.0	2	120
1	55.0	2	30
1	55.0	2	120
1	42.5	6	75
1	30.0	10	120
1	30.0	10	30
2	30.0	2	30
2	55.0	10	120
2	55.0	10	30
2	30.0	2	120
2	55.0	2	30
2	55.0	2	120
2	42.5	6	75
2	30.0	10	120
2	30.0	10	30
3	30.0	2	30
3	55.0	10	120
3	55.0	10	30
3	30.0	2	120
3	55.0	2	30
3	55.0	2	120
3	42.5	6	75
3	30.0	10	120
3	30.0	10	30

La humedad de la fruta se determinó mediante el método indicado en la "Norma NMX-F083-1986 Determinación de humedad en productos alimenticios". La actividad de agua se determinó mediante un Aqualab Dew Point Water Activity Meter Modelo 4TEV. Los ^{0}Bx se determinaron mediante un brixómetro ATAGO Packef.

RESULTADOS

Las variables de respuesta del diseño experimental fueron: Concentración de azúcar en el jarabe al finalizar el proceso (Conc. final jarabe), la actividad de agua del jarabe al finalizar el proceso (aw jarabe final), La humedad de la fruta procesada (Humedad fruta final), así como los efectos en la actividad de agua y el contenido se sacarosa en el producto final (aw fruta final y Sacarosa fruta final, respectivamente), los resultados experimentales obtenidos se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Resultados experimentales

BLOQUE	Concentración Jarabe °Bx	Relación Jarabe:Fruta g/g	Tiempo min	Conc. final jarabe °Bx	aw jarabe final	Humedad Fruta final %	Sacarosa Fruta final °Bx	aw fruta final
1	30.0	2	30	27.9	0.9784	81.35	24.3	0.9827
1	55.0	10	120	52.6	0.9273	63.30	27.0	0.9381
1	55.0	10	30	53.4	0.9245	70.80	43.0	0.9548
1	30.0	2	120	26.3	0.9792	79.65	25.2	0.9776
1	55.0	2	30	47.1	0.9428	70.15	44.4	0.9517
1	55.0	2	120	34.9	0.9488	65.15	43.8	0.9517
1	42.5	6	75	40.4	0.9594	71.85	38.7	0.9651
1	30.0	10	120	29.4	0.9769	77.20	27.4	0.9723
1	30.0	10	30	29.4	0.9764	78.75	27.3	0.9772
2	30.0	2	30	27.2	0.9768	80.00	25.4	0.9741
2	55.0	10	120	52.4	0.9278	62.05	48.7	0.9350
2	55.0	10	30	53.3	0.9223	67.75	48.1	0.9617
2	30.0	2	120	25.8	0.9783	79.00	25.7	0.9816
2	55.0	2	30	48.2	0.9434	71.30	40.4	0.9653
2	55.0	2	120	45.0	0.9451	71.45	43.3	0.9576
2	42.5	6	75	40.6	0.9577	73.50	35.8	0.9707
2	30.0	10	120	29.0	0.9780	76.25	28.4	0.9748
2	30.0	10	30	29.4	0.9755	80.20	24.0	0.9849
3	30.0	2	30	27.4	0.9778	79.15	26.0	0.9787
3	55.0	10	120	52.7	0.9289	61.70	48.5	0.9446
3	55.0	10	30	30.1	0.9249	69.55	43.3	0.9570
3	30.0	2	120	26.4	0.9802	74.90	25.9	0.9813
3	55.0	2	30	47.2	0.9423	71.70	45.1	0.9551
3	55.0	2	120	44.2	0.9482	65.90	42.9	0.9526
3	42.5	6	75	40.5	0.9584	72.95	38.1	0.9640
3	30.0	10	120	29.2	0.9778	76.95	27.8	0.9821
3	30.0	10	30	29.6	0.9811	79.50	28.8	0.9844

DISCUSIONES

Análisis para la actividad de agua (aw) de la fruta

En la tabla 3 nos indica que hay 6 efectos que son estadísticamente significativas, ya que tienen un valor-p menor que 0.05, esto es con un nivel de confianza del 95%.

Tabla 3. Análisis de Varianza para aw fruta

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
A:conc jarabe	0.00444176	1	0.00444176	262.90	0.0000
B:relación jarabe fruta	0.0000774004	1	0.0000774004	4.58	0.0463
C:tiempo	0.000255454	1	0.000255454	15.12	0.0011
AB	0.0000752604	1	0.0000752604	4.45	0.0491
AC	0.000120154	1	0.000120154	7.11	0.0157
BC	0.0001921	1	0.0001921	11.37	0.0034
bloques	0.0000756674	2	0.0000378337	2.24	0.1354
Error total	0.000304113	18	0.0000168952		
Total (corr.)	0.00554191	26			

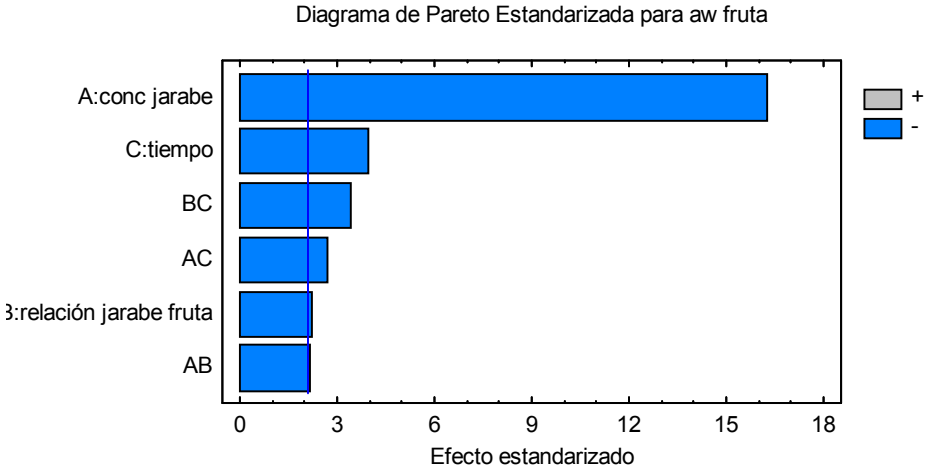


Fig. 1. Pareto de efectos estimados para aw fruta

En la Gráfica 1 se muestra que la concentración jarabe, tiempo, relación jarabe fruta, y las combinaciones de relación jarabe fruta contra tiempo, concentración jarabe contra tiempo son estadísticamente significativas y que tienen influencia sobre la aw de la fruta.

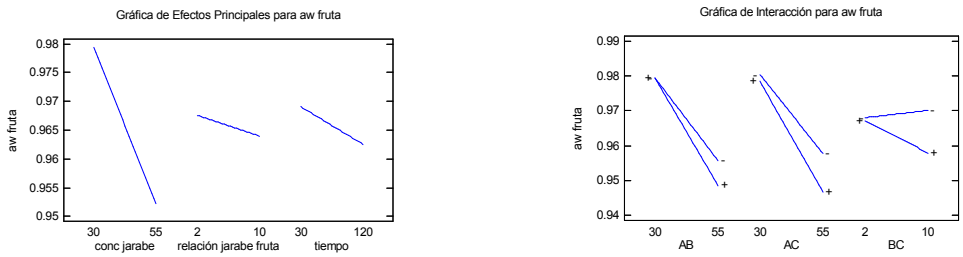


Fig 2. Gráficas de efectos principales y sus interacciones para aw de fruta

En la Fig. 2. Se observa que la concentración del jarabe es el que mayor efecto tiene en la aw de la fruta y esta se potencia con la relación Jarabe/fruta.

Análisis para la actividad de agua (aw) en el jarabe.

El análisis de varianza para la variable de respuesta aw jarabe, presentado en la tabla 4, se observa que hay 5 efectos que son estadísticamente significativas, ya que tienen un valor-p menor que 0.05, esto es con un nivel de confianza del 95%. Es irrelevante la interacción de la variable relación jarabe/fruta con el tiempo.

Tabla 4. Análisis de Varianza para aw jarabe

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
A:conc jarabe	0.0108418	1	0.0108418	5841.74	0.0000
B:relación jarabe fruta	0.000599	1	0.000599	322.75	0.0000
C:tiempo	0.0000382537	1	0.0000382537	20.61	0.0003
AB	0.00050325	1	0.00050325	271.16	0.0000
AC	0.0000192604	1	0.0000192604	10.38	0.0047
BC	0.00000165375	1	0.00000165375	0.89	0.3577
bloques	0.0000121607	2	0.00000608037	3.28	0.0612
Error total	0.0000334064	18	0.00000185591		
Total (corr.)	0.0120487	26			

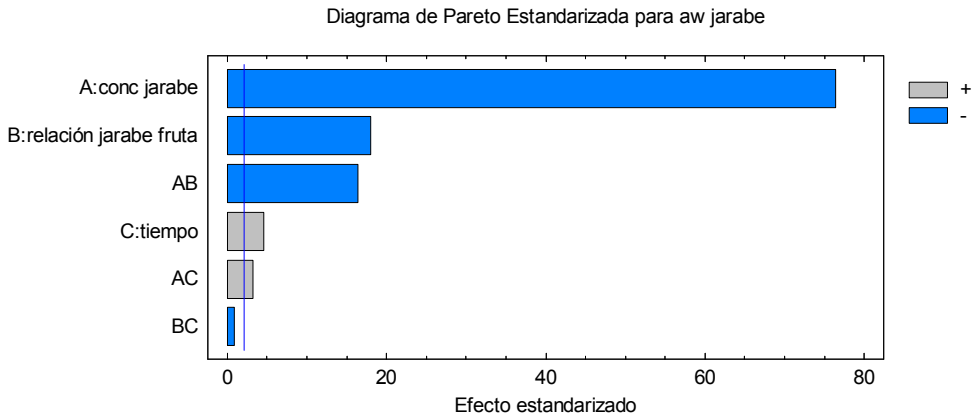


Fig. 3. Pareto de efectos estimados para aw jarabe

La Fig. 3, muestra que la concentración del jarabe, la relación jarabe/fruta, el tiempo, y las combinaciones de los efectos AB y AC, son estadísticamente significativas ya que están sobre la línea de confiabilidad.

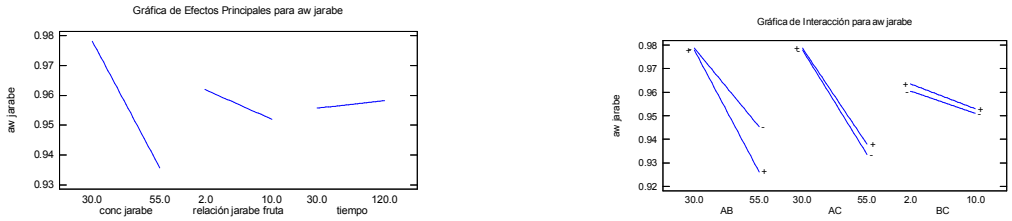


Fig 4. Gráficas de efectos principales y sus interacciones para aw del jarabe

En la Fig. 4, se observa que el efecto que más influencia en la aw del jarabe lo promueve la concentración de jarabe del baño osmótico, mientras que en cuanto a interacciones, la que tienen una mayor interacción significativas son las líneas AB que son las de concentración jarabe contra relación jarabe fruta y AC que son concentración jarabe contra tiempo.

Análisis para la concentración final jarabe (°Bx).

En la tabla 5, Para esta variable de respuesta, y de acuerdo al ANOVA, se puede decir que sólo la concentración del jarabe es estadísticamente significativo en la influencia en los °Bx en el jarabe al final del proceso.

Tabla 5. Análisis de Varianza para concentración final jarabe

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
A:conc jarabe	2092.53	1	2092.53	79.62	0.0000
B:relación jarabe fruta	76.6837	1	76.6837	2.92	0.1048
C:tiempo	0.220417	1	0.220417	0.01	0.9280
AB	6.93375	1	6.93375	0.26	0.6137
AC	2.22042	1	2.22042	0.08	0.7746
BC	75.2604	1	75.2604	2.86	0.1078
bloques	31.3341	2	15.667	0.60	0.5615
Error total	473.056	18	26.2809		
Total (corr.)	2758.24	26			

En la tabla (14) nos indica que los factores analizados tienen correlación entre sí, dado que tienen un valor de 1 en manera diagonal. En la fila y columna 8 y 9 nos da un valor de -0.5 esto nos quiere decir que tenga alguna dificultad para separar los efectos uno de otros al analizar los dato. Para reducir las correlaciones hay que considerar agregar corridas al diseño.

En la tabla (15) se muestra la información acerca de los valores de concentración final jarabe generadas mediante el análisis. El cual también tiene como función de predecir y agregar pronósticos a la tabla, aunque el modelo original no se verá afectado.

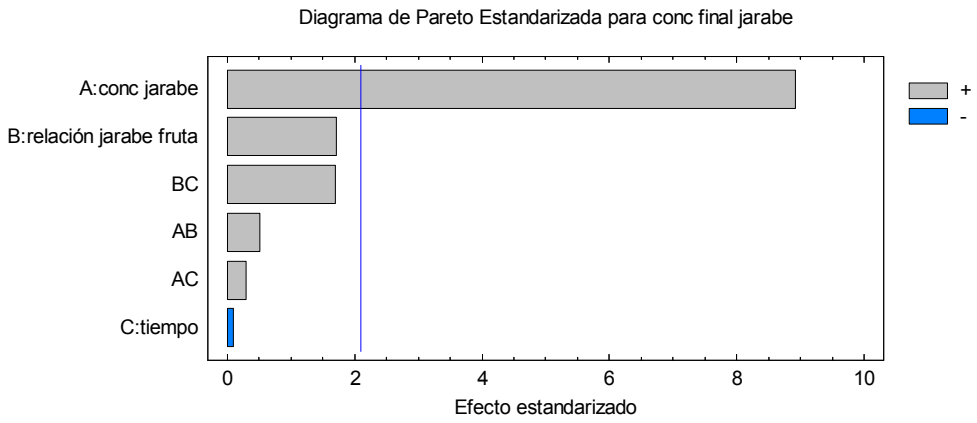


Fig 5. Pareto de efectos estimados para la concentración final del jarabe

La Fig. 5 muestra que la concentración del jarabe es estadísticamente significativo ya que esta sobre la línea de confiabilidad. Esto se comprueba en la Fig. 6., mientras que las interacciones AC y BC tienen una influencia significativa en la variable de respuesta.

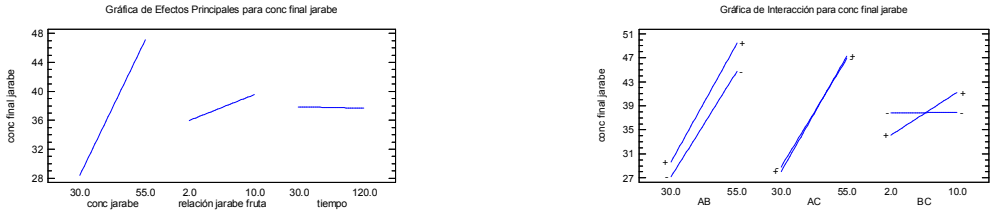


Fig. 6. Gráficas de efectos principales y sus interacciones para concentración final del jarabe

Análisis para °Bx en fruta.

Al igual que en el análisis de ANOVA de la variable de respuesta anterior, la concentración de jarabe es el que más influencía estadísticamente, ver tabla 6, ya que tiene un valor-p menor que 0.05, con un nivel de confianza del 95%.

Tabla 6. Análisis de Varianza para °Bx en fruta

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
A:conc jarabe	1705.22	1	1705.22	88.10	0.0000
B:relación jarabe fruta	4.08375	1	4.08375	0.21	0.6515
C:tiempo	1.26042	1	1.26042	0.07	0.8015
AB	6.51042	1	6.51042	0.34	0.5691
AC	9.00375	1	9.00375	0.47	0.5039
BC	2.60042	1	2.60042	0.13	0.7182
Bloques	38.2719	2	19.1359	0.99	0.3914
Error total	348.383	18	19.3546		
Total (corr.)	2115.33	26			

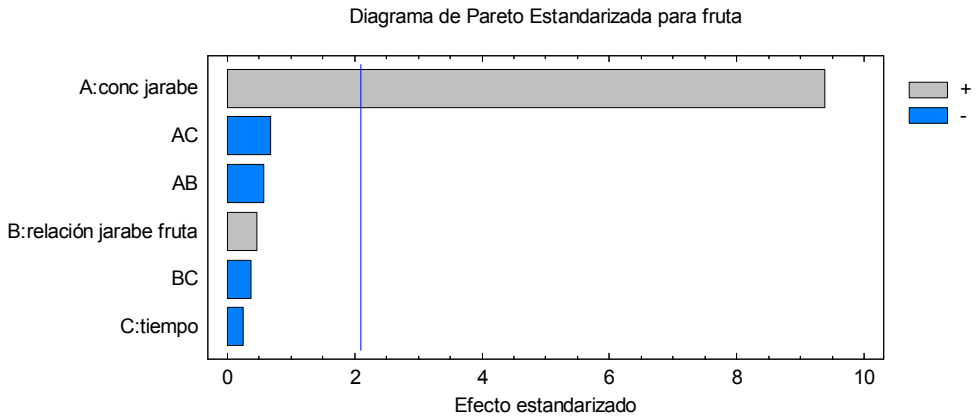


Fig 7. Pareto de efectos estimados para la concentración de fruta (°Bx)

El Diagrama de Pareto (Fig. 7) muestra que lo que es concentración jarabe es estadísticamente significativo ya que esta sobre la línea de confiabilidad.

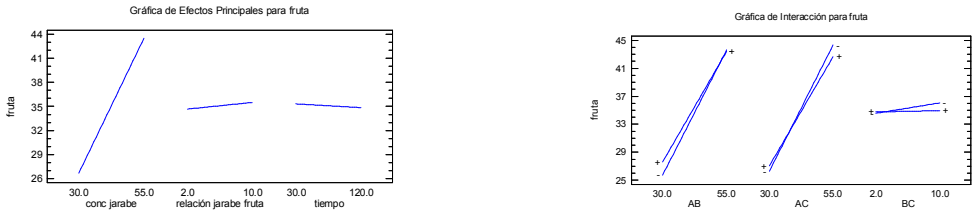


Fig. 8. Gráficas de efectos principales y sus interacciones para concentración final °Bx en fruta

En la Fig. 8, se observa que el mayor efecto lo promueve la concentración de jarabe, sin embargo todas las interacciones tienen influencia significativa en esta variable de respuesta.

Análisis para humedad de fruta %

Tabla 7. Análisis de Varianza para humedad en fruta

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
A:conc jarabe	727.1	1	727.1	268.22	0.0000
B:relación jarabe fruta	27.5204	1	27.5204	10.15	0.0051
C:tiempo	90.8704	1	90.8704	33.52	0.0000
AB	9.75375	1	9.75375	3.60	0.0740
AC	11.6204	1	11.6204	4.29	0.0531
BC	5.51042	1	5.51042	2.03	0.1711
bloques	4.82741	2	2.4137	0.89	0.4278
Error total	48.7947	18	2.71082		
Total (corr.)	925.998	26			

En la tabla 7, nos recalca que hay tres efectos que son estadísticamente significativas que es la concentración de jarabe, relación jarabe fruta y tiempo, ya que tienen un valor-p menor que 0.05, esto es con un nivel de confianza del 95%.

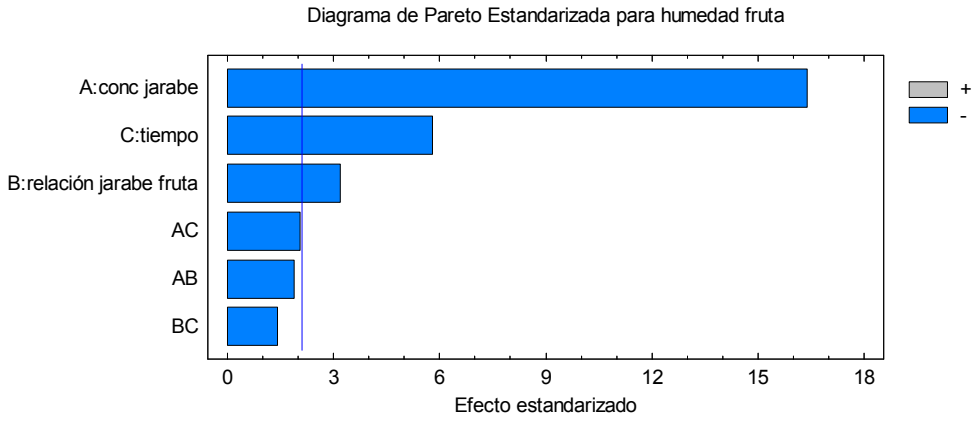


Fig 9. Pareto de efectos estimados para la humedad de fruta

El diagrama de Pareto representado en la Fig. 9 indica que las tres variables independientes evaluadas inciden en la variable de respuesta significativamente

El diagrama muestra que lo que es concentración jarabe, tiempo y relación jarabe fruta son estadísticamente significativas ya que están sobre la línea de confiabilidad.

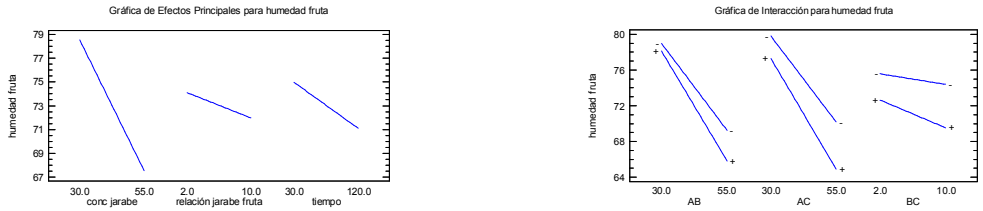


Fig. 10. Gráficas de efectos principales y sus interacciones para humedad en fruta

En la Fig. 10 se concluye que la concentración de jarabe tiene la mayor influencia en el factor de humedad de fruta. Las interacciones entre factores no tienen influencia significativa en esta variable de respuesta

CONCLUSIONES

En el análisis realizado, se puede llegar a la conclusión de que los factores que mayormente influenciaron en las variables de respuestas fueron la concentración de jarabe con influencias significativas en las 5 variables de respuestas. El factor relación jarabe/fruta influye en los factores aw del jarabe y en humedad de la fruta. El factor Tiempo tuvo influencia en la aw del jarabe, humedad y aw de la fruta.

De manera resumida, los efectos de los factores se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Efectos de los factores e interacciones en las variables de respuesta.

SIMBOLO DEL FACTOR	FACTORES	VARIABLES DE RESPUESTAS				
		CONC.FINAL JARABE °Bx	AW JARABE	HUMEDAD FRUTA %	AW FRUTA	FRUTA °Bx
C.J	CONC.JARABE	+	+	+	+	+
Rj.f	RELACIÓN JARABE FRUTA	-	+	+	-	-
T	TIEMPO	-	+	+	+	-
	INTERACCIONES					
	C.J : Rj.f	-	+	-	+	+
	C.J : T	+	+	-	-	+
	Rj.f : T	+	-	-	-	+

+: Influye significativamente
-: No influye significativamente

REFERENCIAS

[1] Mandala, I.G., Anagnostaras, E.F., Oikonomou, C.K. (2005). Influence of osmotic dehydration conditions on Apple air-drying kinetics and their quality characteristics. Journal of Food Engineering, 69(3), 307-316.

[2] Askari, G.R., Emam-Djomeh, Z., & Mousavi, S.M. (2006) Effects of combined coating and microwave assisted hot-air drying on the texture, microstructure and rehydration characteristics of apple slices. Food Science and Technology International 12(1), 39-46.

[3] Funebo, T., Ahrné, L., Kidman, S., Langton, M., & Sköldebrand, C. (2000). Microwave heat treatment of apple before air dehydration – Effects on physical properties and microstructure. Journal of Food Engineering 46, 173-182.

[4] Jaya, S., & Durance, T.D. (2009). Compressive characteristics of celular solids produced using vacuum and hot-air dehydration. Journal of Porous Materials 16, 47-58.

[5] Khalloufi, S., & Ratti, C. (2003). Quality deterioration of freeze-dried foods as explained by their glass transition temperature and internal structure. Journal of Food Science 68(3), 892-902.

[6] Krokida, M.K., Maroulis, Z.B., & Saravacos, G.D. (2001). The effect of the method of drying on the colour of dehydrated products. International Journal of Food Science and Technology 36, 53-59.

[7] Lombard, G.E., Oliveira, J.C., Fito, P., Andrés, A. (2008). Osmotic dehydration of pineapple as a pre-treatment for further drying. Journal of Food Engineering 85, 277-284.

[8] Ochoa-Martínez, L.A., García-Quintero, M., Morales-Castro, J., Gallegos-Infante, A., Martínez-Sánchez, C.E., Herman-Lara, E. (2006). Effect of $CaCl_2$ and convective-osmotic drying on texture and preference of apple. Journal of Food Quality. 29, 583-595.

[9] Mujumdar, A.S., Law, C.L. 2010. Drying Technology: trends and applications in postharvest processing. Food and Bioprocess Technology. 3, 843-852. DOI: 10.1007/s11947-010-0353-1.

[10] Le Loch-Bonazi, C., Wolf, E., Gilbert, H. (1992). Quality of dehydrated cultivated mushrooms (*Agaricus bisporus*): a comparision between different drying and freeze drying process. Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie, 25, 334-339.

[11] Lenart, A. (1996). Osmo-convective drying of fruits and vegetables: Technology and application. Drying Technology, 14, 391-413.

[12] Lin, T.M., Durance, T.D., Scaman, C.H. (1998). Characterization of vacuum microwave, air and freeze dried carrot slices. Food Research International, 31, 111-317.

[13] Villalpando-Guzmán, J.; Herrera-López, E.J., Amaya-Delgado, L., Godoy-Zaragoza, M.A., Mateos-Díaz, J.C., Rodríguez-González, J., Jaubert-Garibay, S. (2011). Effect of complementary microwave drying on three shapes of mango slices. Revista Mexicana de Ingeniería Química. Vol. 10, No 2, 281-290.

[14] Abbasi Souraki, B., Ghaffari, A., Bayat, Y. (2012). Mathematical modeling of moisture and solute diffusion in the cylindrical green bean during osmotic dehydration in salt solution. Food and Bioproducts Processing 90, 64-71.

[15] Ruiz-López, I.I., Ruiz-Espinosa, H., Herman-Lara, E., Zárate-Castillo, G. (2011). Modeling of kinetics, equilibrium and distribution data of osmotically dehydrated carambola (*Averrhoa carambola* L.) in sugar solutions. Journal of Food Engineering 104, 218-226.

[16] Arballo, J.R., Campañone, L.A., Masheroni, R,H. (2010). Simulación numérica de la deshidratación de frutas por métodos combinados: secado por impregnación y microondas. Mecánica Computacional XXIX, 8197-8212.

[17] Ayala-Aponte, A.A., Giraldo-Cuartas, J.G., Serna-Cock, L. (2010). Cinéticas de Deshidratación Osmótica de Pitahaya Amarilla (*Selenicereus megalanthus*). INTERCIENCIA. Vol. 35 N° 7, 539-544.

[18] Ispir, A., Turk-Togrul, Inci. (2009). Osmotic dehydration of apricot: Kinetics and the effect of process parameters. Chemical Engineering Research and Design. 87, 166-180.

[19] Konopacka, D., Jesionkowska, K., Klewicki, R., Bonazzi, C. (2009). The effect of different osmotic agents on the sensory perception of osmo-treated dried fruit. Journal of Horticultural Science & Biothechnology ISAFRUIT Special Issue 80-84.

[20] Mayor, L., Pisarra, J., Sereno, A.M. (2008). Microestructural changes during osmotic dehydration of parenchymatic pumkin tissue. Journal of Food Engineering 85, 326-339.

[21] Amizadeh, R., Sargolzaei, J., Abarzani, M. (2011). Preserving Melons by Osmotic Dehydration in a Ternary System Followed by Air-Drying. Food Bioprocess Technol. ORIGINAL PAPER. DOI 10.1007/s11947-010-0488-0.

[22] Sosa, N., Salvatori D., Schebor, C. (2010). Physico-Chemical and Mechanical Properties of Apple Disks Subjected to Osmotic Dehydration and Different Drying Methods. Food Bioprocess Technol. ORIGINAL PAPER. DOI 10.1007/s11947-010-0488-4.

[23] Pani, P., Signorelli, M., Schiraldi, A. (2010). Osmo-dehydration of apple pulp studied by means of classical and Knudsen thermogravimetric approach. J. Therm Anal Calorim. 102, 383-390

[24] Torreggiani, D., Bertolo, G. (2001). Osmotic pre-treatments in fruit processing: Chemical, physical and structural effects. Journal of Food Engineering, 49 (2-3), 247-253.

[25] Shi, J., Le Maguer, M. (2002a). Analogical celular structure changes in solid-liquid contacting operations. Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie 35, 444-451.

[26] Shi, J., Le Maguer, M. (2002b). Osmotic dehydration of foods: mass transfer and modeling spects. Food Reviews International 18(4), 305-335.

MOLECULAR GENETIC DIVERSITY AND ITS ASSOCIATION WITH PROTEIN AND STARCH CONTENT IN CHICKPEA (*Cicer arietinum* L.) GENOTYPES

(Diversidad genética molecular y su asociación con el contenido de proteína y almidón en genotipos de garbanzo (*Cicer arietinum* L.))

María Fernanda Quintero-Soto[a*+], José Ángel López-Valenzuela[a,b], José Antonio Garzón-Tiznado[a,b], Ana Glenda Saracho-Peña[b], Nancy Yareli Salazar- Salas[a,b], Karen Virginia Pineda-Hidalgo[a,b], Héctor Samuel López-Moreno[b], Jeanett Chávez-Ontiveros[a,b]

[a]Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa.
[b]Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: maryferquintero@gmail.com

Área del Conocimiento: Biotecnología Alimentaria.

ABSTRACT
In Mexico, Sinaloa state is the main producer and exporter of chickpea (*Cicer arietinum* L.), one of the most important legumes in human nutrition because it represents a good source of proteins and carbohydrates. The success of the cultivation and marketing of this legume depends on the development of competitive materials, which up to date has been conducted by conventional breeding based just on agronomic traits. This process could be facilitated by using marker-assisted selection. Moreover, this selection could incorporate added value to the grain by taking into account nutritional properties. Therefore, the objective of this study was to determine the molecular diversity and its association with protein and starch content in chickpea genotypes. Fifteen genotypes were evaluated for grain physical characteristics, content and composition of the main protein fractions and starch physicochemical properties. The molecular genetic diversity of the genotypes was also analyzed with 30 microsatellites to investigate possible marker-trait associations. Protein quantification revealed a greater accumulation of the globulin fraction in the genotypes and the electrophoretic separation of this fraction showed a higher proportion of 11S legumins and 7S vicilins. The albumin fraction showed a wide variability among the genotypes and a higher proportion of 2S albumins. Starch content varied from 37.3 to 53.0 g/100g flour and amylose from 20.1 to 34.9 g/100g starch. Swelling values ranged from 5.13 to 9.80 g/g. Starch gelatinization enthalpy varied from 5.4 to 11.4 J/g, while retrogradation ranged from 34.4 to 59.5%. Molecular analysis detected a total genetic diversity of 0.73. The NCPGR7 marker was associated with several traits. CaaSTMS21 and TA206 showed a significant association with starch and amylose content, respectively, while TA130 and TA135 were associated with the levels of globulin and albumin fractions, suggesting the potential use of these markers in breeding programs for chickpea quality traits.

Keywords: Chickpea; Microsatellites; Protein; Starch.

OPTIMIZATION OF THE GERMINATION PROCESS OF MORINGA (*Moringa oleifera)* SEEDS TO IMPROVE THEIR NUTRITIONAL AND NUTRACEUTICAL VALUE

(Optimización del proceso de germinación de Moringa (*Moringa oleifera*) para obtener una harina con valor nutricional y nutracéutico alto)

Ana Maria Bañuelos Piña[a]*, Dra. Edith Oliva Cuevas Rodríguez [a,b+], Dr. Cuauhtémoc Reyes Moreno [a,b], Yudith Escobar Zuñiga[c], Dra Liliana León López[b], Dra. Saraid Mora Rochín[a,b], Dr. Luis Martin Sanchez Magaña[b].

[a]Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad Autónoma de Sinaloa, Culiacán, Sinaloa, México.
[b] Programa Regional de Posgrado en Biotecnología, Universidad Autónoma de Sinaloa, Culiacán, Sinaloa, México.
[c] Unidad Académica de Ciencias de la Nutrición y Gastronomía, Universidad Autónoma de Sinaloa, Culiacán, Sinaloa, México.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: edith.cuevas.r@uas.edu.mx

Área del Conocimiento: Biotecnología Alimentaria

ABSTRACT
Moringa (*Moringa oleifera*) seeds have a high biotechnology potential due to its high content of proteins and phytochemicals that could have positive effects on human health. Germination process is a technological alternative to improve nutritional value and nutraceutical quality of some seeds. The objective of this work was to determine the best germination conditions of temperature and time to obtain a flour from Moringa (Moringa oleifera) with high nutritional and nutraceutical value. Response surface methodology (RSM) with a central composite rotatable design was performed to optimize germination temperature (25-40°C) and time (24-360 h) using three response variables (protein content, total phenolics and antioxidant activity). According to regression models, minimum and maximum levels of the response variables were 21.5-25.6 % protein content of sample DM, 197.3-297.6 mg GAE/100g DM of total phenolics and 6280.5-11592.8 µmol TE/100g DM of antioxidant activity. The superposition of contour plots of each one of the responses variables allowed to find, graphically, the best conditions for Moringa oleifera seeds germination. In conclusion the higher values of protein content, total phenolics and antioxidant activity were observed at 30°C and 336h of germination.

Keywords: Germination; Moringa; Optimization; Antioxidant activity.

INCREASE OF ANTIOXIDANT ACTIVITY AND TOTAL PHENOLIC COMPOUNDS OF CHICKPEA BY OPTIMIZING THE SOLID STATE FERMENTATION PROCESS

(Incremento de actividad antioxidante y compuestos fenólicos totales de garbanzo mediante la optimización del proceso de fermentación en estado sólido)

Brenda Karely Bon Padilla [a,*], Roberto Gutiérrez Dorado[a, b, +], Jorge Milán Carrillo[a, b], J. Xiomara K. Perales Sánchez[b], Edith O. Cuevas Rodríguez[a, b], Angel Valdez Ortiz[a, b], Cuauhtémoc Reyes Moreno[a, b].

[a] Programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias Químico Biológicas (FCQB), Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS), Ciudad Universitaria (CU), Culiacán, Sinaloa, México.
[b] Programa Regional de Posgrado en Biotecnología, Facultad de Ciencias Químico Biológicas (FCQB), Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS), Ciudad Universitaria (CU), Culiacán, Sinaloa, México.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: robe399@hotmail.com

Área del Conocimiento: Biotecnología Alimentaria

ABSTRACT
Oxidative stress – defined as the imbalance between free radical production and antioxidant defenses – has been linked to the development of chronic-degenerative diseases. Several studies have shown that diet and some of its components could influence the intensity of oxidative stress damage. Some reports claim that inclusion of legumes in the daily diet has many beneficial physiological effects in the control and prevention of chronic-degenerative diseases. Solid state fermentation (***SSF***) has been recognized as a bioprocess which increases the phenolic content and antioxidant activity of fungal processed seeds. Even when there are diverse studies about of the effect of ***SSF*** on nutraceutical value of legumes such as chickpea, there isn't any research about the optimization of the ***SSF*** bioprocess to increase the antioxidant value and the total phenolic content of this grain, using *Rhizopus oligosporus* strain. Therefore, this study was conducted to obtain a functional flour with increased antioxidant activity and total phenolic compounds from chickpea seeds by optimizing the ***SSF*** process using a *Rhizopus oligoporus* strain. Response surface methodology was applied as optimization technique. A central composite rotable experimental design with two factors [fermentation temperature = 22 – 45°C/fermentation time = 6 – 132 h] and five levels was used (13 treatments). The bioprocessed cotyledons from each treatment were dried, milled, and blended with its previously dried milled seed coats. The best combination fermentation temperature/fermentation time of ***SSF*** to obtain the functional flour was 30°C/131 h. Solid state fermentation increased antioxidant activity (from 3,355 to 9,612 µmol TE/100 g, dw) and total phenolic compounds (from 62 to 199 mg GAE/100 g, dw). In conclusion, solid state fermentation might be an effective strategy to increase health-linked functionality of chickpea, due to improved antioxidant activity and total phenolic compounds.

Keywords: Solid state fermentation, chickpea, antioxidant activity, total phenolic compounds, optimization.

RESUMEN

El estrés oxidativo – definido como el desbalance entre la producción de radicales libres y las defensas antioxidantes – ha sido asociado con el desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas. Varios estudios han demostrado que la dieta y algunos de sus componentes pueden influir en la intensidad del daño causado por estrés oxidativo. Algunos reportes afirman que la inclusión de leguminosas en la dieta diaria tiene muchos efectos fisiológicos benéficos en el control y la prevención de enfermedades crónico-degenerativas. La fermentación en estado sólido (***FES***) ha sido reconocida como un bioproceso que incrementa el contenido de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante de semillas procesadas con hongos. Aun cuando hay diversos estudios acerca del efecto de la ***FES*** en el valor nutracéutico de leguminosas tales como garbanzo, no hay estudios sobre la optimización del bioproceso de ***FES*** para incrementar la actividad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos totales de este grano, utilizando una cepa de *Rhizopus oligosporus*. Por lo tanto, este estudio se realizó para obtener una harina funcional con actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos totales incrementados, a partir de granos de garbanzo, mediante la optimización del proceso de ***FES*** utilizando una cepa de *Rhizopus oligosporus*. Como técnica de optimización se aplicó la metodología de superficie de respuesta. Se utilizó un diseño experimental central compuesto rotable con dos factores [temperatura de fermentación = 22 – 45°C/tiempo de fermentación = 6 – 132 h] y cinco niveles (13 tratamientos). Los cotiledones bioprocesados de cada tratamiento fueron secados, molturados y mezclados con sus testas previamente secadas y molidas. La mejor combinación de temperatura de fermentación/tiempo de fermentación de ***FES*** para obtener la harina funcional fue 30°C/131 h. La ***FES*** incrementó la actividad antioxidante (de 3,355 a 9,612 µmol ET/100 g, bs) y el contenido de compuestos fenólicos totales (de 62 a 199 mg EAG/100 g, bs). En conclusión, la fermentación en estado sólido podría ser una estrategia efectiva para incrementar la funcionalidad del garbanzo asociada a la salud, debido a la mejora de la actividad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos totales.

Palabras Clave: Fermentación en estado sólido, garbanzo, actividad antioxidante, compuestos fenólicos totales, optimización.

INTRODUCCIÓN

Bajo concentraciones fisiológicas, las especies reactivas de oxígeno (***ERO***) actúan como moléculas mediadoras de señalización, crecimiento celular, migración y diferenciación [1], mientras que a más altas concentraciones, inducen muerte celular, apoptosis y senescencia [2]. Los efectos dañinos de las ***ERO*** son balanceados por la acción de antioxidantes no-enzimáticos en conjunto con enzimas antioxidantes [3]; sin embargo, cuando existe un desbalance entre la producción de ***ERO*** y la defensa antioxidante, se produce la condición denominada "estrés oxidativo" [4]. Los daños ocasionados por los radicales libres al ADN, proteínas y lípidos se han relacionado con el desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas [5, 6]. La composición de la dieta puede influir tanto en la intensidad del daño oxidativo como en los mecanismos antioxidantes, lo que explica en parte la relación existente entre la dieta y algunas enfermedades crónicas [7].

Diversos reportes mencionan que la inclusión de leguminosas en la dieta diaria tiene muchos efectos benéficos en la prevención de enfermedades crónico-degenerativas [8, 9]; así mismo, se ha señalado la presencia de compuestos fenólicos y el potencial antioxidante en semillas de leguminosas [10]. En granos de garbanzo, se reporta una amplia variedad de compuestos fenólicos que pueden ser considerados compuestos bioactivos debido a su actividad antioxidante (***AAox***) [11]. Para su consumo, las leguminosas generalmente son procesadas en diversos productos [12].

Los alimentos fermentados representan alrededor de un tercio del consumo total de alimentos a nivel mundial; tales productos son más altos en actividad antioxidante gracias a la fermentación microbiana [14–16]. La fermentación en estado (***FES***) sólido es un proceso biotecnológico que consiste en el crecimiento de microorganismos sobre sustratos sólidos (ej. granos) en ausencia, o casi ausencia, de agua libre superficial; sin embargo, el sustrato debe poseer la suficiente humedad para permitir el crecimiento y la actividad metabólica del microorganismo [17]. Los alimentos producidos por fermentación en estado sólido son diversos; uno de los más importantes es el alimento de origen Indonés denominado tempe [18, 19], principalmente obtenido a partir del grano de soya, siendo *Rhizopus oligosporus* el principal hongo productor. Este hongo filamentoso ha sido aceptado como "generalmente reconocido como seguro" (***GRAS***, por sus siglas en inglés) [20]. La mejora de la actividad antioxidante de alimentos fermentados a base de granos durante la fermentación en estado sólido se debe al incremento de compuestos fenólicos llevado a cabo por la hidrólisis enzimática fúngica [21].

La ***FES*** ha sido utilizada para elaborar tempe a base de diversas leguminosas [10, 11, 15, 16, 22–27]; sin embargo, a pesar de que hay diversos estudios sobre el efecto de la ***FES*** en el valor nutricional y nutracéutico de garbanzo, no hay investigaciones sobre la optimización del proceso de ***FES*** para aumentar el potencial antioxidante y contenido de compuestos fenólicos totales (***CFT***) de este grano.

La metodología de superficie de respuesta (***MSR***) ha sido considerada un método matemático estadístico efectivo para establecer modelos para evaluar la significancia relativa de variables y determinar condiciones óptimas de respuestas deseables.

Por ello, en el presente estudio se plantea el objetivo de encontrar las mejores condiciones de ***FES*** de garbanzo, mediante ***MSR***, para maximizar su actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos totales, para la obtención una harina funcional de garbanzo bioprocesado.

METODOLOGÍA

Materiales

Los granos de garbanzo (*Cicer arietinum* L., var Blanco Sinaloa 92) fueron adquiridos en el mercado local de Culiacán, Sinaloa, México. La cepa de *Rhizopus oligosporus* NRRL 2710 se obtuvo de la Colección de Cultivos Tipo Americana, Manassas, EUA.

Producción de harina de garbanzo bioprocesado (HGB)

Las ***HGB*** fueron obtenidas de acuerdo al procedimiento descrito por Guzmán-Uriarte [10], Rochín-Medina [28] y Sánchez-Magaña [16]. En resumen, los granos de garbanzo fueron remojados a 25°C durante 16 horas en disolución acuosa de ácido acético (pH 3.0). Posteriormente los granos fueron drenados y la testa se eliminó manualmente. Las testas fueron secadas y molturadas hasta pasar por malla 80; enseguida se embolsaron y almacenaron (4 °C). Las etapas de remojo y descascarillado fueron utilizadas como una pre-condición para la penetración del hongo y enzimas, y para un adecuado crecimiento del micelio. Los cotiledones se cocinaron en disolución de ácido acético (pH 3; 90°C/30 min), se enfriaron (25°C), se inocularon con una suspensión de *Rhizopus oligosporus* (1×10^6 esporas/mL) y se empacaron en bolsas de polietileno perforadas (15 x 15 cm). La fermentación en estado sólido se llevó a cabo aplicando combinaciones de temperatura de fermentación (***TF*** = 22–45°C) y tiempo de fermentación (***tF*** = 6–132 h) (**Tabla 1**). Los cotiledones de garbanzo bioprocesados resultantes fueron secados (50°C/8 h), enfriados (25°C) y molturados. Las harinas de cotiledones bioprocesados fueron mezcladas con sus correspondientes testas molturadas, se empacaron y mantuvieron a 4°C en recipientes herméticos hasta su uso.

Extracción de compuestos fenólicos libres y ligados

Los fitoquímicos libres se extrajeron de acuerdo al método descrito por Adom y Liu [29], mezclando la muestra con etanol al 80%, centrifugando (3,000 x g/10 min) y recuperando el sobrenadante, el cual se concentró y se almacenó (-20°C) hasta su evaluación. La extracción de fitoquímicos ligados se realizó a partir del precipitado, según el procedimiento de Adom y Liu [29], con ligeras modificaciones [30]. El residuo se hidrolizó con NaOH 2 M a 95°C por 10 min, posteriormente se acidificó con HCl 2M y se realizó una extracción con hexano para remover lípidos. La solución final se extrajo con acetato de etilo; las fracciones fueron colectadas y concentradas. Los compuestos ligados fueron reconstituidos con metanol y se almacenaron (-20°C) hasta su evaluación. Todas las extracciones se hicieron por cuadriplicado.

Actividad antioxidante (AAox)

La actividad antioxidante hidrofílica de extractos libres y ligados se determinó mediante el ensayo de decoloración del radical ABTS, descrito por Re y col [31]. En resumen, el radical ABTS+ [ácido 2,2-azinobis-(3-etilbenzotioazolín-6-sulfónico)] puede producir radicales libres estables, que son decolorados en su forma no-radical cuando reaccionan con antioxidantes. El radical ABTS+ se obtuvo tras la oxidación de ABTS (7 mM) con persulfato potásico (2.45 mM) incubados a temperatura ambiente (25°C) y oscuridad durante 12-16 h. Después, la solución de ABTS+ se diluyó con agua desionizada para obtener una solución de trabajo de ABTS+. La reacción entre la solución de trabajo de ABTS+ y muestras con diferentes concentraciones se iniciaron y almacenaron (25°C) hasta que la reacción fue completada. La absorbancia de las muestras fueron leídas utilizando un lector de microplacas (Synergy™ HT Multi-Detection, BioTek, Inc., Winooski, VT). Los resultados fueron expresados como micromoles equivalentes de Trolox (µmol ET)/100 de muestra en base seca (bs). Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

Compuestos fenólicos totales (CFT)

Los compuestos fenólicos totales de extractos libres y ligados fueron determinados usando el método colorimétrico de Singleton y col [32]. Brevemente, 20 µL de extractos fueron oxidados con 180 mL del reactivo Folin-Ciocalteu. Después de 20 min, la absorbancia del color azul resultante fue medida a 750 nm usando un lector de microplacas (Synergy™ HT Multi-Detection, BioTek, Inc., Winooski, VT). Los compuestos fenólicos totales fueron expresados como miligramos equivalentes de ácido gálico (mg EAG)/100 g muestra (bs). Todas las determinaciones se hicieron por triplicado.

Metodología de superficie de respuesta (MSR) y diseño experimental

La metodología de superficie de respuesta se aplicó para determinar las condiciones óptimas de las variables de proceso para la elaboración de una harina de garbanzo bioprocesado optimizada (***HGBO***) con actividad antioxidante (***AAox***) y compuestos fenólicos totales (***CFT***) altos. Se utilizó un diseño central compuesto rotable (***DCCR***), con dos factores [temperatura de fermentación (***TF***, 22 – 45°C), tiempo de fermentación (***tF***, 6 – 132 h)] y cinco niveles de variación (**Tabla 1**). Los experimentos individuales fueron llevados a cabo en orden aleatorio.

Se asumió un modelo de regresión cuadrático para predecir las variables de respuesta (***Y***). Se desarrollaron modelos de predicción para cada una de las variables de respuesta:

$$\hat{Y}_i = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2$$

Donde $\hat{\mathbf{Y}}_i$ es el valor predicho de la variable de respuesta considerada (***AAox*** o ***CFT***), $\boldsymbol{X_1}$ y $\boldsymbol{X_2}$ son los valores de ***TF*** y ***tF***, respectivamente, $\boldsymbol{\beta_0}$ es el valor del intercepto, $\boldsymbol{\beta_1}$ y $\boldsymbol{\beta_2}$ son coeficientes lineares, $\boldsymbol{\beta_{12}}$ es el coeficiente de interacción, $\boldsymbol{\beta_{11}}$ y $\boldsymbol{\beta_{22}}$ son coeficientes cuadráticos.

Aplicando un análisis de regresión, los términos no significativos ($p > 0.1$) fueron eliminados del polinomio de segundo orden y un nuevo polinomio fue recalculado, obteniendo un modelo de predicción para cada variable de respuesta (***AAox*** y ***CFT***). Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software de Design Expert software Ver. 7.0.0.

Optimización del proceso de fermentación en estado sólido

Se aplicó el método numérico de deseabilidad descrito por De la Vara y Domínguez [33] para encontrar la mejor combinación de variables de proceso [***TF***/***tF***] que resultan en una ***HGB*** con óptimos valores de las dos variables dependientes (***AAox*** y ***CFT***). La combinación de las respuestas en una función de deseabilidad requiere el cálculo de la función de deseabilidad de forma individualizada. Se predijeron valores para cada variable de respuesta [$Y_1(X)$, $Y_2(X)$] a partir de los modelos matemáticos de predicción correspondientes, mediante la selección de un punto de la zona experimental $X = (X_1, X_2)$.

Tabla 1. Diseño central compuesto rotable mostrando los tratamientos [combinación de las variables del proceso (TF, tF)] utilizados para producir harinas de garbanzo bioprocesado

Orden estándar	Orden de corrida	Temperatura de fermentación (°C)	Tiempo de fermentación (h)
1	12	25.4	24.5
2	6	41.6	24.5
3	3	25.4	113.6
4	9	41.6	113.6
5	5	22.0	69.0
6	8	45.0	69.0
7	7	33.5	6.0
8	1	33.5	132.0
9	4	33.5	69.0
10	11	33.5	69.0
11	2	33.5	69.0
12	13	33.5	69.0
13	10	33.5	69.0

Cada $\hat{Y}_i(X)$ fue transformado a un valor de deseabilidad individual $d_i(X)$, el cual está en el rango 0 – 1, midiendo el grado de deseabilidad de la respuesta en referencia al óptimo valor determinado a ser alcanzado. En esta investigación, se deseó que los valores de las variables de respuesta fueran lo más altos posible. Por ende, la transformación matemática para el cálculo de d_i fue:

$$d_i(x) = \begin{cases} 0 & Si\ \ \hat{Y}(x) \leq Y_{i*} \\ \dfrac{\hat{Y}_i(x) - Y_{i*}}{Y_i^* - Y_{i*}} & Si\ \ Y_{i*} \leq \hat{Y}(x) \leq Y_i^* \\ 1 & Si\ \ \hat{Y}(x) \geq Y_i^* \end{cases}$$

donde: $d_i(X)$ = Valor de la deseabilidad de la i^{va} variable de respuesta, $\hat{Y}_i(X)$ = Respuesta estimada de la variable, iY^* = Máximo valor aceptable de la i^{va} variable de respuesta, iY_* = Mínimo valor aceptable de la i^{va} variable de respuesta. Una vez calculadas las dos deseabilidades individuales, éstas se utilizaron para el cálculo de la deseabilidad global (***D***), utilizando la función matemática de transformación $D = (d1*d2)^{1/2}$. El software seleccionó varios puntos experimentales (***X***) de manera aleatoria y calculó los valores correspondientes de ***D*** en cada punto experimental. Tales valores fueron utilizados para la construcción de un gráfico de deseabilidad global (**Figura 2A**), en el cual la zona roja representa los valores predichos máximos posibles para cada respuesta, de entre los cuales se seleccionó un valor óptimo con las condiciones de ***FES*** (***TF***, ***tF***) que dieron por resultado los valores de ***AAox*** y contenido de ***CFT*** máximos posibles. Este valor fue encontrado usando el programa Design Expert versión 7.0.0.

RESULTADOS

Modelos de predicción para actividad antioxidante (AAox) y contenido de compuestos fenólicos totales (CFT)

Se desarrollaron modelos de predicción a partir de los resultados experimentales de cada una de las variables de respuesta, y de los tratamientos que los originaron (**Tabla 1**). Un buen modelo de predicción debe tener un R^2 ajustado (coeficiente de determinación) ≥ 0.80, un nivel de significancia de $p \leq 0.05$, coeficiente de variación (CV) ≤ 10%, y prueba de falta de ajuste > 0.05; todos estos parámetros pueden ser usados para la validez del modelo [37, 38].

Los valores experimentales de ***AAox*** y ***CFT*** de las harinas de garbanzo bioprocesado variaron de 3,535 hasta 9,139 µmol ET/100 g de ***HGB*** (bs) y de 63.7 a 171.8 mg EAG/100 g de ***HGB*** (bs), respectivamente (**Tabla 2**). El análisis de varianza mostró que la ***AAox*** y ***CFT*** fueron significativamente dependientes ($p < 0.05$) del término lineal y cuadrático de temperatura de fermentación (***TF*** y TF^2), del término lineal de tiempo de fermentación (***tF***) y de la interacción de temperatura y tiempo de fermentación (***TF*tF***):

$$AAox = 6300.16 - 490.70\ TF + 1761.98\ tF - 911.67\ TF*tF - 1155.85\ TF^2$$

$$CFT = 127.46 - 2.78\ TF + 36.23\ tF - 17.40\ TF*tF - 21.80\ TF^2$$

Tabla 2. Actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos totales en harinas de garbanzo bioprocesado.

Orden estándar[1]	TF (°C)	tF (h)	AAox (µmol ET/100g, bs)	CFT (mg EAG/100g, bs)
1	25.4	24.5	3,535	63.7
2	41.6	24.5	3,808	81.3
3	25.4	113.6	8,486	171.8
4	41.6	113.6	5,112	119.9
5	22.0	69.0	4,189	76.1
6	45.0	69.0	3,606	84.6
7	33.5	6.0	3,595	69.2
8	33.5	132.0	9,139	170.4
9	33.5	69.0	6,513	129.9
10	33.5	69.0	5,649	123.6
11	33.5	69.0	6,846	137.7
12	33.5	69.0	6,644	139.1
13	33.5	69.0	5,533	115.2

[1] No corresponde al orden de procesamiento.

Los modelos de regresión explicaron 94.1 y 94.6% de la variabilidad total ($p < 0.0001$) en ***AAox*** y ***CFT***, respectivamente. La falta de ajuste fue no significativa ($p > 0.05$) y la dispersión relativa de los puntos experimentales con respecto a los valores predichos con el modelo (CV) fue 9.9% y 9.1%, respectivamente. Estos valores indican que los modelos experimentales para ***AAox*** y ***CFT*** de las ***HGB*** fueron adecuados y reproducibles.

La harina de garbanzo crudo tuvo una ***AAox*** = 3,355 µmol ET/100 g de muestra, bs y ***CFT*** = 62 mg EAG/100 g de muestra (bs), valores muy inferiores a los máximos de ***AAox*** y ***CFT*** (9,139 µmol ET/100g, bs y 171.8 mg EAG/100g, bs, respectivamente) observados a temperaturas bajas a medias (***TF*** = 22 – 35°C) y tiempos altos (***tF*** = 115 – 132 h). A estas temperaturas (***TF*** = 22 – 35°C), se observa que las respuestas de ***AAox*** y ***CFT*** en ***HGB*** aumentaron con el tiempo de fermentación (**Figura 1A y 1B**), mientras que a temperaturas altas (***TF*** = 35 – 35°C) el tiempo no ejerce un efecto significativo sobre ***AAox*** y no existe un incremento sustancial sobre el contenido de ***CFT***.

Optimización del proceso de fermentación en estado sólido

En la **Figura 2A** se muestra el gráfico de deseabilidad global (***D***), en el cual la zona roja representó los valores predichos máximos posibles de **D** para cada respuesta (***AAox***, ***CFT***), de entre los cuales se

seleccionó un valor óptimo (***D*** = 1) con las condiciones de ***FES*** (***TF*** y ***tF***) que dieron por resultado los valores de ***AAox*** y ***CFT*** máximos posibles. Los valores de deseabilidad individual para cada respuesta, asociados con este valor de ***D*** máximo seleccionado fueron: d_{AAox}= 1 y d_{CFT}= 1 (**Figura 2B**). Los valores de las variables del proceso de fermentación asociados con la deseabilidad global máxima obtenida fueron: ***TF*** = 30 °C y ***tF*** = 131 h. La ***D*** obtenida en esta investigación fue mayor que la considerada aceptable (0.6 <D <0.8) de acuerdo con De la Vara y Domínguez [33]. Los valores predichos de ***AAox*** y ***CFT***, usando los modelos de predicción de cada variable de respuesta y las condiciones óptimas de fermentación fueron ***AAox*** = 9,311 µmol ET/100 g (bs) y ***CFT*** = 185.4 mg EAG/100 g (bs) respectivamente. Aplicando la mejor combinación de las variables del proceso de fermentación (***TF*** = 30°C/***tF*** = 131 h) se produjo ***HGBO***, realizando tres repeticiones.

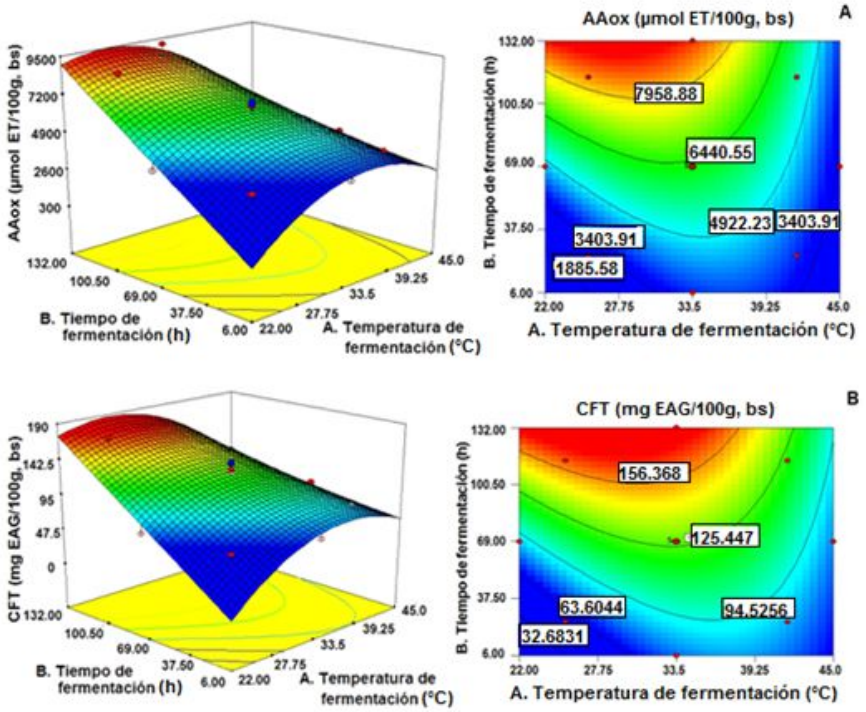


Figura 1. Gráficas de superficie de respuesta y de contornos para el efecto de la temperatura de fermentación (°C) y tiempo de fermentación (h) sobre **(A)** actividad antioxidante y **(B)** compuestos fenólicos totales.

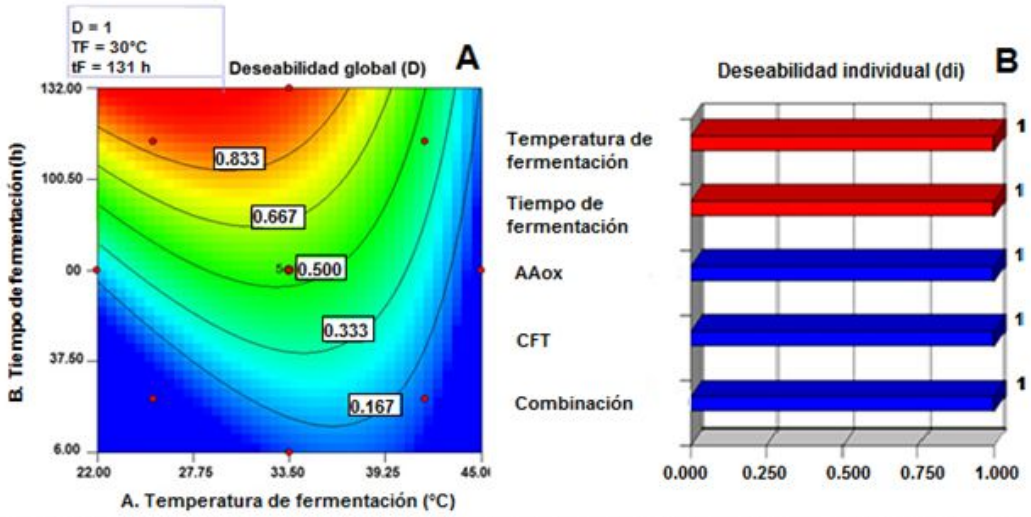


Figura 2. (A) Deseabilidad global (*D* = 1) para obtener la mejor combinación de las variables de proceso (*TF* = 30°C/*tF* = 131h) y **(B)** deseabilidad individual (*di*) para las variables de respuesta (***AAox*** y *CFT*).

Actividad antioxidante (AAox) y compuestos fenólicos totales (CFT) de harina de garbanzo bioprocesado optimizada (HGBO)

Los valores experimentales promedio de ***AAox*** y contenido de ***CFT*** de la ***HGBO*** [9,612 µmol ET/100 g (bs) y 199 mg EAG/100 g (bs), respectivamente] fueron similares a los valores predichos por el sofware [***AAox*** = 9,311 µmol ET/100 g (bs) y ***CFT*** = 185.4 mg EAG/100 g (bs)], indicando que las condiciones óptimas de fermentación fueron apropiadas y reproducibles.

DISCUSIONES

La ***AAox*** de garbanzo se incrementó, comparada con la de garbanzo crudo, al aplicar condiciones óptimas de ***FES*** (***TF*** = 30°C/ ***tF*** = 131 h). Diversos autores [10, 14, 16, 34 – 36] han encontrado una correlación lineal positiva significativa entre el aumento de compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante durante la fermentación en estado sólido. El aumento de ***AAox*** durante la ***FES*** puede deberse al incremento del contenido de ***CFT***, llevado a cabo por enzimas hidrolíticas producidas por el hongo durante la fermentación [21]. Estas enzimas hidrolizan enlaces éster de la pared celular de los granos, donde se encuentran enlazados compuestos fenólicos. Consecuentemente, los compuestos fenólicos libres, así como las formas ligadas, se encuentran más disponibles para su extracción. Entre estas enzimas, se ha reportado ampliamente que β-glucosidasa es responsable de catalizar la hidrólisis de enlaces β (1-4) de β-D-glucósidos para liberar fracciones fenólicas de agliconas [36] y se ha correlacionado [14] el incremento de la actividad enzimática de β-glucosidasa con el aumento en el contenido de polifenoles, resultante de la liberación y acumulación de agliconas, al incrementar el tiempo de fermentación.

CONCLUSIONES

Las mejores condiciones del bioproceso de ***FES*** para obtener ***HGBO*** con ***AAox*** y ***CFT*** altos fueron: ***TF*** = 30°C/***tF*** = 131 h. Bajo estas condiciones se predijo obtener valores de ***AAox*** y ***CFT*** de 9,311 µmol ET/100g (bs) y 185.4 mg EAG/100g (bs), respectivamente. Los valores experimentales [***AAox*** = 9,612 µmol ET/100g (bs), ***CFT*** = 199 mg EAG/100 g (bs)] fueron similares a los predichos, indicando que las condiciones óptimas de fermentación fueron apropiadas y reproducibles. La ***FES*** aumentó la ***AAox*** y el contenido de ***CFT*** de garbanzo var. Blanco Sinaloa 92 [de 3,355 a 9,612 µmol ET/100 g (bs) y de 62 a 199

mg EAG/100 g (bs), respectivamente]. La aplicación de las condiciones óptimas del proceso de ***FES*** es una forma efectiva de incrementar la ***AAox*** y el contenido de ***CFT*** de garbanzo. La harina funcional (***HGBO***) obtenida podría ser utilizada como un alimento funcional para reducir la incidencia de enfermedades crónico-degenerativas asociadas con el estrés oxidativo.

REFERENCIAS

[1] Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. (2006) "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer", Chemico-Biological Interactions 160: 1–40.

[2] Chandra, J., Samali, A., Orrenius, S. (2000) "Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress", Free Radical Biology and Medicine 29: 323–333.

[3] Halliwell, B. (1996). "Antioxidants in human health and disease", Annual Review of Nutrition, 16: 33–50.

[4] Vetrani, C., Costabile, G., Di Marino, L., Rivellese, A.A. (2013). "Nutrition and oxidative stress: a systematic review of human studies", International Journal of Food Sciences and Nutrition, 64 (3): 312–326.

[5] Morrow, J.D. (2005). "Quantification of isoprostanes as indices of oxidant stress and risk of atherosclerosis in humans". Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 25: 279–286.

[6] Stephens, J.W., Khanolkar, M.P., Bain, S.C. (2009). "The biological relevance and measurement of plasma markers of oxidative stress in diabetes and cardiovascular disease". Atherosclerosis 202: 321–329.

[7] Pérez, D.D., Strobel, P., Foncea, R., Dìez, M.S., Vasquez, L., Uriquiaga, I., Castillo, O., Cuevas, A., San Martín, A., Leighton, F. (2002). "Wine, diet, antioxidant defenses, and oxidative damage". Annals of the New York Academy of Sciences 957:136–145.

[8] Simpson, H. C., Lousley, R. S., Greekie, M., Hockaday, T. D. R., Carter, R. D., Mann, J. I. (1981). "A high carbohydrate leguminous fibre diet improves all aspects of diabetes control". Lancet 1: 1–4.

[9] Soni, G. L., George, M., Singh, R. (1982). "Role of common Indian pulses as hypocholesterolemic agents". The Indian Journal of Nutrition and Dietetics 19: 184–190.

[10] Guzmán-Uriarte, L., Sánchez-Magaña, L.M., Angulo-Meza, G.Y., Cuevas-Rodríguez, E.O., Gutiérrez-Dorado, R., Mora-Rochín, S., Milán-Carrillo, J., Valdez-Ortiz, A., Reyes-Moreno, C. (2013). "Solid State Bioconversion for Producing Common Bean (Phaseolus vulgaris L.) Functional Flour with High Antioxidant Activity and Antihypertensive Potential". Food and Nutrition Sciences 4: 480-490.

[11] Han, H., Baik, B.K. (2008). "Antioxidant activity and phenolic content of lentils (Lens culinaris), chickpeas (Cicer arietinum L.), peas (Pisum sativum L.) and soybeans (Glycine max), and their quantitative changes during processing". International Journal of Food Science and Technology 43: 1971–1978.

[12] Kurien, P.P. (1981). En "Processing of pulses. Proceedings of the workshop on grain legumes" (Aiyer, A.S., Iyer, K.R. Eds.). Bombay: Protein Foods and Nutrition Development Association of India., 68–77.

[13] Tharanathan, R.N., Mahadevamma, S. (2003). "Grain legumes—a boon to human nutrition". Trends in Food Science and Technology 14: 507–518.

[14] Cheng, K.C., Wu, J.Y., Lin, J.T., Liu, W.H. (2013). "Enhancements of isoflavone aglycones, total phenolic content, and antioxidant activity of black soybean by solid-state fermentation with Rhizopus spp". European Food Research and Technology 236: 1107–1113.

[15] Reyes-Bastidas, M., Reyes-Fernández, E.Z., López-Cervantes, J., Milán-Carrillo, J., Loarca-Piña, G., Reyes-Moreno, C. (2010). "Physicochemical, nutritional and antioxidant activity properties of tempeh from common beans (Phaseolus vulgaris L)". Food Science and Technology International 16: 427–434.

[16] Sánchez-Magaña, L.M., Cuevas-Rodríguez, E.O., Gutiérrez-Dorado, R., Ayala-Rodríguez, A.E., Valdez-Ortiz, A., Milán-Carrillo, J., Reyes- Moreno, C. (2014). "Solid-state bioconversion of chickpea (Cicer arietinum L.) by Rhizopus oligosporus to improve total phenolic content, antioxidant activity and hypoglycemic functionality". International Journal of Food Science and Nutrition 65: 558–564

[17] Pandey A. (2003). "Solid-state fermentation". Biochemical Engineering Journal 13: 81–84

[18] Agosin, E., Díaz, D., Aravena, R., Yánez, E. (1989). "Chemical and nutritional characterization of lupine tempeh". Journal of Food Science 54: 102-104.

[19] Hachmeister, A.K., Fung, C.D.Y. (1993). "Tempeh: a mold modified indigenous fermented food made from soybeans and/or cereal grains". Critical Reviews in Microbiology 19: 137-188

[20] Wongputtisin, P., Khanongnuch, C., Pongpiachan, P., Lumyong, S. (2007). "Antioxidant activity improvement of soybean meal by microbial fermentation". Research Journal of Microbiology 2: 577–583.

[21] Hur, S.J., Lee, S.Y., Kim, Y.C., Choi, I., Kim, G.B. (2014). "Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods". Food Chemistry 160: 346–356.

[22] Angulo-Bejarano, P.I., Verdugo-Montoya, N.M., Cuevas-Rodríguez, E.O., Milán-Carrillo, J., Mora-Escobedo, R., López-Valenzuela, J.A., Garzón-Tiznado, J.A., Reyes-Moreno, C. (2008). "Tempeh flour from chickpea (Cicer arietinum L). Nutritional and physicochemical properties". Food Chemistry 106: 106–112.

[23] Berghofer, E., Grzeskowiak, B., Mundigler, N., Sentall, W.B., Walcak, J.J. (1998). "Antioxidative properties of faba bean, soybean and oat tempeh". International Journal of Food Science and Nutrition 49: 45–54.

[24] Maiti, D., Majumdar, M. (2012). "Impact of bioprocessing on phenolic content and antioxidant activity of two edible seeds to improve hypoglycemic functionality". Journal of Natural Pharmacy 3: 31–36.

[25] Sharma, A., Khetarpaul, N. (1997). "Effect of fermentation on phytic acid content and in vitro digestibility of starch and protein of rice-black gram dhal-wheat blends". Journal of Food Science and Technology 34: 20–30.

[26] Reyes-Moreno, C., Romero-Urías, C., Milán-Carrillo, J., Valdéz-Torres, B., Zárate-Márquez, E. (2000). Plant Foods for Human Nutrition 55: 219–228.

[27] Reyes-Moreno, C., Cuevas-Rodríguez, E.O., Milán-Carrillo, J., Cárdenas-Valenzuela, O.G., Barrón-Hoyos, J. (2004). "Solid state fermentation process for producing chickpea (Cicer arietinum L) tempeh flour. Physicochemical and nutritional characteristics of the product". Journal of the Science of Food and Agriculture 84:271–278.

[28] Rochín-Medina, J.J., Gutiérrez-Dorado, R., Sánchez-Magaña, L.M., Milán-Carrillo, J., Cuevas-Rodríguez, E.O., Mora-Rochín, S., Valdez-Ortiz, A., Reyes-Moreno, C. 2015. "Enhancement of nutritional properties, and antioxidant and antihypertensive potential of black common bean seeds by optimizing the solid state bioconversion process". International Journal of Food Science and Nutrition 66(5):498-504.

[29] Adom, K.K., Liu, R.H. (2002). "Antioxidant activity of grains". Journal of Agricultural and Food Chemistry 50: 6182–6187.

[30] Mora-Rochín, S., Gutiérrez-Uribe, J.A., Serna-Saldivar, S.O., Sánchez-Peña, P., Reyes-Moreno C., Milán-Carrillo, J. (2010). "Phenolic content and antioxidant activity of tortillas produced from pigmented maize processed by conventional nixtamalization or extrusion cooking". Journal of Cereal Science 52:502–508.

[31] Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay". Free Radical Biology and Medicine 26: 1231–1237.

[32] Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M. (1999). "Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent". Methods in Enzymology 299:152–178.

[33] De la Vara, S.R., Domínguez, D.J. (2002). "Métodos de Superficie De Respuesta; Un Estudio Comparativo". Revista de Matemáticas Teoría y Aplicaciones 1(1): 47-65.

[34] McCue, P., Horii, A., Shetty, K. (2003). "Solid-state bioconversion of phenolic antioxidants from defatted soybean powders by Rhizopus oligosporus: role of carbohydrate-cleaving enzymes". Journal of Food Biochemistry 27: 501-514.

[35] Randhir, R., Vattem, D.A., Shetty, K. (2004). "Solid-state bioconversion of fava bean by Rhizopus oligosporus for enrichment of phenolic antioxidants and LDOPA". Innovative Food Science and Emerging Technologies 5: 235–244.

[36] Huynh, N.T., Van-Camp, J., Smagghe, G., Raes, K. (2014). "Improved release and metabolism of flavonoids by steered fermentation processes: a review". International Journal of Molecular Sciences 15: 19369–19388.

[37] Jahani, M., Alizadeh, M., Pirozifard, M., Qudsevali, A. (2008). "Optimization of enzymatic degumming process for RBO using response surface methodology" Food Science and Technology 41: 1892-1898

[38] Myers, R.H., Montgomery, D.C. (2002). "Response Surface Methodology: Product and Process Optimization Using Designed Experiments" 2da edición. Wiley: Nueva York, EUA.

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF EXOPOLYSACCHARIDES BY LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM AGAVE (*AGAVE TEQUILANA* WEBER VAR. *AZUL*)

(Síntesis y caracterización de exapolisacáridos de bacterias acido lácticas aisladas de agave (*Agave tequilana* Weber var*. azul*)

Marisol Isabel Jiménez Canales[a*]; Gabriela Carvajal del Aguila[a*], Marcela de la Mora Amutio[a], Julia del Carmen Martinez-Rodriguez[a+], Tetsuya Ogura[a].

[a]Departamento de Química, Universidad Autónoma de Guadalajara.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: juliam@edu.uag.mx

Área del Conocimiento: (BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA).

ABSTRACT
Lactic acid bacteria (LAB) are of great importance for the industry due to their metabolites and exapolysaccharides (EPS) they produce. Levans are fructan polysaccharides synthesized by LAB which consist in fructose molecules linked by β(2-6) glycosidic bonds. *In vitro* production of EPS, especially Levan may have important applications in pharmaceutical, food and cosmetic industry. The objective of this study is to verify levan production by two different strains of LAB isolated from agave plants including one strain of *Weissiella sp.* Strains were cultured in MRS supplemented with 15%, 20% and 25% sucrose respectively. EPS synthesized from each treatment were analyzed by Thin Layer Chromatography (TLC). The results obtainded indicate the production of EPS, including possible dextran and levan. Further experiments are needed to know which EPS are being produced by the strains tested.

Keywords: *Leuconostoc mesenteroides*, polysaccharides, Levan, Dextran, *Weissiella sp.*

EFFECT OF THE PRESENCE OF THREE NATIVE IMPAIRED LAB, IN THE PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF VACUUM PACKED FRESH BREAST CHICKEN

(Efecto de la presencia de tres BAL nativas deterioradoras, en las propiedades fisicoquímicas de pechuga de pollo fresco envasado al vacío)

María Dolores García-Parra[a]*, Amairani Ozuna-Valente[a], Gabriela Villalpando Castellanos[a]

[a] Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ), departamento de Tecnología de Alimentos, Avenida Normalistas #800, Colinas de la Normal, C.P. 44270, Tel. (33) 33 45 52 00 Ext. 1241.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: dgarcia@ciatej.mx

Área del Conocimiento: Biotecnología Alimentaria.

ABSTRACT
Poultry meat is a popular food item, its consumption has increased in recent decades in many countries, due to its low production cost, low fat and nutritional value. In meat products sold in vacuum packaging, the presence of some lactic acid bacteria represent a major problem of deterioration, causing defects such as acidification, unpleasant odor, discoloration, silt and gas formation, causing the latter 's vacuum packaging waste. In this work was evaluated physicochemical characteristics of vacuum packaged meat product (chicken breast), and three native spoilage LAB, isolated from commercial sausage deterioration problems (*Lb. plantarum, Lc. mesenteroides, Lb. curvatus*) as LAB they have a negative effect on the physicochemical properties of the meat products, reducing shelf life. These bacteria were applied in concentrations 1000 CFU/ml individually as well as the mixture of the three bacteria at the meat, was used as breasts control fresh chicken without the presence of any bacteria, these breasts were stored at 4 °C and 8 °C, and the results were monitored for 3 times (0, 7 and 14 days), using a multifactorial design. According to statistical analysis with a confidence level of 95%, the samples containing *Lb. plantarum* and *Lc. mesenteroides* stored at 8°C had greater difference in color than the rest of the samples for pH samples containing LAB spoilage showed lower pH values than the control but were not statistically significant at a time of seven days regardless to temperature they stored. A_w values for all shown increases over time at both temperatures, the humidity (%) for all samples decreased at 7 days the samples containing the mixture of bacteria are those that had a higher moisture content; so the presence of lactic acid bacteria has spoilage if effect on fresh chicken breast in 7 days and the color difference in the pH decrease.

Keywords: Acid Lactic Bacteria; chicken breast; Spoilage; Shelf life.

RESUMEN
La carne de ave es un producto alimenticio muy popular en todo el mundo y su consumo se ha incrementado en las últimas décadas en muchos países. Algunas de las razones de la popularidad son el

costo relativamente bajo de producción, bajo contenido de grasa y el alto valor nutritivo de la carne de aves de corral. La presencia de algunas bacterias lácticas, representan un problema importante de deterioro en productos cárnicos, comercializados en empaques al vacío, causando defectos tales como acidificación, exudado lechoso, mal sabor y olor, decoloración, formación de gas y limo, provocando este ultimo la pérdida del vació en del empaque. En el presente trabajo se evaluó las características fisicoquímicas de un producto cárnico envasado al vacío (pechuga de pollo), y se utilizaron tres BAL deterioradoras nativas, aisladas de salchichas comerciales con problemas de deterioro (*Lb. plantarum, Lc. mesenteroides, Lb. curvatus*), ya que las BAL tienen un efecto negativo sobre las propiedades fisicoquímicas de los productos cárnicos, reduciendo la vida de anaquel. Estas bacterias fueron aplicadas en concentraciones de 1000 UFC/ml de forma individual así como la mezcla de las tres bacterias a pechugas frescas de pollo, se utilizó como control pechugas de pollo fresca sin la presencia de ninguna BAL, estas pechugas fueron almacenadas a 4°C y 8°C, y los resultados fueron monitoreados durante 3 tiempos (0, 7 y 14 días), utilizando un diseño multifactorial. De acuerdo al análisis estadístico con un nivel de confianza de 95%, las muestras que contenían *Lb. plantarum y Lc. mesenteroides* almacenadas a 8°C presentaron mayor diferencia de color que el resto de las muestras, para el pH las muestras que contenían las bacterias lácticas deterioradoras presentaron valores menores de pH que el control aunque no fueron estadísticamente significativos a un tiempo de 7 días sin importar a que temperatura se almacenaron. Para los valores de aw todas las muestran se incrementa a través del tiempo a las dos temperaturas, la Humedad (%) disminuye para todas muestras a los 7 días las muestras que contenían la mezcla de bacterias son las que presentaron un mayor contenido de humedad; por lo que la presencia de bacterias lácticas deterioradoras si tiene efecto en la pechuga fresca de pollo a los 7 días en la diferencia de color y en la disminución del pH.

Palabras Clave: Bacteria ácido láctica ; pechuga de pollo; deterioro; vida de anaquel.

INTRODUCCIÓN

La demanda mundial de carne de pollo se ha incrementado en los últimos años debido a su precio relativamente bajo comparado con otros tipos de carnes; además es una excelente fuente de proteína [1]. La producción estimada a nivel mundial de carne de ave en 2012 fue de 104.9 millones de toneladas, con un pronóstico para 2013 de 106.8 millones de toneladas, lo que implica un aumento del 1.8 % del 2012 al 2013, siendo la carne que mayor crecimiento muestra en cuanto a producción mundial [2]. Los organismos deterioradores son aquellos microorganismos que producen en el alimento cambios no deseables tanto sensoriales como en de la apariencia física del alimento [3]; algunos de los grupos de microorganismos deterioradores en productos cárnicos las BAL (Bacterias Ácido Lácticas) son responsables de algunas modificaciones en las propiedades fisicoquímicas, algunas de las BAL deterioradoras de productos cárnicos son, *Lb.* plantarum responsable algunas veces del deterioro de productos cárnicos [4]*, Lc. mesenteroides,* caracterizado por ser un microorganismo deteriorador de productos cárnicos, tales como salchichas, alterando los alimentos causando disminución de pH, formación de líquido lechoso y CO2, resultando la aparición de olores desagradables[5]*, y Lb. curvatus*, en productos como salchichas y emulsiones cárnicas envasadas al vacío y otras carnes procesadas almacenadas en temperaturas de refrigeración, se han encontrado considera como una especie de bacteria alterante [6], ya que su actividad metabólica puede provocar acidez, decoloración, producción de gas, perdida de sabores y olores, exudado lechoso, hinchazón del

empaque, cambios del pH [7], sin afectar la inocuidad del producto pero si su calidad sensorial [8,9,10].

METODOLOGÍA

Material biológico. Se utilizaron cepas identificadas de las bacterias *Lb. plantarum, Lc. mesenteroides y Lb. curvatus*, aisladas de productos cárnicos curados cocidos en deterioro, en el área de Tecnología de Alimentos, en el Laboratorio de Microbiología del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ).

Muestra modelo. Se adquirieron pechugas de pollo frescas en un centro comercial y se empacaron al vacío.

Preparación de las muestras inoculas. Se formaron 5 grupos diferentes, de acuerdo al inoculado con cada una de las bacterias; *Lb. plantarum* a una concentración de 1000UFC/ml, el segundo con *Lc. mesenteroides* a una concentración de 1000UFC/ml, el tercero con *Lb. curvatus* a una concentración de 1000UFC/ml, el cuarto con la mezcla de las tres bacterias (*Lb. plantarum, Lc. mesenteroides, Lb. curvatus*) a una concentración de 1000UFC/ml y el quinto lote que fue el control (sin inoculo), como se indica en la tabla 1.

Tabla 1. Identificación de muestras

Codificación muestras	Descripción de las muestras
MC.	Control sin inocular
MP.	*Lb. plantarum*
MM.	*Lc. mesenteroides*
MV.	*Lb. curvatus*
MZ.	*Lb. plantarum - Lc. mesenteroides - Lb. curvatus*

Diseño de experimentos. Se realizó un diseño experimental multifactorial, con cuatro factores: tiempo (0, 7 y 14 días), temperatura (4 y 8°C) y Muestra (de acuerdo a la tabla 1). Los resultados fueron analizados estadísticamente con un nivel de confianza del 95% (α=0.05), utilizando el paquete estadístico Statgraphics Centurion XVI Versión 16.1.15

Determinación del pH. La determinación de pH de todas las muestras fue realizada con un potenciómetro (ORION STAR A211) especial para cárnicos con punta en forma de cuchilla), se realizaron 3 mediciones en diferentes puntos de la muestra (pechuga de pollo).

Determinación de la Actividad del Agua (Aw). La determinación de Aw se realizó mediante el equipo Aqua Lab (serie 3), se colocó la muestra previamente homogenizada, y cada medición se realizó por triplicado.

Determinación del porcentaje (%) de humedad (H). Para la determinación de % H se realizó por diferencia de peso, siguiendo los siguientes pasos, se colocaron 10 gramos de la muestra previamente homogenizada utilizando charolas de aluminio en un horno a una temperatura de 80 ± 5 ºC, la prueba se realizó por un tiempo aproximado de 18 horas todas las muestras se realizaron por triplicado.

Diferencial de color (ΔE). La medición del color se realizó con el espectrofotómetro (CM-5 KONICA MINOLTA), utilizando muestra homogenizada y se midieron los parámetros L* (Luminosidad va de claro a obscuro), a* (que va de verde a rojo) y b* (va de azul a amarillo por triplicado de cada parámetro). Posteriormente se determinó el diferencial de color (ΔE) a diferentes tiempos mediante la siguiente fórmula.

$$\Delta E = \sqrt{(L_2^* - L_1^*)^2 + (a_2^* - a_1^*)^2 + (b_2^* - b_1^*)^2}$$

RESULTADOS

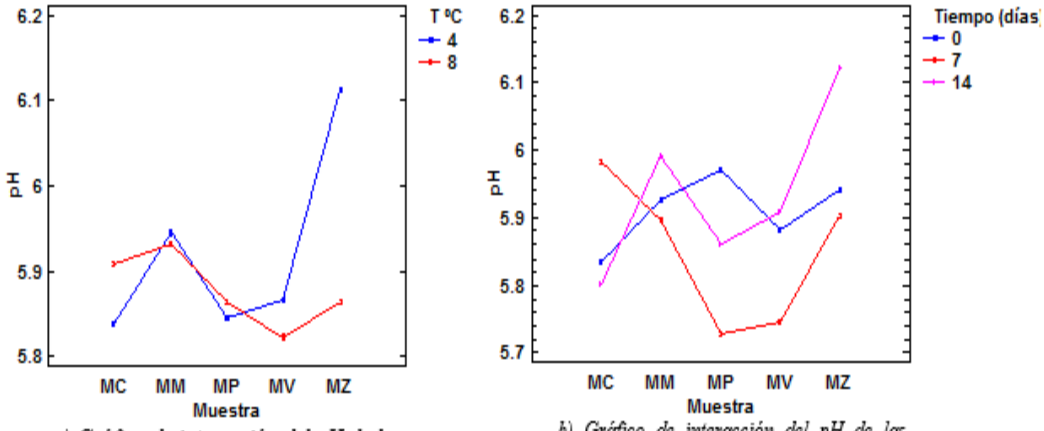
En la Tabla 2, se muestran los resultados de los factores, así como sus interacciones en relación con los parámetros fisicoquímicos (pH, aw, % humedad y diferencial de color), mostrando en rojo los valores significativos (α = 0.05). En donde el pH presentó diferencia estadísticamente significativa en todos los factores estudiados (tiempo, temperatura y muestra), al igual que la aw y la diferencia de color, AC y BC. En él % humedad se mostró diferencia estadísticamente significativa con respecto al tiempo y la muestra y la interacción entre estos dos factores.

Tabla 2. Análisis estadístico de los parámetros fisicoquímicos de la pechuga de pollo

Fuente	Parámetros Fisicoquímicos (Valores -P)			
Factores	pH	aw	% humedad	Diferencial de color
A: Tiempo (días)	0.0053	0.0000	0.0000	0.0000
B: T (°C)	0.0456	0.0007	0.3658	0.0000
C: Muestra	0.0001	0.0031	0.0001	0.0000
Interacciones				
AB	0.0056	0.0075	0.7874	0.0000
AC	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
BC	0.0001	0.0028	0.2764	0.0000
ABC	0.0218	0.0674	0.1164	0.0000

Determinación del pH de muestras

En la Figura 1. Se observa como interactúa las muestras respecto el pH a la Temperatura (4 y 8ºC), y a su vez con el tiempo (0,7 y 14 días), en el Figura 1a que el pH, mostró valores similares a la temperatura de 8 y 4ºC, excepto la muestra que contenía la presencia de las tres bacterias (MZ) a los 4ºC aumentó ligeramente el pH. En cuanto a los días de almacenamiento Figura 1b, se muestra que a los 7 días la muestras MP y MV presentaron un descenso que el resto de las muestras.



a) Gráfico de interacción del pH de las muestras con respecto a la Temperatura

b) Gráfico de interacción del pH de las muestras con respecto al Tiempo (días)

***Figura 1**. Gráfico de interacciones del pH de las muestras con respecto a la T ºC y el Tiempo (días)*

Determinación de Actividad de agua (AW) de muestras.

En la Figura 2. Se observa como interactúa las muestras respecto a la Actividad del agua (Aw) a la Temperatura (4 y 8ºC), donde muestra que la Aw se comporta similar en todas las muestras a las dos diferentes temperaturas de almacenamiento.

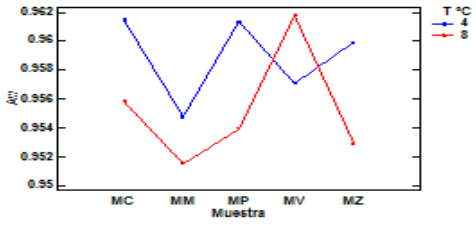


***Figura 2**. Gráficos de Interacción de la Aw de las muestras con respecto a la T ºC*

Determinación del % de Humedad (H)

En la Figura 3, se observa que del % H, se mantuvo constante en MC hasta los 7 días y disminuyó a los 14 días. En cambio MM, mostro una disminución a los 7 días, posteriormente presento un ligero incremento a los 14 días en comparación a MC, las muestras MP y MV, disminuyeron a los 7 días y se mantuvieron constantes de los 7 días hasta los 14 día, para la muestra MZ aumentó progresivamente en comparación a MC.

La muestra control solo presento una ligera baja en el porcentaje de humedad de los 7 a los 14 días, aunque MM es la que presento menor % humedad de 0 a los 7 días que en todas las muestras

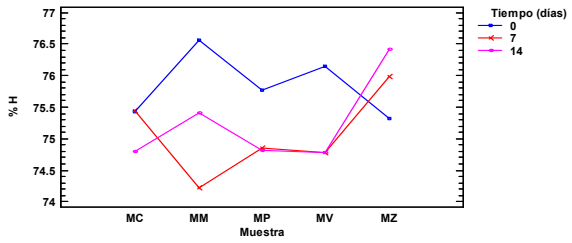


***Figura 3**. Gráfico de interacciones del % H de las muestras con respecto al tiempo (días)*

Diferencial de color (ΔE)

En la siguiente Figura 4, se muestra el diferencial de color (ΔE) entre tres tiempos E1 (0 a 7 días), E2 (7 a 14 días) y E3 (0 a 14 días), donde la muestra MC en el tiempo E1 y E3 se mantuvieron constantes mientras que el tiempo E2 disminuyó el diferencial de color; continuando con MM, donde E1 y E3 permanecieron similares por el contrario que E2 presento un aumento con respecto a MC; para el caso de la muestra MP su comportamiento fue disminuyendo progresivamente en comparación a MC, prosiguiendo con la muestra MV, presento una ligera disminución de E1 a E2 igual a MC aunque de E2 a E3 aumento, finalizando con MZ, fue presentando un ligero incremento de E1 a E3.

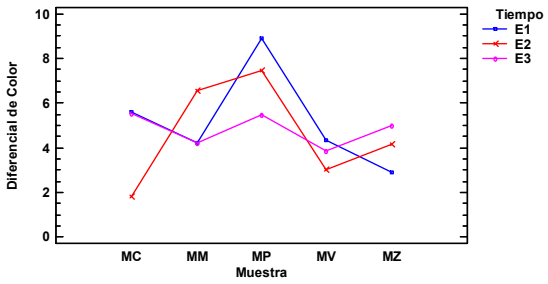


***Figura 4.** Gráfico de interacciones de Diferencial de Color de Muestra con respecto al tiempo*

DISCUSIONES

La presencia de las BAL en los valores de pH, presentó diferencia estadísticamente significativa (α=0.05) en cada uno de los factores almacenamiento y esta disminución de pH se le atribuye a la producción de ácido láctico producido por las BAL (Fernández, 2000). La humedad presentó una disminución en MC, MM, MP y MV a los 7 días de almacenamiento, sin embargo las muestras con inoculación con las BAL en las muestras identificadas como MM, MP, MV muestran una disminución de humedad por lo que se relacionan los resultados de Villegas y Vázquez en el 2006 donde las BAL produjeron un descenso en el contenido de humedad. El Diferencial de color presentó diferencias significativas a 4 y a 8°C en todas las muestras y a los tres tiempos de almacenamientos, en cambio en el estudio reportado Miror (1999), sobre carne de cerdo cruda no mostro diferencias significativas.

CONCLUSIONES

En relación al pH, la muestra que contenía la presencia de *Lb. plantarum* presentó el menor valor de pH 5.71, a los 7 días de almacenamiento a una temperatura de 4ºC. Mientras que la muestra sin inóculo (MC), presentó el valor más alto de pH, 6.40 a una temperatura de 4ºC a los 14 días de almacenamiento. La actividad de agua (Aw) mostró que la muestra con la presencia de *Lb. curvatus* presentó el mayor valor de Aw 0.957, mientras que MM fue la que presentó menos valor 0.951 entendiendo estos valores de Aw son susceptibles para el desarrollo de otras bacterias.

La presencia de las bacterias acido lácticas presentan modificación el % humedad a los 7 días de almacenamiento. La muestra con *Lb. plantarum* presento diferencias de color seguida de la muestra con

Lb. mesenteroides en comparación a la muestra control; considerando que la muestra control fue quien presento mayor disminución en E2.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. y nuestra Asesora la Dra., María Dolores García Parra por permitirnos desarrollar este tema de investigación.

REFERENCIAS

[1] FAO. (2008). Perspectivas Alimentarias Análisis del Mercado Mundial. México, D.F.: Depósito de documentos FAO.

[2] FAO. (2013) Food Outlook, Biannual Report on Global Food Markets.

[3] Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bruhn, J., Christensen, A., & Giskov, M. (2002). Food spoilage-interactions between food spoilage bacteria.. *International Journal of Food Microbiology.*, 78 (1-2): 79-97.

[4] Kleerebezen, M., Boekhoerst, J., & Kranenburk, R. (2003). Secuencia completa del genoma de Lactobacillus plantarum. (Vol. 100). (PNAS, Ed).

[5] Pexara, E., Metaxopoulos, J., Eleftherios, H., & Drosinos, E. (2002). Evaluation of shelf lif of cured, cooked, sliced turkey fillets and Cooked pork sausages 'piroski-stored under vacuum and modified atmosfheres at 4 and 10 °C. *Meat Science*, 62:33-43.

[6] Ossa, Juliana.; Coral, Adriana. y Vanegas, María. Microbial of cooked porkhams associate of blown pack spoilage. Bogotá: Grupo de investigación del laboratorio de ecología microbiana y de alimentos., LEMA., Universidad de los Andes. 2010. p. 2078 – 2086.

[7] Zárate Sarapura 2012, Edgar. Efecto de la concentración de cloruro de sodio y del pH sobre el crecimiento de Leuconostoc mesenteroides en embutidos cocidos empacados al vacío usando modelos matemáticos. Universidad Nacional de Callao. Vicentenario de Investigación. Ciencia y Tecnología Nº 9.

[8] Flores Rendón, Carolina.; et al. Storage time and identification of lactic bacteria in vacuum-packed ground beef meat. En: Revista científica, Facultad de medicina Universidad de Zulia., Maracaibo., Venezuela. 2011. Vol. XXI, Nº 5, p. 425 - 433.

[9] De la Fuentes Salcido, Norma Margarita y BARBOSZA CORONA, José Eleazar. 2010 Inocuidad y bioconservación de alimentos. En: Ciencia y Salud. Universidad Guanajuato. Vol. 20 Nº 1. 2010. p. 43 -52.

[10] Velázquez, Esaú. Aislamiento de Leuconostoc spp.Con capacidad para deteriorar jamón cocido, rebanado y empacado al vació y su inactivación mediante alta presión hidrostática y ondas de choque. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Querétaro. Facultad de Química., Enero 2012.

SEPARATION OF COMPOUNDS WITH ANTIOXIDANT CAPACITY FROM RASPBERRY (*Rubus idaeus*) CULTIVATED IN JALISCO

(Separación de compuestos con capacidad antioxidante a partir de frambuesa cultivada en el estado de Jalisco)

Rogelio Prado-Ramírez[a], Mariana de los Angeles Mendoza Rivera[a]*, Santos Noé Luiz [a]

[a] Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.
Unidad de Tecnología Alimentaria.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia:rprado@ciatej.mx

Área del Conocimiento: Biotecnología Alimentaria

ABSTRACT
The present work was developed as an option for the use of raspberry (*Rubus idaeus*) that is not selected for sale as fresh fruit; berries are an agricultural product containing significant amounts of anthocyanins and ellagic acid. The objective was to obtain a juice concentrate of antioxidant compounds from raspberries cultivated in Jalisco using water as a solvent and evaluating the feasibility to use membrane technology as an emerging technology to obtain these valuable compounds. The raspberry juice was extracted using a domestic processor, subsequently a pretreatment of the juice was carried out by using two commercial enzymes (Viscozyme® and Pectinex®), two temperatures (30 and 40 ° C), two reaction times (50 and 100 min) and two enzyme concentrations (0.1 and 0.3% v / v). Enzymatically treated juice was filtered with diatomaceous earth, evaluating three concentrations (0.1, 0.3 and 0.5% w / v) and measuring the content filtering in total anthocyanins (AT). The concentration of antioxidants in the clarified juice was made through the use of membrane technology, using membranes with the following MWCO (molecular weight cut off) of 0.22 µm (microfiltration), 100 kDa and 10 kDa (ultrafiltration). Antioxidant activity was determined in the obtained concentrate by using DPPH method. The highest AT content of 24.10 mg / mL and 23.48 mg / mL was achieved in both cases using 0.1% enzyme, 40 ° C and 100 minutes of treatment using enzyme and Pectinex® Viscozyme® respectively; concentration of 0.3% diatomaceous earth yield better permeate volume and better clarification. Biggest antioxidant activity levels were obtained in permeate of 10 kDa with 77.43% of the free radical concentration, equivalent to 8.51 mg / 100 mL of raspberry juice.

Keywords: raspberry (*Rubus idaeus*), antioxidant capacity, membrane filtration.

RESUMEN
El presente trabajo se desarrolló como una opción para el aprovechamiento de la frambuesa (*Rubus idaeus*) que no es seleccionada para su venta como fruta fresca; los berries son un producto agrícola que contiene cantidades importantes de antocianinas y ácido elágico. El objetivo del mismo, fue obtener un concentrado de compuestos antioxidantes a partir de frambuesas cultivadas en el estado de Jalisco, utilizando agua como solvente, por lo que se propuso el uso de tecnología de membranas como alternativa viable para la obtención de dichos compuestos. El jugo fue extraído con un procesador doméstico, posteriormente se evaluaron las condiciones de tratamiento del jugo con 2 enzimas

comerciales (Viscozyme® y Pectinex®), 2 temperaturas (30 y 40°C), 2 tiempos de reacción (50 y 100 min) y 3 concentraciones de enzima (0.1 y 0.3% v/v). El jugo tratado enzimáticamente, se filtró con tierras diatomáceas, evaluando tres concentraciones (0.1, 0.3 y 0.5% p/v) midiendo en el filtrado el contenido de antocianinas totales (AT). La concentración de antioxidantes en el jugo clarificado, se realizó a través del empleo de tecnología de membranas, utilizando los siguientes MWCO 0.22 µm, 100 kDa y 10 kDa. En el concentrado obtenido, se determinó la actividad antioxidante mediante el método DPPH. El contenido más alto de AT 24.10 mg/mL y 23.48 mg/mL se alcanzó utilizando en ambos casos 0.1% de enzima, 40°C y 100 minutos de tratamiento utilizando enzima Viscozyme® y Pectinex® respectivamente, la concentración 0.3% de tierras deatomáceas presentó mejor volumen de permeado y mejor clarificación. En cuanto a la actividad antioxidante los mayores niveles se obtuvieron en el permeado de 10 kDa con un 77.43% de la concentración radical libre, equivalente a 8.51 mg/100 mL de jugo de frambuesa.

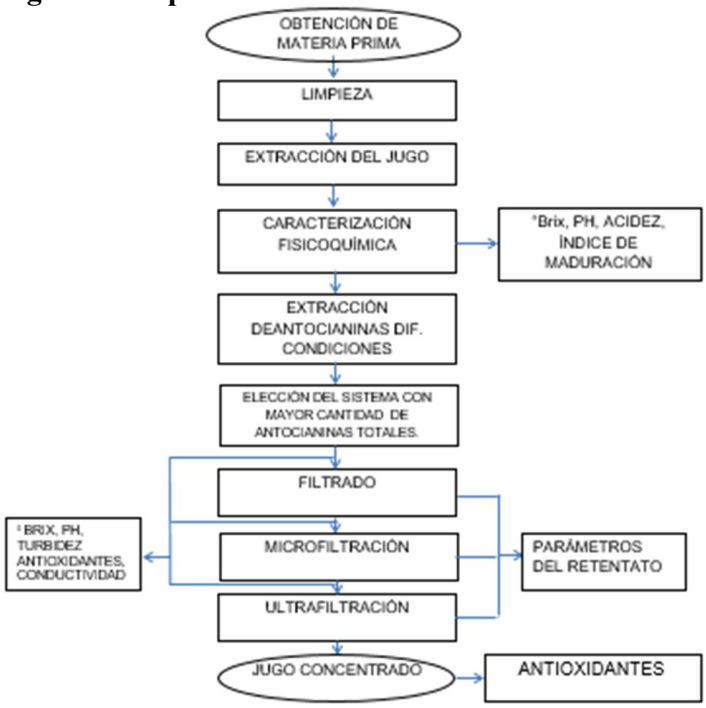
Palabras Clave: Frambuesas; antiocianinas; filtración tangencial.

INTRODUCCIÓN

Debido a la oportunidad de obtener un valor agregado en la transformación de productos como las frambuesas y a la gran preocupación de los consumidores que se ve reflejada por la creciente demanda de alimentos funcionales, se propone establecer el proceso para la “obtención de compuestos antioxidantes a partir de berries (grupo al que pertenece la frambuesa) en el estado de Jalisco”,
Los alcances que posee este proyecto es, servir de base para proyectos industriales que busquen elaborar productos que contengan en su formulación el concentrado de frambuesa y por ende actividad antioxidante, el cual se verá reflejado como una alternativa productiva viable y rentable para el sector rural, que marque la pauta para fomentar el desarrollo de esta agroindustria, permitiendo dar valor agregado a la producción de frambuesas del campo jalisciense que conlleve a un mayor desarrollo regional.

METODOLOGÍA

3.1 Esquema del diagrama del proceso



Se empleó frambuesa proveniente del estado de Jalisco como materia prima para la extracción de antioxidantes, se le realizó un lavado y desinfección con hipoclorito de sodio al 10% en una concentración de 50 ppm. La materia prima tratada fue aquella que no pasó el control de calidad y fue rechazada para venta en comercios, es decir, se obtuvieron frambuesas maduras y con coloración no uniforme. Posteriormente, se extrajo el jugo de las mismas mediante una licuadora industrial para después pasarlo a través de un molino de frutas hasta formar una pasta, posteriormente fue introducida a una refinadora con un tamiz de 0,5 mm.

El jugo obtenido se caracterizó midiendo el Ph [1], sólidos solubles (refractómetro digital), acidez total [2] los resultados fueron expresados en mg de ácido gálico/100 g de muestra, índice de madurez el cual se llevó a cabo realizando el cociente °Brix/acidez.

La extracción de antocianinas se realizó utilizando dos tipos de enzimas comerciales (Pectinex® y Viscozyme®), evaluando condiciones de tratamiento con 2 temperaturas (30 y 40°C), 2 tiempos de reacción (50 y 100 min) y 3 concentraciones de enzima (0.1, 0.3 y 0.5 % v/v). El jugo tratado enzimáticamente, se filtró con tierras diatomáceas, evaluando tres concentraciones (0.1, 0.3 y 0.5% p/v) midiendo en el filtrado el contenido de antocianinas totales (AT). Se procedió a filtrar mediante una membrana de 0.22 µm en un equipo Millipore con aire comprimido, en seguida se microfiltró a través de una membrana de 100 kDa para finalmente ultrafiltrar a través de una membrana de 10 kDa, los últimos dos se realizaron con un equipo de filtración tangencial Cogent de Millipore. Finalmente, se determinó la actividad antioxidante mediante el método DPPH y su equivalente a ácido ascórbico en una curva con concentraciones de 2 a 10 mg/100mL.

Se realizaron diluciones de la muestra de frambuesa con los tratamientos mencionados anteriormente, para realizar lectura de los azúcares reductores presentes, mediante el método DNS.

RESULTADOS

Obtención del jugo

Se procesaron 7.86 kg de frambuesa y se obtuvieron 5.14 litros de jugo y 2.30 kg de residuos, con las características a continuación mostradas:

Ph: 3.38± 0.01 **Conductividad (20°C) (µs/cm)** : 710.6 ± 15 **Índice de madurez:**0.49

°Brix:8.6± 0.14 **Acidez total g/L ác. Cítrico:** 17.66±0.10

Pre tratamiento del jugo

Se evaluó el volumen filtrado con respecto al tiempo para el jugo tratado enzimaticamente, en el cual se pudo observar la influencia que tuvo la concentración de ayudafiltro en el tiempo de obtención de un volumen aproximado de 88 mL, que fue el máximo obtenido para este caso; el cual tuvo un aumento del 14.77% respecto al resultado obtenido para el volumen máximo cuando se filtró el jugo sin ser tratado enzimáticamente. Este volumen fue alcanzado en un tiempo de 2.25 min., utilizando 0.1%; 3.42 min., utilizando 0.3% y un tiempo máximo de 11 minutos utilizando ayudafiltro al 0.5%, sin embargo cabe destacar que el filtrado obtenido no presentaban la misma claridad (ver tabla 1), siendo que el jugo tratado con 0.1% presentó una absorbancia de 0.0524; al 0.3% 0.047 de absorbancia y finalmente el jugo tratado con una concentración al 0.5% de diatomáceas presento la mayor claridad con una absorbancia de 0.0461. Evaluando claridad y tiempo de filtrado se optó por utilizar la concentración de 0.3% de ayudafiltro dado el tiempo respecto al filtrado con 0.5%. En estas condiciones se obtuvo una concentración de antocianinas totales de 15.1334 mg/mL, y 4.7° Brix.

Tabla 1. Resultados de los parámetros medidos después del tratamiento enzimático.

Enzima	Concentración (%)	Temperatura (° C)	Tiempo (min)	Conductividad (µS/cm) 20°C	Azucares reductores (g/L)	Antocianinas totales (mg/ml)	Claridad 650 nm
VISCOZYME	0.1	30	50	672	38.06	18.54	0.71
	0.1	30	100	729	74.24	19.20	0.86
	0.1	40	50	755	53.84	17.61	0.87
	0.1	40	100	742	32.39	24.10	0.88
	0.3	30	50	709	54.57	18.13	0.72
	0.3	30	100	741	74.00	22.82	0.70
	0.3	40	50	775	110.87	22.64	0.90
	0.3	40	100	782	27.34	20.52	0.76
PECTINEX	0.1	30	50	708	74.66	19.18	0.72
	0.1	30	100	754	47.60	20.77	1.04
	0.1	40	50	747	56.37	18.39	0.98
	0.1	40	100	753	59.35	23.48	0.87
	0.3	30	50	736	76.93	17.79	0.48
	0.3	30	100	747	56.58	20.25	0.53
	0.3	40	50	775	76.46	21.43	0.75
	0.3	40	100	812	48.56	18.23	1.12

Las consideraciones para elección de las mejores condiciones se basaron en la mayor concentración de AZR, menor absorbancia medida a 650 nm y mayor contenido de antocianinas totales (mediante el método DPPH, utilizando 150 µM en metanol al 80%, realizando lecturas a 520 nm).

Filtrado del lote con las condiciones seleccionadas.

Una vez determinadas las condiciones de operación, se realizó el filtrado con un volumen inicial de 1.8 litros de jugo de frambuesa obteniendo un permeado de 1.5 litros de jugo y 155.69 gr de residuos en el papel filtrante.

Tabla 2. Medición de actividad antioxidante (% de inhibición).

Corrida (min)	Jugo +Enzima	Filtrado 0.22µm	Retentato 0.22µm	Filtrado 100 kDa	Retentato 100 kDa	Filtrado 10kDa	Retentato 10 kDa
30	61.25	67.61	47.37	73.01	68.09	76.64	68.39

Una vez realizado el seccionamiento por las diferentes etapas de filtrado se realizó la medición de actividad antioxidante mediante el método DPPH, calculándose el porcentaje de inhibición. Encontrando que se tuvo mayor actividad antioxidante con el jugo filtrado a 10 kDa, inhibiendo un 76.64% la concentración del radical libre, el cual fue expresado en equivalentes de ácido ascórbico mediante la siguiente ecuación y=7.2704x+15.518, donde "y" representa el % de inhibición y "x" la concentración de ácido ascórbico en mg/100 mL. Por lo tanto, 76.64% representa 8.40 mg ác. ascórbico/100mL.

DISCUSIONES

En cuanto a la caracterización fisicoquímica del jugo de frambuesa extraído, se encontraron valores similares de pH y sólidos totales en un estudio reportado por Piotr Mazur [3].

Para la concentración de azúcares reductores obtenidos utilizando enzima Viscozyme® se pudo observar que el tiempo de tratamiento sí tuvo influencia ya que se obtuvo aproximadamente el 50% de concentración a una temperatura de 30°C en un lapso de 100 minutos (38.06 g/L) en comparación del tratado a 50 min. y 30°C (24.64 g/L); respecto a la temperatura utilizada en el tratamiento para la concentración 0.1 %, se observó una disminución en el contenido de azúcares reductores cuando se trató a 100 minutos comparado con el tratado a 50 minutos para una temperatura de 40°C; Para la concentración de enzima al 0.3% a una temperatura de 30° C se observó una mayor concentración de azúcares reductores el tratado a 100 minutos, obteniendo casi la misma concentración que la obtenida a 100 minutos tratados a 30°C con concentración de enzima al 0.1%.

Con respecto a la temperatura, se obtuvo el máximo de concentración de azúcares reductores a 40°C tratado a 50 minutos al 0.3% de enzima, llegando a una concentración 110.87 g/L, incluso superando a las concentraciones obtenidas por la enzima Pectinex®.

Con respecto a las concentraciones de enzima utilizando Pectinex®, se observaron mejores resultados a una concentración de 0.1% de enzima, 50 minutos de tratamiento a 30°C; 0.3% de enzima, 50 minutos a 30°C; 0.3 % de enzima, 50 minutos a 40°C, obteniéndose 74.66 g/L, 76.93 g/L y 76.46 g/L respectivamente. En general los azúcares reductores se vieron afectados por los tratamientos largos (100 min.) a 40°C.

Referente al contenido de antocianinas totales se obtuvo la mayor concentración utilizando ambas enzimas a temperatura de 40°C, 100 minutos de tratamiento y concentración de 0.1%; obteniendo el máximo contenido utilizando la enzima Viscozyme® con un valor de 24.10 mg/mL.

La claridad más alta se obtuvo utilizando la enzima Pectinex® a una concentración de 0.3% a una temperatura de 30°C a los dos tiempos evaluados, con la máxima claridad la tratada a 50 minutos con un valor de absorbancia de 0.48.

Respecto a la actividad antioxidante, Cerón Bonilla realizó un trabajo con mora pesando 60 gr. de fruta molida, aforándolo a 50 mL con el solvente correspondiente, agitándolo durante 2 hrs. En oscuridad y sin oxígeno han obtenido actividad antioxidante en equivalente de ácido ascórbico de aproximadamente 383.46 mg/100 gr peso de muestra, cabe mencionar que éstas mediciones se obtuvieron de extracto de un sistema etanol-agua 70:30 a 35°C, mientras que sólo ocupando agua se obtuvo aproximadamente alrededor de 50-60 mg/100 gr peso de muestra [4], sin embargo no realizaron el proceso de separación de estos compuestos.

Siendo además que los resultados pudieron verse afectados por el tiempo de almacenamiento una vez realizado su descongelación, así como la exposición a la luz y oxigenación durante todo el proceso.

CONCLUSIONES

Se lograron establecer las condiciones de proceso de filtración con membranas con MWCO de 0.22µm-100kDa y 10 kDa en conjunto con la enzima Pectinex®, permitiendo la obtención de un concentrado rico en compuestos antioxidantes utilizando como materia prima frambuesas variedad *Rubus idaeus L.*

REFERENCIAS

[1] **A.O.A.C.** 1999. Method Nº 981.12. Official Methods of Analisys, 17 Edition. Association of Official Analytical Chemists, Washington, USA.

[2] **A.O.A.C.** 1999. Method Nº 942.15.Official Methods of Analisys, 17 Edition, Association of Official Analytical Chemists, Washington,USA.

[3] **PIOTR MAZUR SEBASTIÁN, et al.,** 2014. "Quality and chemical composition of ten red raspberry (Rubus idaeus L.) genotypes during three harvest seasons".

[4] **CERÓN B.M.,** Tesis profesional. 2008. Extracción, caracterización y estabilidad de antocianinas y otros compuestos antioxidantes obtenidos a partir de zarzamora. Cholula, Puebla México.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

EFFECT AND APPLICATION OF A PROBIOTIC HEAT-RESISTANT ENCAPSULATED BACTERIA (B. *coagulans*), OVER THE PHYSICOCHEMICAL AND THE TEXTURE PROPERTIES IN A FOOD MODEL (BREAD BUN)

[Efecto de la aplicación de una bacteria probiótica termorresistente encapsulada (*B. coagulans*), sobre las propiedades fisicoquímica y de textura en un alimento modelo (pan tipo bollo)]

María Dolores García-Parra[b+], Kenia Castañeda-Morales[a*], Norma Morales-Hernández[b]

[a] Tesista de Licenciatura. Instituto Tecnológico de Acapulco Guerrero (ITA), Ingeniería Bioquímica. Av. Instituto Tecnológico s/n, Crucero de Cayaco, Acapulco, Gro. CP 39905

[b] Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ), departamento de Tecnología de Alimentos, Avenida Normalistas #800, Colinas de la Normal, C.P. 44270, Tel. (33) 33 45 52 00 Ext. 1241.

*Autor que presentó.
+Autor para correspondencia: dgarcia@ciatej.mx

Área del Conocimiento: Biotecnología Alimentaria

ABSTRACT
The bacterium *B. coagulans* utilized in this work is considered a probiotic bacterium. This bacterium is 140 degrees Celsius heat-resistant, and it was encapsulated to maintain the viability during the food process elaboration. At this moment the effect it can have the presence of this bacterium in a food on the physicochemical proprieties is unknown. Hence, the work of the physicochemical properties, we studied in a model food (bread bun), the presence of the encapsulated bacterium was compared to additional products without encapsulated bacterium and utilized the bread bun without bacterium as a control. Three different lots of the bread bun were made, one containing the encapsulated bacteria; one with no encapsulated bacteria; and one without bacteria that was used as a control. As for the hypothesis suspected encapsulated bacteria do not present significant changes in the physicochemical properties of bread control.The samples were packed in vacuum bags and stored at (4°C and 20°C), were analyzed in 4 phases (0, 4, 8, and 12 days), they analyzed the physicochemical properties (aw, pH, humidity % and differential color) and some texture parameter (force, strength, and chewiness); STATGRAPHICS centurion XVI analyzed the results; the results showed that the temperature does not introduce significant time difference effect, samples with encapsulated bacterium showed higher value in content of water activity, moisture and differential of color with respect to other samples in terms of pH samples with bacterium capped encapsulated and presented a similar behavior. The texture parameters showed significant difference with respect to time and temperature during the phases. Higher values were present in phase 8 and 12 days in reference to the 20 °C, which had more impact over the sample. The encapsulated bacteria sample showed a higher level in the parameters of texture, and showed a minimum value which was the control sample.

Keywords: *B. coagulans,* probiotic, heat-resistant, encapsulated.

RESUMEN

La batería *B.coagulans* utilizada en este trabajo es considerada como una bacteria probiótica, es termorresitente a 140°C, fue encapsulada para mantener su viabilidad durante el proceso de elaboración del alimento. Hasta el momento no se conoce el efecto que puede tener la presencia de esta bacteria en un producto alimenticio sobre las propiedades fisicoquímicas; en el presente trabajo se estudiaron las propiedades fisicoquímicas en un alimento modelo (pan bollo), con la presencia de esta bacteria encapsulada, y los resultados se compararon con productos adicionados con la bacteria sin encapsular y utilizando como control pan tipo bollo sin bacteria. Se realizaron tres lote de pan, uno con la bacteria encapsulada, otro con la bacteria sin encapsular y el tercero fue el pan control sin bacteria, las muestras fueron envasada en bolsas al vacío y almacenadas a (4°C y 20°C), fueron analizadas en 4 tiempos (0, 4, 8 y 12 días), se analizaron las propiedades fisicoquímicas (a_w, pH, humedad y color) y algunos parámetros de textura (fuerza, dureza, masticabilidad), los resultados fueron analizados por STATGRAPHICS centurión XVI. Los resultados mostraron que la temperatura no presento efecto significativo a diferencia del tiempo, las muestras con la bacteria encapsula presentaron mayor valor tanto en contenido de actividad de agua, humedad y color con respecto a las demás muestras, en cuanto al pH las muestras con bacteria encapsulada y no encapsulada presentaron un comportamiento similar. Los parámetros de textura mostraron diferencia significativa respecto al tiempo y temperatura ya que presentaron valores elevados en el tiempo 8 y 12 con referente a la temperatura a 20°C la cual tuvo mayor efecto sobre las muestra, la muestra con la bacteria encapsulada fue la que presento un valor elevado en los tres parámetros mientras que la muestra control fue la que presento un mínimo valor en los tres parámetros.

Palabras Clave: *B.coagulans,* probiotico, termorresitente, encapsular.

INTRODUCCIÓN

Los probióticos se han definido como mono o cultivos mixtos de microorganismo vivos, que cuando se administra en cantidades adecuadas, confieren beneficio a la salud del consumidor [3]. La bacteria *B. coagulans* se ha utilizado como probiótico en el tratamiento de trastornos gastrointestinales, infecciones vaginales, en tratamiento para la hipercolesterolemia, y en pacientes intolerantes a lactosa, coma hepático, pre-coma y como un adyuvante a la terapia antibiótica. Las células *B. coagulans*, se caracterizan como Gram positivas G(+), bacilos móviles, de cadenas cortas de longitudes variables. Es una bacteria termófila su temperatura óptima es de 35-50°C y su temperatura máxima es de 57-61°C de crecimiento y a pH entre 5.5-6.5. Metabólicamente son anaerobios facultativos y producen ácidos pero no hay gas debido a la fermentación de maltosa, manitol, rafinosa, sacarosa y trehalosa. El diámetro celular de la bacteria es de 0.6 a 1.0 micras, las esporas son elipsoidal pero a veces aparecerá esférica algunas cepas, no esporulan fácilmente, después de dos días de incubación en TSA las colonias son de 1 a 3 mm de diámetro, blanco, convexo, con bordes enteros y lisa en su superficie; se convierten con el tiempo de color crema [5]. Estas características favorecen el crecimiento de *B. coagulans* y pueden desarrollarse en algunos alimentos ácidos y se han reportado que reduce la calidad de productos lácteos, verduras o frutas, debido a la producción de alta cantidad de ácido láctico [1,3,8,4]. Por el contrario, la producción de ácido láctico y de otros productos tales como enzimas termoestables pueden ser explotados a nivel industrial [7,2,10]. La encapsulación es una técnica que se utiliza para mejorar la supervivencia de las bacterias probioticas en productos lácteos, la retención física de las células en una matriz encapsulante los protege de factores adversos [9]. El proceso de encapsulación de microorganismo probiotico consiste en recubrir a los organismos usando agente gelificantes que resistan los diferentes valores de pH que se encuentran en el tracto gastrointestinal. Esta tecnología

soluciona algunos problemas en el proceso, debido a que captura el ingrediente principal como núcleo central y se recubre con una capa inerte o protectora que mejora la estabilidad durante el paso por el tracto gastrointestinal [11]. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de una bacteria prebiótico termorresistente encapsulada (*B. coagulans), aplicada* en un alimento modelo (pan tipo bollo) sobre las propiedades físico químicas, y comparar los resultados con una muestra de pan adicionada con la bacteria sin encapsular utilizando un pan sin la bacteria (control).

METODOLOGIA

Material biológico

La bacteria utilizada para este estudio fue aislada de un alimento y caracterizada por los métodos de Gram, catalasa, tinción de esporas y la identificación molecular de la bacteria aislada se realizó mediante PCR de colonia. Se amplificó el gen ribosomal 16S utilizando los iniciadores. Los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

Aplicación de la bacterias (*B. coagulans)* en el alimento modelo

Se realizaron tres diferentes lotes de pan bollo al primer lote se le incorporo la bacteria *B. coagulans* encapsulada obtenida del secado por aspersión, el segundo con la bacteria húmeda sin encapsular y como control se realizó un pan sin la presencia de la bacteria, por cada lote se elaboró 1,575gr de masa para obtener 15 bollos cada uno de 100 gr, para el primer lote agrego 3.51 gr (35100000 UFC/gr) de polvo con la bacteria encapsulada, y para el lote con la bacteria húmeda sin encapsular se agregaron 0.2090 gr. Para la preparación de la masa se pesó la materia prima, posteriormente se llevó cabo el mezclado en una batidora donde se vertió primero la materia solida (harina, sal, azúcar estándar, levadura granular), después se adiciono la leche, aceite, huevo, agua y mantequilla; la adición de las bacterias tanto la encapsulada y la no encapsulada se mezcló en el aceite y se adiciono a la mezcla con todos los ingredientes, enseguida se amaso en la batidora durante 10 minutos, luego se dejó fermentar la masa durante 1 hora a 30 °C, se realizaron divisiones de 100 gr de masa y esta se moldeo hasta obtener la forma de un bollo, cada masa moldeada se colocó en una charola y sometidos al horneado a 150°C durante 25 minutos, posteriormente se enfriaron por 40 min en condiciones estériles y empacadas al vació.

Almacenamiento de las muestras (pan tipo bollo)

Las muestras fueron empacados al vacío en bolsas de polietileno y almacenadas dos temperatura (4 y 20°C) y analizados a 4 tiempo (0, 4, 8 y 12 días).

Determinación de la actividad de agua en el alimento (a_w).

La determinación de a la actividad de agua se realizó utilizando el equipo Aqua Lab, para esta prueba se utilizó una rodaja de pan de diámetro de 3 cm el cual se introdujo en el equipo para su lectura, la prueba se realizó por triplicado.

Determinación de pH del alimento.

Se necesitó 5 gr de la muestra y 45 ml de agua destilada y se tomó la lectura en el potenciómetro ORIONSTART A211, calibrado previamente con los buffer de (10,7 y 4).

Determinación de color en el alimento

El color del pan fue medido con un Espectrofotómetro CM-5 KONIKA MINOLTA SENSING, en muestras de pan molió, los parámetros que se midieron fueron L, a, y b.

Textura

Para el análisis de perfil de textura (TPA) del pan se utilizó un texturómetro TA.XT.PLUS TEXTURE ANALYSER, previamente calibrado; para realizar la lectura en el texturometro se realizaron cortes circulares de 3 cm de diámetro y 12 mm de grosor utilizando un molde de acero inoxidable, se realizaron 7 réplicas en las mismas condiciones.

Humedad

El análisis de humedad se determinó por el método de secado por estufa (Nollet, 1996), donde la cantidad de muestra que se tomó para esta prueba fueron 3 gr la cual fue pesada en una balanza analítica y posteriormente fue introducida en un horno a una temperatura a 80°C durante 24 h.

Análisis estadístico de los datos

El análisis de los resultados fueron analizados en el programa estadístico STATGRAPHICS centurión XVI, bajo un diseño experimental multifactorial con un nivel de confianza del 95%.

RESULTADOS

ANÁLISIS FISICOQUIMICO DE LAS MUESTRAS DE PAN

En la tabla 1 se presentan los resultados de las muestras de pan analizadas durante 3 semanas a dos diferentes temperaturas y muestreadas durante cada 4 días; señalando de color rojos aquellos valores que tuvieron significancia estadística < 0.005; de acuerdo a los resultados los factores que tuvieron diferencia estadística significativa fueron el tiempo y la muestras para todos los parámetros analizados a diferencia de la temperatura que solo se aprecia diferencia estadística significativa en el color.

Tabla1. Análisis de varianza (ANOVA) de los factores fisicoquímica

	Valor-p			
	aw	**pH**	**% Humedad**	**Diferencial de color**
EFECTOS PRINCIPALES				
A:TIEMPO	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
B:TEMPERATURA (°C)	0.9813	0.6578	0.2773	0.0000
C: MUESTRA	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
INTERACCIONES				
AB	0.019	0.5837	0.1954	0.0000
AC	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
BC	0.4797	0.4217	0.5748	0.0000
ABC	0.1022	0.6307	0.0806	0.0000

DETERMINACION DE ACTIVIDAD DE AGUA (a_w) Y pH DE LAS MUETSRAS

El análisis estadístico tanto para la actividad de agua (a_w) y pH se observa que el tiempo y la muestra presentaron efecto significativo, de acuerdo a la Figura 1A existe mayor actividad de agua en las

muestra BCBE (bollo con bacteria encapsulada) mientras que la muestra BSBE (bollo sin bacteria encapsulada) presento menor actividad de agua durante su muestreo.

En la Figura 1B la gráfica de interacciones podemos observar que el tiempo fue un factor determinante ya que conforme avanzaba el tiempo el pH disminuía gradualmente, la muestras BCBE y BSBE tuvieron valores de pH similar en comparación con el control que presento un pH inferior.

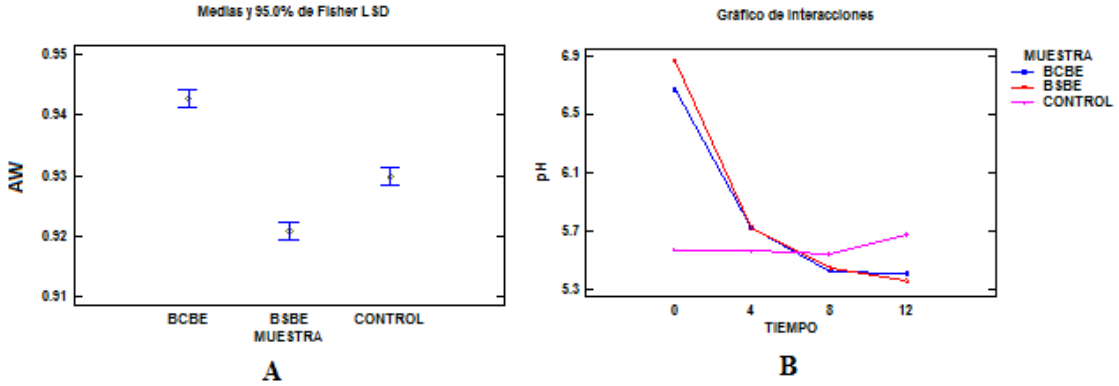


Figura1. Representación de los valores de a_w y pH respecto a las muestra

DETERMINACION DEL % DE HUMEDAD Y DIFERNCIAL DE COLOR DE LAS MUETSRAS

De acuerdo a la tabla 1 el análisis estadístico nos muestra que él % de humedad solo presento valores significativo en dos efectos (tiempo y muestra) mientras que el diferencial de color presento valores significativo en todos sus efectos.

ANÁLISIS DE TEXTURA DE MUESTRAS DE PAN

En la tabla 2 se presentan los valores significativos de las muestras de pan analizadas durante 3 semanas a dos diferentes temperaturas y muestreadas durante cada 4 días; señalando de color rojos aquellos valores que tuvieron significancia estadística < 0.005; de acuerdo a los resultados todos los factores tuvieron diferencia estadística significativa.

Tabla2. Análisis de varianza (ANOVA) de los factores de textura.

	Valor-p		
	Fuerza	**Dureza**	**Masticabilidad**
EFECTOS PRINCIPALES			
A:TIEMPO	0.0000	0.0000	0.0005
B:TEMPERATURA (°C)	0.01	0.01	0.0004
C: MUESTRA	0.0000	0.0000	0.0000
INTERACCIONES			
AB	0.0007	0.0007	0.0096
AC	0.0000	0.0000	0.0000
BC	0.0003	0.0003	0.079
ABC	0.0006	0.0006	0.1325

FUERZA

De acuerdo al análisis estadístico todos los valores

presentaron diferencia significativas, por lo que en la figura 3 podemos observar que la muestra BCBE (bollo con bacteria encapsulada) presento el valor más alto con respecto a las demás muestras siendo la muestra control aquella que tuvo menor fuerza.

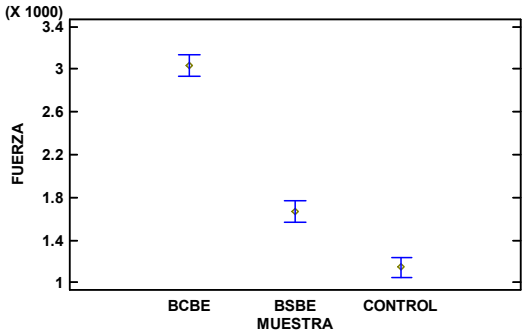


Figura3. Representación de los valores del parámetro de textura (FUERZA)

DUREZA Y MASTICABILIDAD

De acuerdo con la Figura 4A y 4B nos indica que la muestra BCBE (bollo con la bacteria encapsulada) presenta mayor dureza y masticabilidad, por lo tanto el control fue la muestra con valores de estos parámetros bajos

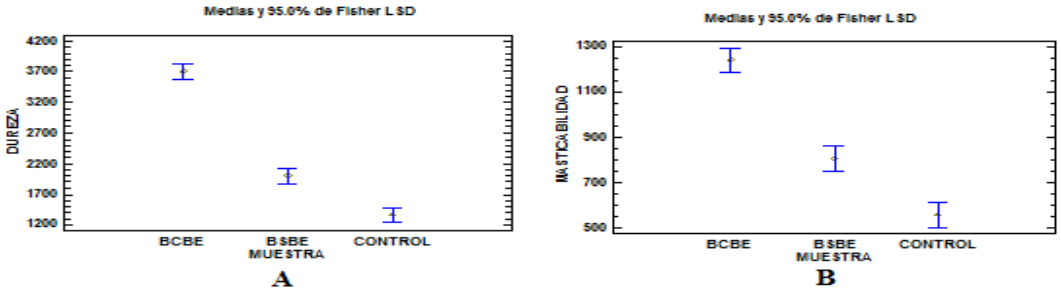


Figura4. Representación de los valores del parámetro de textura (DUREZA Y MASRICABILIDAD)

DISCUSIÓN

De acuerdo a los valores estadísticos obtenidos, las muestras BCBE (bollo con la bacteria encapsulada) resulto ser la muestra con valores más elevados con respecto a la muestra BSBE (bollo sin la bacteria encapsulada) dado que en tres de los cuatro parámetros fisicoquímicos analizados obtuvo mayor diferencia, estos parámetros fueron (a_w, % humedad, y diferencial de color), en cuanto al pH estas dos muestras se comportaron similares obteniendo poca diferencia entre cada una de ellas, mientras que en los tres parámetros de textura analizados, las muestras BCBE (bollo con la bacteria encapsulada) presentaron mayor valor que la muestra sin la bacteria encapsulada. Mientras que las muestra BCBE (bollo con la bacteria encapsulada) con respecto al control presento mayor diferencia en todos los parámetros tanto fisicoquímico y de textura.

CONCLUSIÓN

La muestra BCBE (bollo con bacteria encapsulada) fue la que presento mayor porcentaje en valores elevados en cuanto a los parámetros fisicoquímico y de textura, en comparación con la muestra control que presento valores muy bajos, por lo que nos indica que la presencia de la bacteria probiótica *B.coagulans* tuvo efecto alguno sobre el alimento modelo (pan tipo bollo).

AGRADECIMIENTO

El presente trabajo de investigación es dedicado al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ) y en especial a la Dra. María Dolores García parra y a la Maestra Norma Morales Hernández por brindarme la oportunidad de haber desarrollado este proyecto.

REFERENCIAS

[1] Anderson, RE. (1984). Growth and corresponding elevation of tomato juice pH by *Bacillus coagulans*. *Journal of Food Science* **49**:647-649.

[2] Batra, N., Singh, J., Banerjee, U.C., Patnaik, P.R. and Sobti R.C. (2002). Production and characterization of a thermostable beta-galactosidase from *Bacillus coagulans* RCS3. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **36**:1-6.

[3] Cosentino, S., Mulargia, A.E., Pisano, B., Tuveri, P. and Palmas, F. (1997). Incidence and biochemical characteristics of *Bacillus* flora in Sardinian dairy products. *International Journal of Food Microbiology* **38:**235-238.

[4] De Clerck, E., Rodriguez-Diaz, M., Forsyth, G., Lebbe, L., Logan, N.A. and De Vos, P. (2004). Polyphasic characterization of Bacillus coagulans strains, illustrating heterogeneity within this species, and emended description of the species. *Systematic Applied Microbiology* **27**: 50-60.

[5] Elke De Clerck, Marina Rodriguez-Diaz, Gillian Forsyth, Liesbeth Lebbe, Niall A. Logan, and Paul DeVos (2003) "Polyphasic Characterization of *Bacillus coagulans* Strains, Illustrating Heterogeneity within this Species, and Emended Description of the Species". System. Appl. Microbiol. 27, 50–60 (2004)

[6] FAO/WHO. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. 2002 Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation. Available at: http:www.fao.org/es/ESN/food/ foodandfoo_probio_en.stm.

[7] Payot, T., Chemaly, Z. and Fick, M. (1999). Lactic acid production by *Bacillus coagulans*-kinetic studies and optimization of culture medium for batch and continuous fermentations. *Enzyme and Microbial Technology* **24**:191-199.

[8] Ramon-Blanco, C., Sanz-Gomez, J.J., Lopez-Diaz, T.M., Otero, A. and Garcia-Lopez, M.L. (1999). Numbers and species of *Bacillus* during the manufacture and ripening of Castellano cheese. *Milchwissenschaft - Milk Science International* **54:**385-388.

[9] Talwalkar, A. y kailasapathy, k 2003. Effect of microencapsulation on oxygen toxicity in probiotic bacteria. Autralian journal of dsiry Tecnhonogy. 58: 36.39

[10] Yoon, H.G., Lee, K.H., Kim, H.Y., Kim, H.K., Shin, D.H., Hong, B.S. and Cho, H,Y. (2002). Gene cloning and biochemical analysis of thermostable chitosanase (Tch-2) from *Bacillus coagulans* Ck 108. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **66**: 986-995.

[11] Vasishtha, N. 2005. Microencapsulation: Dictionary of food and nutrition originally published by Oxford university press. Disponible hpp://www.Ecnyclopedia.com/doc/10319microencapsulation html adquirido 1/04/2008.

OPTIMIZING OF SOLID STATE BIOCONVERSION CONDITIONS OF COMMON BEAN (*Phaseolus vulgaris* L) VAR AZUFRADO HIGUERA TO PRODUCE A FUNCTIONAL FLOUR WITH ENHANCED ANTIOXIDANT POTENTIAL

(Optimización de las Condiciones de Bioconversión en Estado Solido de Frijol Común (*Phaseolus vulgaris* L) var. Azufrado Higuera para Producir una Harina Funcional con Potencial Antioxidante Incrementado)

Jorge Rodolfo León Murillo[a,*], Roberto Gutiérrez Dorado[a,b], Luis M. Sánchez Magaña[b], Jorge Milán Carrillo[a,b], Saraid M. Rochín[a,b], Cuauhtémoc Reyes Moreno[a,b,+]

[a] Programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias Químico Biológicas (FCQB), Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS), Ciudad Universitaria (CU), Culiacán, Sinaloa, México.
[b] Programa Regional de Posgrado en Biotecnología, Facultad de Ciencias Químico Biológicas (FCQB), Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS), Ciudad Universitaria (CU), Culiacán, Sinaloa, México.

*Autor que presentó el trabajo.
[+]Autor para correspondencia: creyes@uas.edu.mx

Área del Conocimiento: Biotecnología Alimentaria

ABSTRACT
The common bean provides health benefits due to the presence of antioxidants bioactive compounds. An effective way to increase the content of these bioactive compounds is by the solid state bioconversion (**SSB**), which consists in the growth of microorganisms on solid materials in the absence, or near absence, of free water surface. Researches claim that **SSB** is an effective process to enhance the antioxidant activity and phenolic content of grains. Previously, the **SSB** conditions were optimized to obtain a functional flour from black common bean with potential antioxidant activity and high total phenolic content. However, there isn't any research about the optimization of the **SSB** to enhance the antioxidant value of common bean var. azufrado higuera. Therefore, this study was conducted to find the best solid state bioconversion conditions of common bean var. azufrado higuera that would maximize the antioxidant activity and total phenolic content, and obtain functional flour with enhanced antioxidant potential. The desirability numerical method of the response surface methodology (**RSM**) was used to optimize the conditions of the **SSB** bioprocess. A central composite experimental design with two factors [fermentation temperature (**FT**)=22-45°C/fermentation time (**Ft**)=6-108 h] and five levels was used (13 treatments). The response variables were antioxidant activity (**AAox**) and total phenolic content (**TFC**) using as optimization criteria maximize these responses. The bioprocessed cotyledons from each treatment were dried, milled, and blended with its previously dried-milled seed coats. The best combination **FT/Ft** of **SSB** to obtain the functional flour was 33.5°C/108 h. **SSB** increased antioxidant activity (from 5,214 to 17,165 µmol TE/100 g, dw) and total phenolic content (**TPC**) (from 108 to 262 mg GAE/100 g, dw). In conclusion, the optimizing of **SSB** conditions of common bean var. azufrado higuera is an effective strategy to produce functional flour with enhanced antioxidant potential.

Keywords: Solid state bioconversion, common bean, antioxidant activity, total phenolic compounds, optimization.

RESUMEN
El frijol provee beneficios a la salud debido a la presencia de compuestos bioactivos antioxidantes. Una manera efectiva de incrementar el contenido de estos compuestos bioactivos es mediante la bioconversión en estado sólido (**BES**), la cual consiste en el crecimiento de microorganismos sobre materiales alimenticios sólidos en ausencia, o casi ausencia, de agua libre superficial. Algunos investigadores afirman que la **BES** es un proceso efectivo para incrementar la actividad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos de los granos. Anteriormente, la **BES** fue optimizada para obtener una harina funcional a partir de frijol común negro con potencial actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos totales alto. Sin embargo, no existe ningún reporte de investigación sobre la optimización de la **BES** para incrementar el valor antioxidante de frijol común var. azufrado higuera. Por lo cual, este estudio fue llevado a cabo para encontrar las mejores condiciones de **BES** de frijol común var. azufrado higuera que maximice los valores de actividad antioxidante y contenido de fenólicos totales y obtener una harina funcional con potencial antioxidante incrementado. El método de deseabilidad numérica de la metodología de superficie de respuesta (**MSR**) fue utilizada para optimizar las condiciones del bioproceso de **BES**. Se utilizó un diseño central compuesto rotable con dos factores [temperatura de fermentación (**TF**=22-45°C)/ tiempo de fermentación (**tF**=6-108h)] y cinco niveles (13 tratamientos). Las variables de respuesta fueron actividad antioxidante (**AAox**) y contenido de compuestos fenólicos totales (**CFT**), usando como criterios de optimización maximizar estas respuestas. Los cotiledones bioprocesados de cada tratamiento fueron secados, molturados y mezclados con sus respectivas testas previamente secadas y molturadas. La mejor combinación de **TF/tF** para obtener una harina funcional fueron 33.5°C/ 108h. La **BES** incrementó la actividad antioxidante (de 5,214 a 17,165 µmol ET/100 g, bs) y el contenido de compuestos fenólicos totales (**CFT**) (de 108 a 262 mg EAG/100 g, bs). En conclusión, la optimización de las condiciones de **BES** de frijol común var. azufrado higuera es una buena estrategia para producir una harina funcional con potencial antioxidante incrementado.

Palabras Clave: Bioconversión en estado sólido, frijol común, actividad antioxidante, compuestos fenólicos totales, optimización.

INTRODUCCIÓN

Varios investigadores han reportado que las leguminosas son una buena fuente de compuestos fenólicos y poseen actividad antioxidante significativa; además, las leguminosas constituyen una de las fuentes más abundantes y menos costosas de proteína en la dieta humana/animal [1]. El Frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es rico en compuestos bioactivos, con actividad antioxidante, que pueden incluir una variedad de flavonoides como antocianinas, flavonoles, proantocianidinas, taninos, glucósidos así como una amplia gama de ácidos fenólicos [2]. El consumo de frijol ha sido relacionado con la disminución de incidencia de enfermedades cardiacas, cáncer de colon, diabetes e hipertensión [2,3,4].

Los productos alimenticios fermentados representan alrededor de un tercio del consumo total de alimentos en el mundo; estos productos poseen actividad antioxidante (***AAox***) alta debido a la fermentación microbiana [5,6,7]. La bioconversión en estado sólido (***BES***) consiste en el crecimiento de microorganismos en materiales sólidos en ausencia, o casi ausencia, de agua libre superficial. Esta es una tecnología simple con una historia larga en Asia para mejorar la calidad alimenticia y propiedades nutracéuticas de leguminosas y/o cereales. Existe una gran cantidad de informes acerca de la diversidad

de los microorganismos que se encuentran en los alimentos fermentados. Sin embargo, *Rhizopus oligosporus* es uno de los principales hongos usados en la elaboración de tempe, un producto fermentado obtenido de la soya. Este hongo filamentoso se ha aceptado como generalmente reconocido como seguro (GRAS, por sus siglas en inglés) [8].

La metodología de superficie de respuesta (MSR) es un conjunto de las técnicas matemáticas y estadísticas que son útiles para el modelado y el análisis de variables de respuesta influenciadas por varias variables de proceso. Este es un método eficaz para establecer modelos que evalúan las variables y determinan las condiciones óptimas de respuestas deseables [9]. La mayor parte de usos de MSR en el proceso y la mejora de producto implican más de una variable de respuesta. Para optimizar varias respuestas se ha sugerido el empleo de varios métodos de optimización incluyendo el método convencional gráfico y la función de deseabilidad [10]. La utilidad de MSR para la optimización de fermentación de estado sólido ha sido demostrada con anterioridad en leguminosas [11].

METODOLOGÍA

Materiales

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L., var Azufrado Higuera) se adquirió en Mercado "Rafael Buelna", Culiacán, Sinaloa, México. La cepa de *Rhizopus oligosporus* NRRL 2710 se obtuvo de la Colección de Cultivos Tipo Americana, Manassas, EUA.

Métodos

Bioconversión en estado sólido de frijol común

La FES se realizó según la metodología reportada por Rochín-Medina [12]. Las semillas de frijol común se remojaron a 25°C durante 8 h en solución de ácido acético (pH 3.0). Se recuperaron las semillas y se separaron las testas manualmente. Las testas se secaron y molieron para pasar a través de una malla 80, se embolsaron y almacenaron (4°C). El remojo y descascarillado son pasos para acondicionar el grano para el hongo permitiendo la penetración de la enzima y el crecimiento del micelio adecuado. Los cotiledones se cocieron en solución de ácido acético (pH 3.0; 90°C / 30 min), se enfriaron (25°C), se inocularon con una suspensión de *R. oligosporus* ($1X10^6$ esporas /mL) y envasados en bolsas de polietileno perforadas (15x15 cm). Las condiciones de ***FES*** (13 tratamientos) se derivaron de la aplicación de un diseño de composición central rotable con dos factores [Temperatura de fermentación (***TF***=22-45°C) / Tiempo de fermentación (***tF***=06-108 h)] y cinco niveles (**Tabla 1**). El frijol bioprocesado se secó (50°C / 8 h), se enfrió (25°C) y se molió. Las harinas de frijol bioprocesado, provenientes de cada tratamiento, se mezclaron con sus correspondientes testas molturadas, se empacaron y se mantuvieron a 4°C en recipientes bien cerrados hasta su uso. Una vez obtenidas todas las harinas de frijol común bioprocesado, con testas añadidas, se les evaluó ***AAox*** y ***CFT***.

Extracción de compuestos fenólicos libres y ligados

La extracción de compuestos fenólicos libres se realizó según lo reportado por Dewanto [13]. Una porción de 0.5 g de harina se mezcló con 10 mL de etanol al 80%, se agitó vigorosamente y centrifugó (3000g/10°C/10 min); el sobrenadante se concentró y almacenó (-20°C) hasta su uso. Los compuestos fenólicos ligados se extrajeron a partir del precipitado según metodología reportada por Adom y Liu [1].

El residuo se hidrolizó con 10 mL de NaOH al 2N a 95°C por 30 min. Luego, la muestra se agitó (25°C / 1 h). La mezcla se acidificó con 2 mL de HCl 2N y se extrajeron los lípidos con hexano. A la solución final se le hicieron 5 lavados con 10 mL de acetato de etilo; posteriormente se concentraron y resuspendieron en metanol puro y almacenaron a -20°C hasta su uso. Todas las extracciones se hicieron por cuadriplicado.

Tabla 1. Diseño central compuesto rotable mostrando los tratamientos (combinación de los niveles de las variables de proceso) utilizados para producir harinas de frijol bioprocesado por bioconversión en estado sólido y resultados experimentales para las variables de respuesta

Tratamiento	Variable del proceso		Variable de respuesta	
	Temperatura de fermentación (°C)	Tiempo de fermentación (h)	AAox (µmol ET/100g, bs)	Comp fenólicos totales (mg EAG/100 g, bs)
1	41.63	93.06	14,178	219
2	33.5	57	12,450	193
3	33.5	6	10,097	143
4	22	57	9,986	137
5	25.37	93.06	15,166	237
6	33.5	108	17,615	259
7	45	57	10,463	149
8	33.5	57	12856	182
9	33.5	57	13,997	201
10	33.5	57	14,541	211
11	41.63	20.94	10,206	150
12	33.5	57	12,603	179
13	25.37	20.94	10,065	135

Determinación de compuestos fenólicos totales (CFT)

El contenido de compuestos fenólicos de los extractos libres y ligados se determinó utilizando el método colorimétrico descrito por Singleton y col. [14]. Alícuotas de 20 µL de cada extracto se oxidaron con 180 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EE.UU.). Después de 20 min, la absorbancia del color azul resultante se midió a 750 nm utilizando un Lector de Microplacas (Synergy™ , BioTek, Inc., Winooski, VT, EUA). Se preparó una curva de calibración usando ácido Gálico (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA) como estándar. El contenido de ***CFT*** se calculó mediante la suma de compuestos fenólicos presentes en extractos de fenólicos libres y ligados; se expresó en mg equivalentes de ácido gálico (EAG) por 100 g de muestra (bs, base seca). Todas las determinaciones se hicieron por triplicado.

Determinación de actividad antioxidante (AAox) por método ABTS

Este ensayo se realizó de acuerdo a lo descrito por Re y col [15]. La ***AAox*** se determinó a los extractos de compuestos fenólicos libres y ligados por el método del ácido 2,2-azinobis-(3-etilbenzotioazolín-6-

sulfónico) (ABTS) para compuestos hidrofílicos; procedimiento basado en la captación por los antioxidantes del radical catión ABTS·+ generado en el medio de reacción. El radical catión del ABTS posee una coloración verde-azulada con una longitud de onda de 734 nm. En este método los antioxidantes se añaden una vez el ABTS·+ se ha formado y se determina entonces la disminución de la absorbancia debida a la reducción del radical, es decir la decoloración de este. El radical ABTS+ se obtuvo tras la reacción de ABTS (7 mM) con persulfato potásico (2.45 mM) incubados a temperatura ambiente (25°C) y oscuridad durante 12-16 h. Después la solución de ABTS+ se diluyó con agua desionizada para obtener una solución de trabajo de ABTS+. La reacción entre la solución de trabajo de ABTS+ y muestras con diferentes concentraciones se iniciaron y almacenaron (25°C) hasta que la reacción fue completada. El radical ABTS+ sufrió decoloración debido a la reacción con los antioxidantes. La disminución de coloración se monitoreó en un Lector de Microplacas a 734 nm y se expresó como porcentaje de inhibición de ABTS, la cual fue comparada con una curva estándar de Trolox. Los datos se expresaron como µmol equivalentes de Trolox (ET)/100 g de muestra seca. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

Metodología de superficie de respuesta (MSR) y diseño experimental

Se aplicó la metodología de superficie de respuesta (***MSR***) para determinar las condiciones óptimas de las variables de proceso para la elaboración de una harina de frijol común bioprocesado optimizada (***HFCBO***) con actividad antioxidante (***AAox***) y compuestos fenólicos totales (***CFT***) altos. Las condiciones del proceso [número y variación (niveles mínimo y máximo) de las variables] se obtuvieron de una revisión previa de la literatura y de ensayos preliminares. Las variables del proceso consideradas en este estudio fueron temperatura (X_1 = ***TF***, 22°C-45°C) y tiempo de fermentación (X_2 = ***tF***, 06-108 h). Las variables de respuesta seleccionadas fueron ***AAox*** y ***CFT***. Se utilizó un diseño central compuesto rotable (DCCR) incluyendo 13 experimentos formados por 4 puntos factoriales, 4 axiales (λ = 1.414) y 5 centrales. Valores codificados correspondientes a los valores reales de cada variable de proceso y DCCR se muestran en la **Tabla 1**. Cada experimento individual se realizó en orden aleatorio. Un modelo de regresión cuadrático se asumió para predecir las variables de respuesta (Y). Se desarrollaron modelos de predicción para cada una de las variables de respuesta:

$$Y = \beta_{0+} + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2$$

Donde: ***Y*** es el valor de la variable de respuesta predicha considerada (***AAox***, o ***CFT***), X_1 *y* X_2 son los valores de ***TF*** y ***tF***, respectivamente, β_0 es el valor del intercepto , β_1 y β_2 son coeficientes lineales, β_{12} es el coeficiente de interacción, β_{11} *y* β_{22} son coeficientes cuadráticos. Los términos no significativos ($p > 0.1$) se eliminaron del polinomio de segundo orden y se recalculó un nuevo polinomio obteniendo un modelo de predicción para cada variable de respuesta [9,16]. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software de Design Expert software Ver. 7.0.0. [17].

Optimización del proceso de fermentación

Se aplicó el método de la función de deseabilidad descrito por de la Vara y Domínguez [18] para encontrar la mejor combinación de variables de proceso de fermentación [temperatura de fermentación (***TF***)/tiempo de fermentación (***tF)***] para producir una harina funcional de frijol común con ***AAox*** y ***CFT*** altos. La combinación de las respuestas en una función de deseabilidad requiere el cálculo de la función

de deseabilidad de forma individualizada. El método consistió en seleccionar un punto de la zona experimental $X = (X_1, X_2)$ y predecir los valores para cada variable de respuesta denominados $Y_1 (X)$ y $Y_2 (X)$, a partir de los modelos matemáticas de predicción correspondientes. Luego, cada $Y_i (X)$ se transformó en un valor de deseabilidad individual [$d_i (X)$], que cayera en el intervalo 0-1 midiendo el grado deseabilidad de la respuesta en referencia al valor óptimo determinado a ser alcanzado. En esta investigación se pretendió que los valores de las variables de respuesta fueran lo más altos posible, por lo tanto, la transformación matemática empleada para calcular d_i fue:

$$d_i(x) = \begin{cases} 0 & Si\ \ \hat{Y}(x) \leq Y_{i*} \\ \dfrac{\hat{Y}_i(x) - Y_{i*}}{Y_i^* - Y_{i*}} & Si\ \ Y_{i*} \leq \hat{Y}(x) \leq Y_i^* \\ 1 & Si\ \ \hat{Y}(x) \geq Y_i^* \end{cases}$$

Una vez obtenidos los valores de d_i para cada variable de respuesta, estos se emplearon para obtener un valor de deseabilidad global (***D***) aplicando la siguiente ecuación: [$D=(d_1 \times d_2)^{1/2}$]. El software seleccionó aleatoriamente una cantidad suficiente de puntos experimentales (X) para calcular los valores correspondientes de ***D*** en cada punto experimental seleccionado. Posteriormente, estos valores de ***D*** fueron empleados para construir un gráfico de deseabilidad global, en la cual la zona roja representó los valores predichos máximos posibles de cada respuesta, de entre los cuales se seleccionó un valor óptimo con las condiciones de ***BES*** (***TF***y ***tF***) que dieron por resultado los valores de ***AAox*** y ***CFT*** máximos posibles.

RESULTADOS

Modelos de predicción para AAox y CFT

A partir de los resultados experimentales de cada una de las variables de respuesta, y de los tratamientos que los originaron (**Tabla 1**), se desarrollaron modelos de predicción para cada una de ellas. Un buen modelo de predicción debe tener un R^2 ajustado (coeficiente de determinación) ≥ 0.80, un nivel de significancia de p≤0.05, coeficientes de variación (CV) ≤ 10%, y prueba de falta de ajuste p> 0.05; todos estos parámetros fueron usados para la validez del modelado [19,20].

La ***AAox*** de las harinas de frijol común bioprocesado (***HFCB***) varió de 9,986 hasta 17,615 µmol ET / 100 g de muestra (bs) y el contenido de ***CFT*** varió de 135 a 259 mg EAG / 100 g de muestra (bs). El análisis de varianza mostró que la ***AAox*** y el contenido de ***CFT*** dependieron de los términos lineales de temperatura de fermentación [***TF***, p <0.01], y el tiempo de fermentación [***tF***, p <0.05)] y los términos cuadráticos de ***TF*** [$(TF)^2$, p <0,01):

$$AAox = 13549.41 - 21.38(TF) + 2463.14(tF) - 1490.19(TF)^2$$

$$CFT = 198.26 + 1.69(TF) + 41.78(tF) - 22.60(TF)^2$$

Los **modelos de predicción** explicaron el 92% y 90% (p<0.0001) de la variación total en los valores ***AAox*** y ***CFT***, respectivamente; la falta de ajuste no fue significativa (p> 0.05). La dispersión relativa de los puntos experimentales a partir de las predicciones de los modelos (CV) fue de 6.23% y 7.58%, respectivamente. Estos valores indicaron que los modelos experimentales para ***AAox*** y ***CFT*** fueron adecuados y reproducibles. La harina de frijol común crudo tuvo una ***AAox***=5,214 µmol ET / 100 g de muestra (bs) y ***CFT***=108 mg GAE / 100 g de muestra (bs), los cuales fueron significativamente inferiores a

los valores máximos de ***AAox*** y ***CFT*** **[**17,615 µmol ET / 100 g de muestra (bs) y 259 mg GAE / 100 g de muestra (bs), respectivamente**]** observados a la temperatura central (***TF*** = 33.5°C) y el tiempo más largo (***tF***=108h) de fermentación (**Fig 1A y 1B)**.

(A) **(B)**

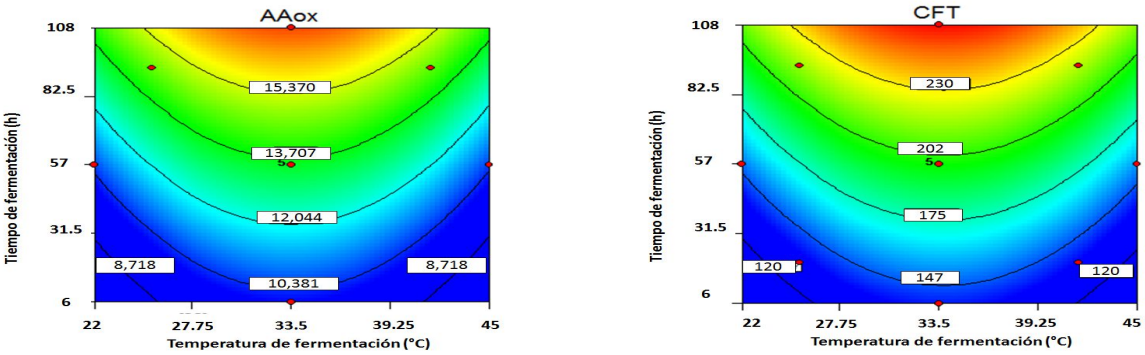


Fig 1. Gráficas de contornos que muestran el efecto de las variables ***TF*** y ***tF*** sobre: **(A)** Actividad antioxidante (µmol ET/ 100 g de muestra, bs) y **(B)** Compuestos fenólicos totales (mg EAG/100 g de muestra, bs).

Optimización

En la **Fig 2A** se muestra el gráfico de deseabilidad global (***D***), en la cual la zona roja representó los valores predichos máximos posibles de ***D*** para cada respuesta (**AAox, CFT**), de entre los cuales se seleccionó un valor óptimo (***D*=0.9545**) con las condiciones de FES (***TF***y ***tF***) que dieron por resultado los valores de ***AAox*** y ***CFT*** máximos posibles. Los valores de deseabilidad individual para cada respuesta, asociados con este valor de ***D*** máximo seleccionado fueron: d_{AAox}=0.9237, d_{CFT}=0.9863 (**Fig 2B**). La mejor combinación de variables de proceso de fermentación para la producción de harina de frijol común bioprocesado optimizado (***HFCBO***) fue: ***TF***=33.5°C/ ***tF*** =108 h (**Fig 2A)**. La ***D*** obtenida en esta investigación fue mayor que la considerada aceptable (0.6 <***D*** <0.8) de acuerdo con De la Vara y Domínguez [18]. Los valores predichos de ***AAox*** y ***CFT***, aplicando la combinación óptima de variables de proceso en los modelos de predicción, fueron de 17,032 µmol ET/100 g (bs) y 257.37 mg EAG/ 100g (bs), respectivamente. Al utilizar la mejor combinación (***TF***=33.5°C/ ***tF*** =108 h) de variables de proceso para obtener experimentalmente ***HFCBO***, realizando cinco repeticiones, se obtuvieron valores similares a los predichos [**AAox**= 16,376-17,468 µmol ET/100 g (bs) y **CFT**= 244-266 mg EAG/ 100g (bs)]. Los valores experimentales promedio de las cinco replicas para **AAox** y **CFT** de ***HFCBO*** fueron 17,165 µmol ET/100 g (bs) y 262 mg EAG/ 100g (bs), respectivamente.

DISCUSIÓN

Efecto de la aplicación de la mejor combinación TF/tF sobre AAox y CFT

La ***AAox*** de frijol común se incrementó, comparada con la de frijol común crudo, al aplicar condiciones óptimas de ***FES*** (***TF=*** 33.5°C/ ***tF=*** 108 h). La ***AAox***, evaluada mediante el método de ABTS, y el contenido de ***CFT*** se incrementó después de la fermentación. Un comportamiento similar fue reportado por Cheng y col. [5] atribuyendo el incremento en ***AAox*** a los cambios metabólicos durante la ***FES***,

principalmente a un aumento en la actividad de las enzimas endógenas durante la fermentación de los alimentos, en especial la enzima fúngica β-glucosidasa que cataliza la liberación de agliconas lo cual incrementó el contenido de ***CFT*** [21]. Estos compuestos fenólicos presentes en frijol, que poseen bioactividad alta contra los radicales libres (actividad antioxidante), pudieron aumentar significativamente durante la ***FES*** con *R oligoporus*, a través de un mecanismo similar. Se necesitan más investigaciones para estudiar el efecto del proceso de FES con *R. oligosporus* sobre el contenido de compuestos bioactivos específicos (flavonoides, ácidos fenólicos) para conocer las posibles propiedades nutracéuticas y el potencial antioxidante de la harina de frijol común bioprocesado optimizado (***HFCBO***).

(A) **(B)**

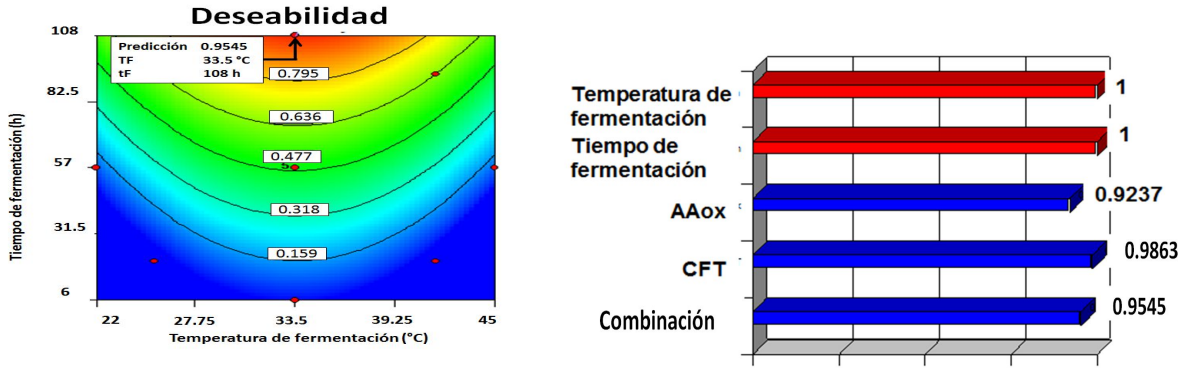


Fig. 2 Gráficas de **(A)** Deseabilidad global y (B) Deseabilidades individuales empleadas para obtener la mejor combinación de las variables de proceso (***TF***=33.5°C/***tF***=108 h) para producir harina funcional de frijol común con ***AAox*** y ***CFT*** altos.

CONCLUSIONES

La mejor combinación de variables de proceso de ***FES*** para la producción de ***HFCBO*** con actividad antioxidante (***AAox***) y contenido de compuestos fenólicos totales (***CFT***) altos fue: ***TF***= 33.5°C/***tF***=108 h. La ***FES*** aumentó significativamente la ***AAox*** y contenido de ***CFT*** del frijol común var. azufrado higuera al aplicar las condiciones óptimas de bioprocesamiento. La harina funcional (***HFCBO***) obtenida aplicando condiciones óptimas de ***FES*** puede ser utilizada como ingrediente/suplemento/alimento para reducir la incidencia de enfermedades crónico degenerativas principalmente las asociadas con el estrés oxidativo.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación recibió financiamiento del Programa de Fortalecimiento y Apoyo a Proyectos de Investigación (**PROFAPI 2013, 2014**) de la Universidad Autónoma de Sinaloa.

REFERENCIAS

[1] Adom, K.K., Liu, R.H., (2002), "Antioxidant activity of grains", Journal Agriculture Food Chemistry, 50:6182–6187.

[2] Hayat, I., Ahmad, A., Masud, T., Ahmed, A., Bashir, S., (2014). "Nutritional and health perspectives of beans (*Phaseolus vulgaris* L.): An overview". Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 54:580–592

[3] Reynoso-Camacho, R., Ríos-Ugalde, M.C., Torres-Pacheco, I., Acosta- Gallegos, J.A., Palomino-Salinas, A.C., Ramos-Gómez, M., González- Jasso, E., Guzmán-Maldonado, S.H., (2007), "El consumo de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L) y su efecto sobre el cáncer de colon en ratas Sprague-Dauley", Agricultura Técnica en México, 33:43–52.

[4] Valdez-Ortiz, A., Fuentes-Gutiérrez, C.I., Germán-Báez, L.J., Gutiérrez-Dorado, R., Medina-Godoy, S., (2012), "Protein hydrolysates obtained from Azufrado (sulphur yellow) beans (*Phaseolus vulgaris*): nutritional, ACE-inhibitory and antioxidative characterization", Food Science and Technology, 46:91–96.

[5] Cheng, K.C., Wu, J.Y., Lin, J.T., Liu, W.H., (2013), "Enhancements of isoflavone aglycones, total phenolic content, and antioxidant activity of black soybean by solid-state fermentation with *Rhizopus* sp", European Food Research and Technology, 236:1107–1113.

[6] Reyes-Bastidas, M., Reyes-Fernández, E.Z., López-Cervantes, J., Loarca-Piña, G., Reyes-Moreno, C., (2010), "Physicochemical, nutritional and antioxidant activity properties of tempeh from common beans (*Phaseolus vulgaris* L)", Food Science Technology International, 16:427–434

[7] Sánchez-Magaña, L.M., Cuevas-Rodríguez, E.O., Gutiérrez-Dorado, R., Ayala-Rodríguez, A.E., Valdez-Ortiz, A., Milán-Carrillo, J., Reyes-Moreno, C., (2014), "Solid-state bioconversion of chickpea (*Cicer arietinum* L.) by *Rhizopus oligosporus* to improve total phenolic content, antioxidant activity and hypoglycemic functionality", International Journal of Food Science and Nutrition, 65:558–564.

[8] Wongputtisin, P., Khanongnuch, C., Pongpiachan, P., Lumyong, S., (2007), "Antioxidant activity improvement of soybean meal by microbial fermentation", Research Journal of Microbiology, 2:577–583.

[9] Khuri, A.A., Cornell, J.A., (1987), "Response Surfaces: Designs and Analyses", Marcel Dekker Inc., New York, EUA, pp 1-17

[10] Fichtali, J., van de Voort, F.R., Khuri, A.I., (1990), "Multi response optimization of acid casein production", Journal of Food Process Engineering, 12:247-258.

[11] Reyes-Moreno, C., Cuevas-Rodríguez, E.O., Cárdenas-Valenzuela, O.G., Barrón-Hoyos, J., (2004), "Solid state fermentation process for producing chickpea (*Cicer arietinum* L.) tempe flour. Physicochemical and nutritional characteristics of the product", Journal of the Science of Food and Agriculture, 84:271–278

[12] Rochín-Medina, J.J., Gutiérrez-Dorado, R., Sánchez-Magaña, L.M., Milán-Carrillo, J., Cuevas-Rodríguez, E.O., Mora-Rochín, S., Valdez-Ortiz, A., Reyes-Moreno, C., (2015), "Enhancement of nutritional properties, and antioxidant and antihypertensive potential of black common bean seeds

by optimizing the solid state bioconversion process". International Journal of Food Sciences and Nutrition. 66(5):498-504.

[13] Dewanto, V., Wu, X., Liu, R.H., (2002), "Processed sweet corn has higher antioxidant activity", Journal of Agriculture and Food Chemistry, 50:4959–4964.

[14] Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M., (1999), "Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent", Methods in Enzymology, 299:152–178.

[15] Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., (1999), "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay", Free Radical Biology and Medicine, 26:1231-1237.

[16] Myers, R.H., (1971), "Response Surfaces Methodology", Allyn & Bacon, Boston MA, EUA, pp 26-106.

[17] Design Expert, (2005), Version 7.0.0. Stat-Ease, Design Expert Inc., Minneapolis.

[18] De la Vara, S.R., Domínguez, D.J., (2002), "Métodos de superficie de respuesta. Un estudio comparativo", Revista de Matemáticas: Teoría y Aplicaciones (México), 1: 47-65.

[19] Jahani, M., Alizadeh, M., Pirozifard, M., Qudsevali, A., (2008), "Optimization of enzymatic degumming process for RBO using response surface methodology". Food Science and Technology, 41:1892-1898

[20] Myers, R.H., Montgomery, D.C., (2002), "Response Surface Methodology: Product and Process Optimization Using Designed Experiments", 2nd Edition, John Wiley & Sons, New York, NY, EUA pp

[21] Hur, S.J., Lee, S.Y., Kim, Y.C., Choi, I., Kim, G.B., (2014), "Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods", Food Chemistry 160: 346–356

DEVELOPMENT OF A FILM CONTAINING ESSENTIAL OIL OF OREGANO (*Lippia graveolens*) AS AN ANTIMICROBIAL AGENT AND ITS APPLICATION IN STRAWBERRY

(Desarrollo de una película que contiene aceite esencial de orégano (*Lippia graveolens*) como agente antimicrobiano y su aplicación en fresa)

Maria Azucena Figueroa Pérez [a]*, Marithza Guadalupe Ramírez Gerardo [a], Zaira Yunuén García Carvajal [b], Estefania Lazcano Díaz [b], Yanet Karina Gutiérrez Mercado [b], Eduardo Padilla Camberos [b].

[a] Ingeniería en Industrias Alimentarias. TESVG-Tecnológico de Estudios Superiores de Villa Guerrero. Estado de México.
[b] Unidad de Biotecnología Médica y Farmacéutica. CIATEJ-Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: epadilla@ciatej.mx

Área del Conocimiento: Biotecnología Alimentaria.

ABSTRACT
Strawberry fruit can be exposing to fungal and bacterial contamination before and after harvest, also the strawberry's use life is very short. The objective of this work was: To generate a film that contains essential oil of oregano *(L. graveolens)* works as an antimicrobial agent in strawberry Albion variety. The next hypothesis was stablished: The film that contains essential oil of oregano decrease microbial growth in strawberry fruit Albion variety inoculated with the bacterial strains: *Escherichia coli* and *Salmonella choleraesuis*. The film was made mixing PVA, pectin, 2% of essential oil of oregano and tween-20, it was performed 3 cycles of freeze-thaw of the mix. The antimicrobial activity evaluation of the film was analysed by the *in vitro* disk-diffusion test. Likewise, the antimicrobial activity of the film was evaluated in previously inoculated strawberries with a mixture of *Escherichia coli* and *Salmonella choleraesuis.* The results shows that the oregano's essential oil film containing the essential oil of oregano, showed greater antimicrobial activity *in vitro* in *Salmonella choleraesuis than Escherichia coli,* with inhibition diameter of 38.3 ± 1.52 mm and 23 ± 1.0 mm respectively were obtained. In inoculated strawberries, the film decreased 4.6 log CFU/mL for *Escherichia coli* and 4.9 log CFU/mL for *Salmonella choleraesuis*. The film containing essential oil of oregano can be used to reduce microbial contamination in strawberries.

Keywords: antimicrobial activity; essential oil; film.

RESUMEN
La fresa es uno de los frutos que está expuesta a contaminarse por hongos y bacterias antes y después de la cosecha, además la vida útil de la fresa es muy corta. Es por eso que el objetivo de este trabajo fue: Desarrollar una película que contiene aceite esencial de orégano (*L. graveolens*) como antimicrobiano en fresa variedad Albión. Planteando la siguiente hipótesis: La película que contiene aceite esencial de orégano disminuirá el crecimiento microbiano en el fruto de fresa variedad Albión inoculado con las bacterias *Escherichia coli* y *Salmonella choleraesuis*. Las películas se elaboraron mezclando PVA, pectina,

2% de aceite esencial de orégano y tween-20, se realizaron ciclos de congelación y descongelación de la mezcla. La evaluación de la actividad antimicrobiana de la película se realizó mediante la prueba *in vitro* de difusión-disco. Asimismo, se evaluó la actividad antimicrobiana de la película en las fresas previamente inoculadas con una mezcla de *Escherichia coli* y *Salmonella choleraesuis.* Los resultados muestran que la película que contiene el aceite esencial de orégano, mostro mayor actividad antimicrobiana *in vitro* en *Salmonella choleraesuis* al obtener un halo de inhibición de 38.3 ± 1.52 mm de diámetro, mientras que en *Escherichia coli* se obtuvo un halo de inhibición de 23±1.0 mm de diámetro. En las pruebas en fresas inoculadas, la película disminuyó 4.6 log para *Escherichia coli* y 4.9 log en *Salmonella choleraesuis*. La película que contiene aceite esencial de orégano puede utilizarse para disminuir la contaminación microbiana en fresa.

Palabras Clave: actividad antimicrobiana; aceite esencial de orégano; película.

INTRODUCCIÓN

Las frutas frescas son parte importante de la dieta humana en todo el mundo. La fresa es una de las frutas frescas que más se consumen, además de que tiene vitaminas, minerales y antioxidantes naturales, sin embargo las fresa es una fruta muy delicada y perecedera, [1,2].

La fresa es uno de los frutos que antes, durante y después de la cosecha se encuentra expuesta a la contaminación por microorganismos[2], los patógenos bacterianos más frecuentes asociados con los productos frescos son *E. coli*, *Salmonella* y *Listeria monocytogenes* [1]

La demanda del consumidor por alimentos que sean más naturales, que no contenga conservadores químicos ha aumentado, por lo que los estudios en la industria alimentaria están experimentando con agentes antimicrobianos naturales como lo son los aceites esenciales, adicionándolos en polímeros (como lo son las películas que cubren y protegen a los alimentos) [3]. Los aceites esenciales han demostrado que tienen propiedades antimicrobianas y antifúngicas [3, 6].

Como ya se había mencionado la fresa es uno de los frutos que está expuesta a contaminarse por bacterias y los aceites esenciales son una opción de conservadores naturales. Por la cual surge la inquietud de desarrollar una película a base de PVA y pectina que contiene aceite esencial de orégano como agente antimicrobiano para el control de contaminación microbiana en fresa.

METODOLOGÍA

Elaboración de la película

La elaboración de la película se realizó como se describe en la literatura [4], con algunas modificaciones. Se solubilizó PVA al 7.8% en agua destilada a una temperatura de 40 °C (baño maría), posteriormente se aumentó la temperatura a 90 °C y se dejó en agitación continua por 1 hora.

Se hidrató la pectina y se incorporó en agua a una temperatura de 98 °C, para obtener una concentración final de 5% de pectina.

Ambas soluciones se mezclaron a temperatura ambiente con una proporción de 1:1 en donde se agregó PVA y pectina, a un pH de 3.9. Se agregó aceite esencial de orégano 2% (previamente mezclado con

tween-20 0.5% p/v). Esta mezcla se agitó con un Ultra-turrax (TISSUE-TEAROR^{TM}) por 15 min. Posteriormente se vació en moldes (13.4 cm x 13.4 cm).

Para la elaboración de la película sin el aceite esencial de orégano solo se pesó PVA y pectina se mezcló y una vez homogénea la mezcla, se vació en moldes de plástico (13.4 cm x 13.4 cm).

Los moldes con la mezcla se congelo por 24 horas a 18 °C y se dejó descongelar por dos horas y se volvió a congelar, esté proceso de congelación y descongelación se repitió dos ciclos más.

Actividad antimicrobiana *in vitro*

La prueba de la actividad antimicrobiana de la película *in vitro* se realizó por el método de difusión-disco [5,6] se cortó la película tratada (PT, con aceite esencial de orégano) en discos de 14 mm de diámetro y se colocó en placas de Petri con AMH (agar Mueller Hinton), previamente inoculadas con *E. coli* ($8.3x10^7$ UFC/mL) y *S. choleraesuis* ($1x10^8$ UFC/mL). Se incubaron a 37 °C por 24 h. Esta prueba se realizó por triplicado al igual que el control que es la película no tratada (PNT) sin aceite esencial de orégano. El diámetro de la zona de inhibición de crecimiento alrededor del PT y PNT, se medió con un vernier (calibrador de acero inoxidable, cod. 14394, marca: TRUPER) [7].

Actividad antimicrobiana en fresa

Se realizó una mezcla de las bacterias, en la cual se agregó *E. coli* y *S. choleraesuis* en agua estéril [1], con algunas modificaciones.

Se adquirieron 2 kg de fresas (mercado de abastos de Gdl, Jal., de ahí se tomó una muestra aleatoria de 40 fresas en las que aparentemente presentaron un mismo tamaño y que no tuvieran ningún daño físico ni en descomposición. De las 40 fresas solo se seleccionaron 24 que al pesarlas, mantuvieron un peso promedio de 12-14 g. Se lavaron con agua de grifo y se dejaron secar a temperatura ambiente por una hora, sobre una toalla absorbente en campana de flujo laminar. Después, las fresas se inocularon con la mezcla de las bacterias, sumergiéndolas por 15 min, se retiraron de la mezcla y se dejaron secar por 2 h en una charola de acero inoxidable. Transcurrida las 2 h, las 24 fresas se dividieron en 6 grupos de 4 fresas cada uno, tres grupos para PT y otros tres grupos para PNT.

Se determinó la población inicial de las baterías *E. coli* y *S. choleraesuis*, como se describe en la literatura [1,8] con algunas modificaciones, antes de colocar las fresas y envolverlas con la película, al azar se tomó una fresa por cada grupo y se realizó un lavado en bolsas estériles (Nasco WHIRL-PAK) (18.5 cm x 7.5 cm) agua estéril; por 15 min se agito con las manos suavemente. Después por cada una de las bolsas que contenían una fresa se tomó solución del lavado y se hicieron cuatro diluciones (1:10, 1:100, 1:1000 y 1:0000), se tomó una muestra de la última dilución y se inoculó en placas con a MH y se incubaron a 37 °C por 24 h. Esta prueba se realizó por duplicado.

Las fresas con la película se colocaron en un recipiente (11.2 cm x 10.0 cm x 4.8 cm de ancho) y se dejaron por seis días.

En el último día se determinó la población final de las baterías *E. coli* y *S. choleraesuis* en la fresa, como se describe en la literatura [1,8] con algunas modificaciones. Se realizó de la misma manera que el conteo de la población inicial, solo que únicamente para determinar la población final se hicieron cuatro diluciones para la solución de lavado, de las fresas que estuvieron con la PNT, ya que el lavado de las

fresas con la PT, solo se tomó una muestra del sobrenadante de lavado y se inoculó en placas con a MH y se incubaron a 37 °C por 24 h.

RESUTADOS Y DISCUSIÓN

Actividad antimicrobiana *in vitro*

La PT resultó más eficaz para *S. choleraesuis* ya que mostro mayor actividad antimicrobiana, al obtener un halo de inhibición de 38.3 ± 1.52 mm de diámetro mientras que en *E. coli* se obtuvo un halo de inhibición de 23±1.0 mm de diámetro. En la PNT (control) en ambas bacterias no presentaron halo de inhibición (figura 1).

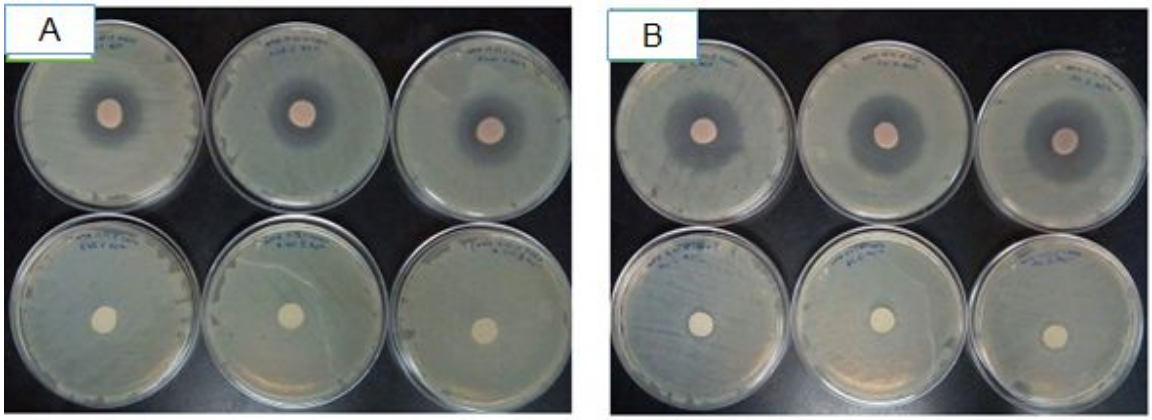


Figura 1. Halos de inhibición de la actividad antimicrobiana de la PT (placas superiores) y PNT (placas inferiores). A) *E. coli* B) *S. choleraesuis*.

Al comparar los resultados con la investigación que se reporta en la literatura [5], donde evaluaron la actividad antimicrobiana de las películas comestibles de proteína de soja incorporadas con aceite esencial de orégano 1.5% en *E. coli,* y las películas comestibles de puré de tomate y aceite esencial de orégano (1.5%) en *S. entérica.* El halo de inhibición de la película de la película de tomate con el aceite esencial de orégano fue de 15.2 mm de diámetro. La película que se elaboró en este trabajo presenta una mayor actividad antimicrobiana, cabe aclarar que se utilizó una concentración ligeramente mayor.

En otro estudio realizado [9] evaluaron la actividad antimicrobiana del aceite esencial de orégano en película de proteína de soja y glicerol sus resultados fueron favorables, ya que obtuvieron halos de inhibición de 42±0.0 mm de diámetro en *E. coli*, utilizando una película con 2% de aceite esencial de orégano. Los resultados con la película de proteína de soja, glicerol y aceite esencial de orégano (utilizando la misma concentración), presento mayor actividad antimicrobiana en comparación con los de la película que se realizó en este trabajo.

Actividad antimicrobiana en fresa

En la evaluación de la actividad antimicrobiana de la PT en fresas inoculadas con una mezcla de *E. coli* y *S. choleraesuis* ($6.3X10^6$ UFC y $7X10^6$ UFC respectivamente), se observó una disminución de

contaminación microbiana donde *E. coli* con la PT disminuyó 4.6 log UFC/mL y en *S. choleraesuis* disminuyó 4.9 log UFC/mL (figura 4).

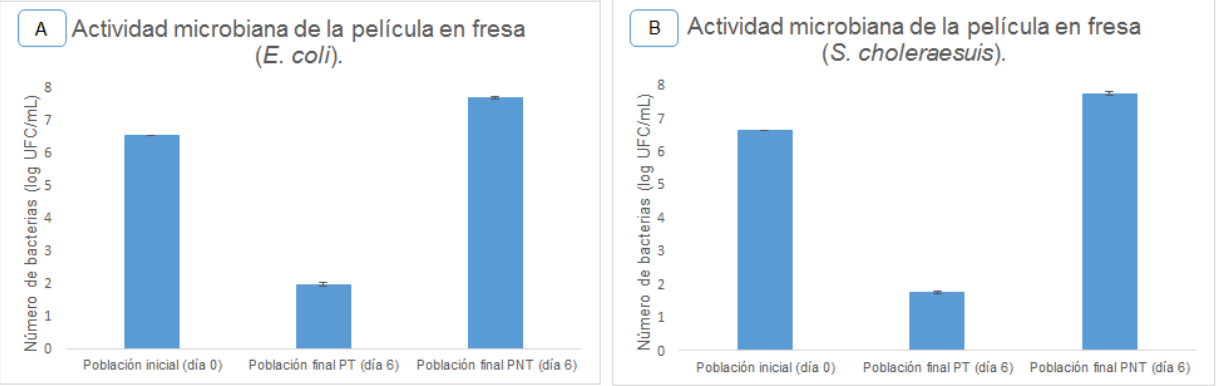


Figura 2. Actividad microbiana de las películas en fresa. Figura A) *E. coli*. Figura B) *S. choleraesuis*. (Las diferencias entre las muestras se determinaron utilizando el Software Statgraphics versión XVI.1, LSD, simple Anova con un valor de P≤0.05 con un nivel del 95% de confiabilidad).

Se reportan estudios de elaboración de películas que utilizan agentes antimicrobianos como son los aceites esenciales de anís, tomillo orégano, pimienta, ajo, clavo, canela, salvia, romero, vainilla, bergamota; para la inhibición de bacterias u hongos en frutas y verduras e incluso para panificación, queso y cárnicos [10, 11, 12, 13, 14]. Solo que de lo anterior hasta el momento no se ha elaborado una película con aceite esencial orégano donde evalúen la actividad antimicrobiana en fresa. En el estudio Moore [15] evaluaron la actividad antimicrobiana del aceite esencial de orégano directo en hojas de lechuga y espinacas, los resultados que obtuvieron fue una reducción de *S. enterica* de 4.8 log UFC/g a 4.9 log UFC/g, comparando nuestros resultados no hay diferencia, en cuanto a su control no hubo disminución de lo contrario aumento 1.3 log UFC/g de salmonella, al igual que nuestro control que fue la PNT aumento solo 1.1 log UFC/mL.

La actividad antimicrobiana del aceite esencial de orégano ha sido objeto de investigación que justifica su uso en la preparación, conservación de los alimentos, por su efecto antimicrobiano, esto se debe gracias a sus componentes como los polifenoles, los más importantes son carvacrol y timol [5, 7].

CONCLUSIÓN

La película que contiene aceite esencial de orégano se puede utilizar para disminuir el crecimiento microbiano de bacterias como *E. coli* y *Salmonella* en fresa. Cabe mencionar que aún se requiere de más investigación para la estandarización o estabilidad de la película con aceite esencial de orégano y su funcionalidad. En este estudio la actividad antimicrobiana de la película en la prueba *in vitro* (difusión-disco) como en fresa, mostro mayor sensibilidad en la bacteria de *Salmonella* que en *E. coli.*

REFERENCIAS

[1] Mahmoud, B. S.; Bhagat, A. R.; Linton, R. H. (2007), "Inactivation kinetics of inoculated *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* on strawberries by chlorine dioxide gas", Food Microbiology, 24, (7-8):736-744.

[2] Perdones, A., Sánchez, L., Chiralt, A., Vargas, M. (2012), "Effect of chitosan-lemon essential oil coatings on storage-keeping quality of strawberry", Postharvest Biology and Technology. Vol. 70:32-41.

[3] Hyldgaard, M., Mygind, T.; Meyer, R. L. (2012), "Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions whit food matrix components", Frontiers in MICROBIOLOGY, 3(4):doi: 10.3389/FMICB.2012.00012.

[4] Martínez, Y., Cavello, I., Hours, R., Cavalitto, S., Castro, G. (2013), "Immobilized keratinase and enrofloxacin loaded on pectin PVA cryogel patches for antimicrobial treatment", Bioresource Technology, 145:280-284.

[5] Du, W., Avena, R., Hua, S., McHugh, T. (2011), "Antimicrobial volatile essential oil in edible films for food safety". Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advance, 1124-1134.

[6] Pérez, P., Ferreira, N., Costa, L., Ramos, N., Liparini, O., Azevedo, W. (2012), "Assessment of the efficiency of essential oils in the preservation of postharvest papaya in an antimicrobial packaging system", Food Technology, 15 (4):307-316.

[7] Amadio, C., Medina, R., Dediol, C., Zimmermann, M. Z., Miralles, S. (2011), "Aceite esencial de orégano: un potencial aditivo alimentario". Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias UNCuyo, 43(1):237-245.

[8] Gurtler, J., Bailey, R., Jin, T., Fan, X. (2014), "Reduction of an *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* composite on fresh strawberries by varying antimicrobial washes and vacuum perfusion", Food Microbial, 189:113-118.

[9] Karagöz, Z., Polat, G. Kodal, B., Candogan, k. (2010), "Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties". Meat Science, 86 (2):283-288.

[10] Pérez, C., Regalado, C., Rodríguez, C., Barbosa, J. R., Villaseñor, F. (2006), "Incorporation of antimicrobial agents in food packaging films and coatings". Advances in Agricultural and Food Biotechnology. 193-216.

[11] Ramos, M., Jiménez, A., Peltzer, M., Garrigós, M. (2012), "Characterization and antimicrobial activity studies of polypropylene films with carvacrol and thymol for active packaging". Journal of food Engineering, 109:513-519.

[12] Sánchez, L., Cháfer, M., Chiralt, A., González, C. (2010), "Physical properties of edible chitosan films containg bergamot essential oil and their inhibitory action on *Penicillium italicum"*. Carbohydrate Polymers, 82(2): 277-283.

[13] Maher, E., Entsar, S. (2013), "Chitosan based edible films and coating: A review". Materials Science and Engineering, 33(4):1819-1841.

[14] Otoni, C. G., Pontes, S. F., Medeiros, E., Soares, N. (2014)," Edible film from Methylcellulose and Nanoemulsions of Clove Bud (Syzygium aromaticum) and Oregano (*Origanum vulgare*) Essential Oils as Shelf Life Extenders for Sliced Bread". Agricultural and Food Chemistry, 62(22):5214-5219.

[15] Moore, K., Gerber, C., Patel, J., Friedman, M., Jaroni, D., Ravishankar, S. (2013), "Antimicrobial activity of oregano oil against antibiotic-resistant *Salmonella enterica* on organic leafy greens at varying exposure times and storage temperatures". Food Microbiology, 34:123-129.

ENZYMATIC ACYLATION OF HESPERIDIN

(Acilación enzimática de hesperidina)

Jose Daniel Padilla de la Rosa [a]*, Jorge Alberto García Fajardo [a], Leticia Casas [b], Georgina Sandoval [b+]

[a] Tecnología Alimentaria Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ)
[b] Biotecnología Industrial, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ)

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: gsandoval@ciatej.mx

Área del Conocimiento: Biotecnología Alimentaria.

ABSTRACT
Hesperidin, a naturally occurring flavonoid presents in citrus fruits, has been reported to exert a wide range of pharmacological effects that include antioxidant, anti-inflammatory, antihypercholesterolemic, and anticarcinogenic actions. Due to these numerous properties and applications, flavonoids have gained growing interest. However, most of them have a low solubility and poor stability in both polar and nonpolar media, which strongly restricts their incorporation in many formulations. To improve their solubility, bioavailability can be carried out by enzymatic modifications. There are few studies reported in literature for obtaining hesperidin derivatives, which are characterized by low conversions and longer times on the order of 5 days with low concentrations of low solubility associated substrate. The aim of this study was synthesized enzymatically acylated derivatives of hesperidin because to date it remains a challenge to find practical processes of purification and production of bioavailable derivatives of hesperidin. From that hypothesis, enzymatic acylation using immobilized lipase B from *Candida antarctica* (Novozyme 435) was studied varying acyl:hesperidin ratio. The results showed that both the number of products and the conversion are function of acyl:hesperidin ratio. Indeed, with acyl:hesperidin ratio of 1, two acylated derivatives and a conversion of 57% were obtained ; while for acyl:hesperidin ratio of 25 three acyl derivatives and a conversion of 73% were obtained.

Keywords: Hesperidin; Acylation; Lipase; *Candida antarctica.*

CHARACTERIZATION OF THE RESIDUAL BIOMASS OF THE GREEN MICROALGAE: *Dunaliella tertiolecta*, *Tetraselmis suecica* AND *Nannochloropsis* sp.

(Caracterización de la biomasa residual de las microalgas verdes: *Dunaliella tertiolecta*, *Tetraselmis suecica* y *Nannochloropsis* sp.)

Claudia D. Norzagaray-Valenzuela[a,b*], Marco A. Valdez-Flores[b], Roberto Gutiérrez-Dorado[a,b], Cuauhtémoc Reyes-Moreno[a,b], Angel Valdez-Ortiz [a,b+], Lourdes J. Germán-Báez[b]

[a] Posgrado en Ciencia y Tecnología de Alimentos, FCQB. Universidad Autónoma de Sinaloa. Blvd. de las Américas y Josefa Ortiz de Domínguez, Ciudad Universitaria, CP. 80030. Culiacán, Sinaloa.
[b] Programa Regional de Posgrado en Biotecnología, FCQB-UAS, Blvd. de las Américas y Josefa Ortiz de Domínguez, Ciudad Universitaria, CP. 80030. Culiacán, Sinaloa.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: angelvaldezortiz@yahoo.com.mx

Área del conocimiento: Biotecnología Alimentaria

ABSTRACT
At present, microalgae biomass is considered a potential feedstock for biodiesel production due to its high lipid content. However, in order to turn microalgae biodiesel production into a more profitable process, extra processing routes considering the by-product are needed. In this regard, microalgae, besides lipids synthetize high-value compounds such as proteins, carbohydrates, and pigments that could be later translate into high-value products. In the presented study we analysed the chemical composition and functional properties of the residual biomass (RB) generated after lipids extraction of three microalgae species: *Dunaliella tertiolecta* (DUT), *Tetraselmis suecica* (TES), and *Nannochloropsis* sp. (NNX)**.** Chemical composition was carried out according to the AOAC official methods and results were expressed on dry weight. The analysed functional properties included water absorption capacity (WAC), protein solubility (PS), emulsion capacity (EC), emulsion stability (ES), foaming capacity (FC), and foam stability (FS), were done at different pH values (2, 7, and 10). Results of chemical composition showed protein content of 32.5, 29.2 and 33.1% for DUT, NNX and TES, respectively. TES and NNX exhibited good carbohydrates content presenting values of 29.9 and 37.1%, respectively. The three species showed around 1% of remaining lipid and the ash content values ranged from 28.7 to 36.8%. Regarding to functional properties, all RB exhibited high WAC values (4.19 to 5.56 g gel g^{-1} sample). The PS values ranged from 10 to 22%. The EC values fluctuated depending on the microalgae specie, RB of DUT presented the highest EC values in all pH evaluated. Interestingly, all RB exhibited 100% of ES indistinctly on the pH values. Conversely, all RB showed poor values of FC (1 to 40%) although exhibited high FS (95 to 99%). In general, all RB presented good chemical composition and functional properties that can be used in the manufacture of functional food.

Keywords: microalgae, residual biomass, proteins, functional food.

RESUMEN

Actualmente, la biomasa de microalgas es considerada como materia prima potencial para a producción de biodiesel, debido a su alto contenido de lípidos. Sin embargo, con la idea de convertir la producción de biodiesel en un proceso económicamente rentable, es necesario buscar rutas de procesamiento adicionales para el aprovechamiento del subproducto. En este sentido, las microalgas además de lípidos, sintetizan grandes cantidades de compuestos de alto valor como proteínas, carbohidratos y pigmentos, que podrían ser posteriormente convertidos en diversos productos. Por lo anterior, en el presente estudio se analizó la composición química y propiedades funcionales de la biomasa residual (BR) generada del proceso de extracción de lípidos de tres especies de microalgas: *Dunaliella tertiolecta* (DUT), *Tetraselmis suecica* (TES) y *Nannochloropsis* sp. (NNX)**.** La composición química se llevó a cabo siguendo los métodos oficiales de la AOAC, y los resultados fueron expresados en porcentaje de peso seco. Las propiedades funcionales analizadas: Índice de absorción de agua (IAA), Índice de solubilidad de proteína (ISP), Índice de actividad y estabilidad de emulsión (IAE, EAE), índice de formación de espuma (IFE) y estabilidad de formación espuma (EFE), fueron evaluadas por triplicado a distintos valores de pH (2,7 y 10). Los resultados de la composición química mostraron contenidos de proteína de 32.5, 29.2 y 33.1 % para DUT, NNX y TES, respectivamente. La BR de TES y NNX exhibieron altos contenidos de carbohidratos con 29.9 y 37.1 %, respectivamente. Las tres BRs analizadas presentaron alrededor del 1 % de lípidos remanentes de la extracción y, los valores de contenido de cenizas oscilaron entre 28.7 a 36.8 %. Con respecto a las propiedades funcionales, las tres RBs analizadas mostraron alto IAA (4.19 a 5.56 g gel g^{-1} muestra). Los valores de ISP estuvieron en un rango del 10 al 22 %. Los valores de IAE variaron dependiendo la especie de microalga, la BR de DUT presentó los valores más altos en todos los pH analizados. Interesantemente, todas las BRs presentaron una EAE del 100 %. Por el contrario, todas las BRs mostraron bajos valores de IFE (del 1 al 40 %), sin embargo presentaron alta EFE con valores entre 95 al 99%. De manera general, las BRs analizadas presentaron buena composición química y, propiedades funcionales interesantes que podrían ser aprovechadas en la elaboración de alimentos funcionales.

Palabras clave: microalgas, biomasa residual, proteínas, alimentos funcionales

INTRODUCCIÓN

Las microalgas han recibido gran atención debido a su potencial empleo como materia prima en la producción de biocombustibles. Esto, gracias a que ciertas especies llegan a sintetizar grandes cantidades de lípidos que pueden ser convertidos principalmente en biodiesel [1]. Sin embargo, la producción de biodiesel a partir de microalgas aún no es considerado un proceso económicamente rentable. Recientemente se ha adoptado un nuevo concepto conocido como biorefinería, proceso que involucra el aprovechamiento integral de la biomasa con la finalidad de reducir costos [2]. Esta alternativa resulta ser promisoria, ya que las microalgas además de producir grandes cantidades de lípidos, sintetizan compuestos de alto valor como proteínas, carbohidratos y compuestos bioactivos incluyendo antioxidantes, pigmentos como β-caroteno, ficocianina y clorofila, entre otros. Estos últimos han despertado gran interés de diversos investigadores y de sectores industriales, ya que los compuestos bioactivos pueden ser utilizados en la elaboración de alimentos funcionales y compuestos nutracéuticos que atiendan la prevención y el tratamiento de enfermedades crónico-degenerativas [3, 4, 5]. En el presente trabajo se llevó a cabo la caracterización de tres especies de microalgas (*Dunaliella*

tertiolecta (DUT), *Tetraselmis suecica* (TES), y *Nannochloropsis* sp. (NNX)), reportando sus propiedades nutricionales y funcionales de la biomasa residual (BR) obtenida después del proceso de extracción de aceite.

METODOLOGIA

Las tres especies de microalgas (DUT, NNX y TES) fueron cultivas en el medio nutritivo F/2 bajo condiciones de luz y temperatura controladas (6000-6500 luxes, 24°C) [6]. Las BRs se obtuvieron a través del proceso de extracción de aceite, siguiendo las metodologías descritas por Bligh y Dyer [7] y Soto-León [8]. El análisis químico proximal de las BRs se realizó de acuerdo a los métodos oficiales propuestos por la AOAC [9]. Todas las evaluaciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron en (%) en base seca. Las propiedades funcionales incluyendo índice de solubilidad de proteína (ISP) [10], índice de absorción de agua (IAA) [11], índice de formación de espuma (IFE) y estabilidad de espuma (EFE), índice de actividad y estabilidad de emulsión (IAE, EAE) [12] fueron evaluadas por triplicado a distintos valores de pH (2, 7 y 10).

RESULTADOS

Análisis químico proximal. Los resultados del análisis químico proximal de las BRs de microalgas se aprecian en la Tabla 1. Las BRs DUT, TES y NNX mostraron valores de proteína de 32.5, 29.2 y 33.1%, respectivamente. Estos resultados se encuentran dentro de lo reportado por Kim [13], (35%) y Francavilla [14], (31.4%) para BR de DUT. El contenido de lípidos residual osciló alrededor del 1%; valor que permitió validar el proceso de extracción de aceite utilizado, el cual combinó el uso de solventes, seguido de un proceso de sonicación. El contenido de carbohidratos se encontró entre 29.0 y 37.1%, presentando la BR de NNX el valor más alto. El contenido de cenizas fue de 36.6, 34.5 y 37.1 % para la BR de DUT, TES y NNX, respectivamente. Estos altos valores de cenizas coinciden con lo reportado por Batista [15] en microalgas verdes (24% a 31%), quienes atribuyen la alta concentración de cenizas en microalgas a la gran concentración de elementos esenciales que llegan a almacenar, tales como sodio, potasio, calcio y hierro.

Tabla 1. Análisis químico proximal de la biomasa residual de microalgas

BR	Proteína	Lípidos	Carbohidratos	Cenizas
DUT	32.5 ± 0.45^{a}	0.8 ± 0.09^{b}	29.9 ± 1.06^{b}	36.8 ± 1.43^{a}
TES	29.2 ± 0.91^{b}	0.8 ± 0.05^{b}	35.5 ± 3.58^{a}	34.6 ± 3.42^{a}
NNX	33.1 ± 0.37^{a}	1.02 ± 0.05^{a}	37.1 ± 0.84^{a}	28.7 ± 1.25^{b}

Resultados expresan el promedio de tres réplicas ± la desviación estándar (% base seca). Letras diferentes indican diferencias significativas en la misma columna (Fisher, α=0.05).

Propiedades funcionales. Todas las BRs evaluadas mostraron buena capacidad de IAA, los resultados variaron entre 4.19 y 5.53 g gel /g muestra. La variación de pH no tuvo efecto significativo sobre los valores de esta propiedad. La BR de NNX presentó el mayor IAA en los tres valores de pH evaluados (Figura 1A). La buena capacidad de IAA encontrada podría atribuirse al alto nivel de polisacáridos

capsulares que protegen las células de la deshidratación y que le permiten a las microalgas crecer en ambientes marinos [16]. El elevado IAA mostrado por las BRs, sugiere su empleo como ingrediente alimentario en la elaboración de productos como pastas, quesos, bebidas y productos horneados, debido a su gran capacidad de rehidratación [16, 17].

Con respecto a los resultados de ISP, sus valores se encontraron en una rango entre 10 y 22%. El mayor ISP se observó a pH 2 para las tres BR analizadas. La BR de TES presentó el mayor ISP con 21.64 %, mientras que por otro lado, la BR de NNX mostró una solubilidad más baja en todos los valores de pH (Figura 1B). Las diferencias en la solubilidad de proteína han sido asociadas por diversos autores a la fuerte pared celular que presentan algunas especies de microalgas como *Nannochloropsis sp.*, que impiden una buena solubilidad de proteína en esas condiciones [16, 18].

Los resultados de IAE de las BRs se muestran en la Figura 1C. La BR de DUT presentó la mayor capacidad de emulsión en los tres valores de pH evaluados, alcanzando valores de 100% a pH 2 y 7. Diversos autores atribuyen los altos valores de IAE encontrados a pH 2 a una mayor solubilidad de proteína [19]. Por lo contrario, las BRs de TES y NNX, mostraron una mínima actividad de emulsión. Por otro lado, con respecto a la EAE, las BRs analizadas mostraron valores del 100% a todos los pHs analizados, , no observándose diferencias significativas (Figura 1D).

Los resultados del IFE se muestran en la Figura 1E. La BR de DUT presentó el mayor valor de IFE (40%) a pH 2. Como se puede observar, la variación de pH tuvo efecto significativo sobre el IFE, presentando los más alto porcentajes de IFE a pH 2. La variación de IFE ha sido fuertemente relacionada con la solubilidad de proteína (a menor IFE menor solubilidad de proteína) [20]. Con respecto a la estabilidad de formación de espuma (EFE), ésta se mantuvo con valores entre 95.83 a 99%. Asimismo, se observó un decremento en la EFE a pHs ácidos (Figura 1F).

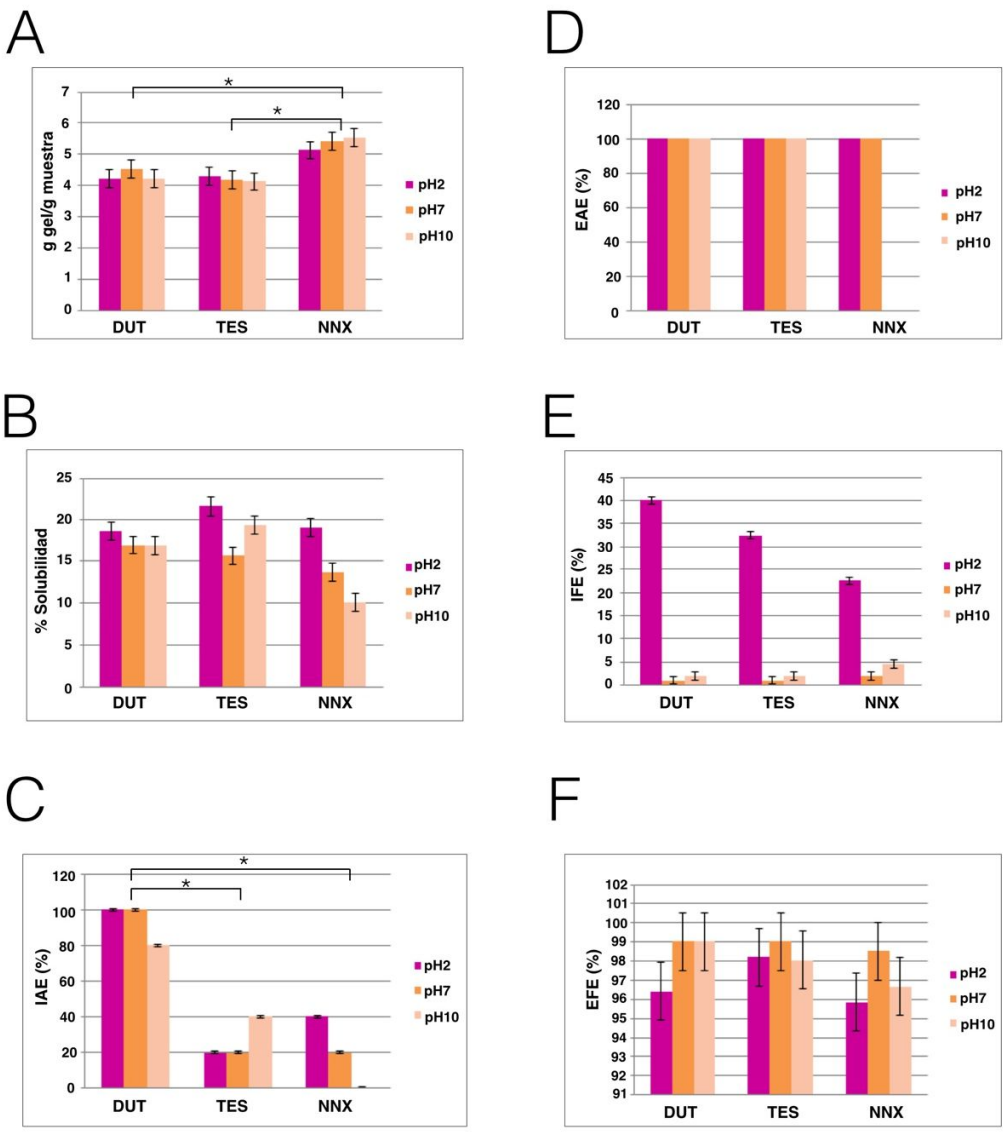


Figura 1. Propiedades funcionales de las biomasas residuales de microalgas. (A). Índice de absorción de agua (B). Índice de solubilidad de proteína (C). IAE, índice de actividad de emulsión (D). EAE, Estabilidad de actividad de emulsión (E). IFE, índice de formación de espuma (F). EFE, Estabilidad de formación de espuma. Valores representan el promedio de tres réplicas. Estadístico de Fisher (α=0.05).

CONCLUSIONES

Las BRs de microalgas analizadas mostraron una composición proximal rica en proteínas y carbohidratos. Estas propiedades abren la posibilidad para su aprovechamiento, ya que actualmente la BR es tratada como producto de deshecho del proceso de elaboración de biodiesel. El estudio de las propiedades funcionales de las BRs, resulta interesante ya que son un buen indicador para diseñar las aplicaciones o usos potenciales de éstas. Por ejemplo, en el presente estudio se logró observar que las BRs poseen una gran capacidad de rehidratación (ésta medida a través del IAA), por lo que podrían emplearse como ingrediente de pastas y productos para hornear. Por otro lado, las BRs mostraron una solubilidad de proteína importante, que sugiere su utilización también en la formulación de bebidas nutracéuticas. Con base a las propiedades nutricionales y funcionales estudiadas, se propone el uso de las BRs de microalgas como alimento o ingrediente alimentario.

REFERENCIAS

[1] Wijffels, R., Barbosa, M., Eppink, M. (2010), "Microalgae for the production of bulk chemicals and biofuels", Biofuels, Bioproducts and Biorefining, 4:287-295.

[2] Taylor, G. (2008), "Biofuels and the biorefinery concept", Energy Policy, 36:4406-4409.

[3] Chisti, Y. (2006), "Microalgae as sustainable cell factories", Environment Energing Managment, 5:261-274.

[4] Spolaore, P., Joannis, C. (2006), "Commercial applications of microalgae", Journal of Bioscience and Bioengineering, 101(2):87-96.

[5] Chisti, Y. (2007), "Biodiesel from microalgae", Biotechnology Advances, 25:294-306.

[6] Guillard, R., Ryther, J. (1962), "Studies of marine planktonic diatoms, I. *Cyclotella nana Hustedt* and *Detonula conferyacea Cleve*", Canadian Journal of Microbiology, 8:229-239.

[7] Bligh, E., Dyer, W. (1959), "A rapid method of total lipid extraction and purification", Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, 37(8):911-917.

[8] Soto-León, S., Zazueta-Patrón, I., Piña-Valdez, P., Nieves-Soto, M., Reyes-Moreno, C., Contreras-Andrade, I. (2014), "Extracción de lípidos de *Tetraselmis suecica*: proceso asistido po ultrasonido y solventes", Revista Mexicana de Ingeniería Química, 13(3):723-737.

[9] AOAC (1990), "Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists. (16th ed.) Washington, D.C.: Association of Official Analytical Chemists.

[10] Betancur-Ancona, D., Martínez-Rosado, R., Corona-Cruz, A., Castellanos-Ruelas, A., Jaramillo-Flores, M., Chel-Guerrero, L. (2009), "Functional properties of hydrolysates from *Phaseolus lunatus* seeds", Journal of Food Science and Technology, 44:128-137.

[11] Kanu, P., Kanu, J., Sandy, E., Kandeh, J., Mornya, P., Huiming, Z. (2009), "Optimization of enzymatic hydrolysis of defatted sesame flour by different proteases and their effect on the functional properties of the resulting protein hydrolysate", American Journal of Food Technology, 4:226-240.

[12] Chau, C., Cheung, P. (1997), "Functional properties of flours prepared from three chinese indigenous legume seeds", Food Chemistry, 61:429-433.

[13] Kim, S., Ly, H., Kim, J., Lee, E., Woo, H. (2015), "Pyrolysis of microalgae residual biomass derived from *Dunaliella tertiolecta* after lipid extraction and carbohydrate saccharification", Chemical Engineering Journal, 263:194-199.

[14] Francavilla, M., Kamaterou, P., Intini, S., Monteleone, M., Zabaniotou, A. (2015), " Cascading microalgae biorefinery: fast pyrolysis of *Dunaliella tertiolecta* lipid extracted-residue", Algal Research, 11:184-193.

[15] Batista, A., Gouveia, L., Bandarra, N., Franco, J., Raymundo, A. (2013), "Comparison of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for food products", Algal Research, 2:164-173.

[16] Guil-Guerrero, J., Navarro-Juárez, R., López-Martínez, J., Campra-Madrid, P., Rebolloso-Fuentes, M. (2004), "Functional properties of the biomass of three microalgal species", Journal of Food Engineering, 65(4):511-517.

[17] Oshodi, A., Ipinmoroti, K., Adeyeye, E. (1997), "Functional properties of some varieties of African yam bean (AYB) (*Sphenostylis stenocarpa*) flour", Journal of Food Science and Nutrition, 48:243-250.

[18] Volkman, J., Brown, M., Dunston, G., Jeffre, S. (1993), "The biochemical composition of marine microalgae from the class Eustigmatophyceae", Journal of Phycology, 29:68-78.

[19] Volkert, M., Klein, B. (1979), "Protein digestibility and emulsion characteristics of soy products", Journal of Food Science, 44:93-96.

[20] Pearson, A. (1983). Soy proteins. Developments in food proteins-2, In B. J. F. Hudson (Ed.), Essex, England: Applied science Publishers, 67-108.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

IN VITRO ANTIBACTERIAL EFFECT FROM ETHANOLIC EXTRACT OF PROPOLIS ON *Staphylococcus aureus* ASSOCIATE TO BOVINE MASTITIS

(Efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de propóleo sobre *Staphylococcus aureus* asociado a mastitis bovina)

Gloria Cristina Rodríguez Cárdenas[a*], Joel Edmundo López Meza[b], Pedro Damián Loeza Lara[c+]

[a] Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Michoacán (CIIDIR-IPN-MICH), Jiquilpan, Michoacán, México.
[b] Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología-Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México.
[c] Licenciatura en Genómica Alimentaria, Universidad de La Ciénega del Estado de Michoacán de Ocampo, Sahuayo, Michoacán, México.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: pdloeza@ucienegam.edu.mx

Área del Conocimiento: Q. de productos naturales.

ABSTRACT
Bovine mastitis is a disease that affect the mammary gland of cows, altering the quality of the milk. The most common cause is by *Staphylococcus aureus*. The ineffectiveness of antibiotics has led to the search for natural alternatives, as propolis, substance containing secondary metabolites with biological activities, making it arises that the ethanol propolis extracts have antibacterial effect *in vitro* on *S. aureus*. The objective of this research was to determine the antibacterial effect *in vitro* of ethanolic extract of propolis on *S. aureus* associated with bovine mastitis. We used one strain of *S. aureus*, the certified strain ATCC 27543 and the isolated SA28. Propolis extract was obtained by macerated in ethanol at 96% and concentrations of 5, 10, 15 and 20 mg/mL were prepared. Nutrient agar Petri plates were inoculated with 100 µL of a bacterial suspension set to 1 x 10^8 cfu/mL. 5 mm diameter filter paper discs were impregnated with concentrations and placed on the plates, which were incubated 37° C for 24 h and the halos of inhibition were measured. We used ethanol 96% as negative control and dicloxacillin ® as a positive control. Inhibition was observed at all concentrations tested, for ATCC halos were 25.5, 22, 19, and 7.7 mm for the concentrations of 20, 15, 10 and 5 mg/mL, respectively, showing significant differences (p≤0. 05) with the negative control (0 mm of inhibition). In SA28 isolated, halos were 25.3 and 21.5, 20.5 14.7 mm concentrations 20, 15, 10 and 5 mg/mL, respectively, showing significant differences (p≤0. 05) with the negative control (0 mm of inhibition). These results show the antibacterial potential *in vitro* of ethanolic extract of propolis against *S. aureus* associated with bovine mastitis.

Keywords: Bovine Mastitis, *Staphylococcus aureus*, natural alternatives, propolis.

RESUMEN

La mastitis bovina es una enfermedad que afecta la glándula mamaria de las vacas, alterando la calidad de la leche. La causa más común es por *Staphylococcus aureus*. La inefectividad de los antibióticos ha llevado a la búsqueda de alternativas naturales, como el propóleo, sustancia que contiene metabolitos secundarios con actividades biológicas diversas, por lo que se plantea que los extractos etanólicos de propóleo tienen efecto antibacteriano *in vitro* sobre *S. aureus.* El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de propóleo sobre *S. aureus* asociado a mastitis bovina. Se utilizó una cepa de *S. aureus,* la cepa certificada ATCC 27543 y el aislado SA28. El extracto de propóleo se obtuvo mediante macerado en etanol al 96% y se prepararon concentraciones de 5, 10, 15 y 20 mg/mL. Placas Petri con agar nutritivo fueron inoculadas con 100 µL de una suspensión bacteriana ajustada a $1x10^8$ UFC/mL. Discos de papel filtro de 5 mm de diámetro fueron impregnados con las concentraciones y colocados en las placas, las cuales se incubaron 37°C, durante 24 h y se midieron los halos de inhibición. Se utilizó etanol al 96% como testigo negativo y Dicloxacilina® como testigo positivo. En todas las concentraciones se observó inhibición, para ATCC los halos fueron de 25.5, 22, 19 y 7.7 mm para las concentraciones de 20, 15, 10 y 5 mg/mL, respectivamente, mostrando diferencias significativas ($p \leq 0.05$) con el testigo negativo (0 mm de inhibición). En el aislado SA28, los halos fueron de 25.3, 21.5, 20.5 y 14.7 mm para las concentraciones 20, 15, 10 y 5 mg/mL, respectivamente, mostrando diferencias significativas ($p \leq 0.05$) con el testigo negativo (0 mm de inhibición). Estos resultados muestran el potencial antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de propóleo en contra de *S. aureus* asociada a mastitis bovina.

Palabras Clave: Mastitis bovina, *Staphylococcus aureus,* alternativas naturales, propóleo.

INTRODUCCIÓN

La mastitis bovina es una enfermedad que afecta la glándula mamaria y los tejidos secretores de la vaca, por lo que altera la composición y la calidad de la leche, causa problemas de salud y fertilidad en los bovinos ocasionando pérdidas económicas a nivel mundial. Es la enfermedad más importante, económicamente, en la industria lechera, ya que representa el 70% de los gastos totales para los ganaderos, resultando pérdidas de billones de dólares cada año, debido a los gastos excesivos en medicamentos y una disminución en los ingresos por decremento de la producción [1]. Las pérdidas económicas son ocasionadas por múltiples factores, los principales son los tratamientos con antibióticos que muchas veces resultan inefectivos, la disminución en el rendimiento de la leche, el desecho temprano de vacas, problemas de fertilidad, costos de prevención, tratamiento y control de la enfermedad. La causa más común de la enfermedad es por bacterias patógenas, principalmente la bacteria Gram positiva *Sthapylococcus aureus*, agente contagioso más importante a nivel mundial. La prevalencia de la infección en bovinos por este patógeno es del 30 al 40% [2]. La inefectividad de los tratamientos mediante antibióticos y el desarrollo de resistencia bacteriana han llevado a la búsqueda de nuevas alternativas, destacando los productos antimicrobianos de origen natural como aceites, resinas, péptidos antimicrobianos y metabolitos secundarios. El propóleo es un producto natural que se obtiene de las colmenas, es elaborado por las abejas (*Apis mellifera)*, a partir de brotes y exudados de diferentes plantas. Es una mezcla de resinas, ceras, aceites esenciales, polen y microelementos que usan estos insectos para construir y reparar las colmenas y como sustancia protectora gracias a su acción antimicrobiana y antifúngica. Contiene una gran variedad de metabolitos secundarios que presentan actividad biológica, se han identificado polifenoles (flavonoides, ácidos fenólicos y sus ésteres, aldehídos, alcoholes y cetonas fenólicas), terpenoides, aminoácidos, y compuestos inorgánicos. Por lo

tanto, podría representar una alternativa prometedora para prevenir el crecimiento de microorganismos bacterianos [3]. Por lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue determinar el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de propóleo sobre *S. aureus* asociado a mastitis bovina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas y aislamientos de *S. aureus*

Para los experimentos se utilizó la cepa certificada ATCC 27543 de *S. aureus,* aislada de un caso clínico de mastitis, y el aislamiento SA28 de *S. aureus,* obtenido de una vaca con mastitis clínica del municipio de Tarímbaro, Michoacán. Dichas bacterias fueron proporcionadas por el Dr. Joel E. López Meza, las cuales corresponden a la colección bacteriana del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (CMEB-FMVZ-UMSNH), y fueron cultivadas en agar nutritivo a 37 °C.

Preparación de los extractos de propóleo

Para la obtención de los extractos etanólicos de propóleo se utilizó la metodología de Park y Ikegaki [4], con algunas modificaciones, la cual consistió en realizar un macerado de propóleo, agregar etanol absoluto y mantenerlo por 48 horas en agitación, a temperatura ambiente y en ausencia de luz. Posteriormente, el extracto se filtró con papel filtro estéril y mediante baño de vapor a 45°C se evaporó el alcohol.

Actividad antimicrobiana del propóleo

Después de realizar la cuantificación del extracto, se prepararon diversas concentraciones a ensayar (5, 10, 15 y 20 mg/mL), mismas que fueron redisueltas en etanol al 96%. Para realizar los bioensayos, se siguió el método de Bauer, Kirby, Sherris, y Turck [5]. Se inocularon, por extensión en la superficie de una placa Petri con Agar nutritivo, 100 µL de suspensión bacteriana, que contenía $1x10^8$ UFC/ml. Se emplearon discos estériles de 6 mm, impregnados con las concentraciones de extractos. Las placas se incubaron por 24 h a 37°C. Se utilizó un testigo negativo (con etanol al 96%, sin extracto) y un testigo positivo (antibiótico Dicloxacilina®) siguiendo el mismo procedimiento.

RESULTADOS

En todos los tratamientos ensayados se observaron halos de inhibición significativos ($p \leq 0.05$) en ambas bacterias, en comparación con el testigo negativo. Para el caso de ATCC, los halos de inhibición fueron de 25.5, 22, 19 y 7.7 mm para los tratamientos de 20, 15, 10 y 5 mg/mL, respectivamente, mostrando diferencias significativas con el testigo negativo (0 mm de inhibición) y entre ellos ($p \leq 0.05$). Cabe destacar que dos de los tratamientos ensayados (20, 15 mg/mL), superaron al antibiótico Dicloxacilina (testigo positivo, 19 mm de inhibición), mientras que el tratamiento de 10 mg/mL, fue igual al antibiótico (Figura 1 B y D, Cuadro 1). En el aislado SA28, los halos fueron de 25.3, 21.5, 20.5 y 14.7 mm para los tratamientos de 20, 15, 10 y 5 mg/mL, respectivamente, mostrando diferencias significativas con el testigo negativo (0 mm de inhibición) y entre ellos ($p \leq 0.05$), excepto en los tratamientos de 15 y 10 mg/mL. De igual manera, se destaca que los tratamientos de 20 y 15 mg/mL superaron a la Dicloxacilina, mientras que el de 10 mg/mL fue estadísticamente igual ($p \leq 0.05$) (Cuadro 2, Figura 1 A y C). Los resultados anteriores muestran el potencial antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de

propóleo en contra de *S. aureus*, principal bacteria asociada a la mastitis bovina en los hatos lecheros del país.

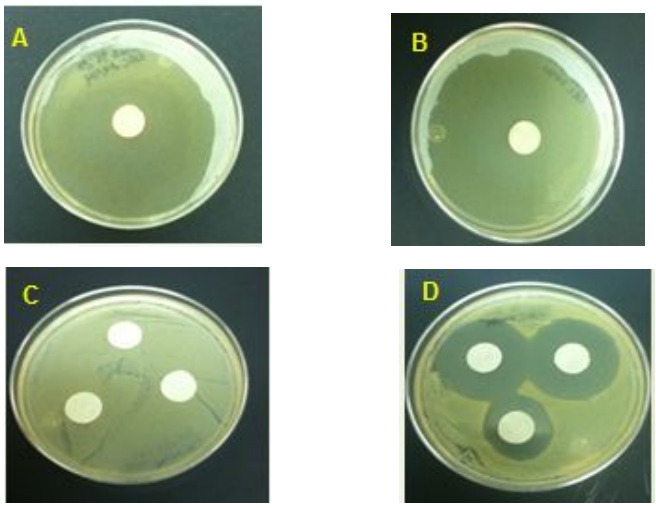


Figura 1. Halos de inhibición de *S. aureus*. A) + propóleo 20 mg/ml; B) *S. aureus* ATCC 27543 + propóleo 20 mg/ml; C) *S. aureus* SA28 + etanol absoluto; D) *S. aureus* ATCC 27543 + Dicloxacilina.

Cuadro 1. Inhibición del crecimiento de *S. aureus* ATCC 27543 por el extracto etanólico de propóleo.

S. aureus ATCC 27543		
	Concentración mg/ml	Diámetro de halo de inhibición (mm)
Extracto etanólico de propóleo	5	7.7 b
	10	19 a
	15	22 a
	20	25.5a
Dicloxacilina	5	19 a
Etanol absoluto	--	0 c

Cuadro 2. Inhibición del crecimiento de *S. aureus* SA28 por el extracto etanólico de propóleo.

S. aureus **SA28**		
Extracto etanólico de propóleo	Concentración mg/ml	Diámetro de halo de inhibición (mm)
	5	14.7 c
	10	20.5 ab
	15	21.5 ab
	20	25.3 a
Dicloxacilina	5	18.58 bc
Etanol absoluto	--	0 d

DISCUSIÓN

De acuerdo con estos resultados, se observó que las concentraciones de propóleo inhibieron el crecimiento de los aislamientos de *S. aureus* en comparación con los testigos. Los resultados de la actividad antibacteriana concuerdan con aquellos encontrados por Manríquez y Palomino [6,7] y quienes observaron una marcada acción de los propóleos contra bacterias Gram positivas, indicando que posiblemente están presentes compuestos de naturaleza fenólica, o con grupos funcionales oxidables (hidroxilos, instauraciones entre otras), los cuales pueden exhibir actividad biológica. De acuerdo a Ortega [7] la actividad antibacteriana de los propóleos es debida a la presencia de compuestos fenólicos, especialmente flavonoides, ácidos fenólicos y sus ésteres. Es necesario, sin embargo, probar el efecto del propóleo, en un número mayor de cepas bacterianas.

CONCLUSIONES

Los resultados anteriores permiten concluir parcialmente que los extractos etanólicos de propóleo tienen efecto antibacteriano *in vitro* en contra una cepa y un aislado de *S. aureus* asociados a mastitis bovina.

REFERENCIAS

[4] Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C.T., Turck, M. (1966). "Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method", American Journal of Clinical Pathology, 45: 493-496.

[1] Bedolla, C. C., Ponce de León, M. P. (2008). "Pérdidas económicas ocasionadas por la mastitis bovina en la industria lechera", Revista electrónica de Veterinaria, 9: 1-26.

[6] Manrique, A. (2006). "Actividad antimicrobiana de propóleos provenientes de dos zonas climáticas del estado Miranda, Venezuela", Efecto de la variación estacional. Zootecnia Tropical, 24(1): 43-53.

[2] Martínez, V. C. P., Hernández, M. C., Pérez, R. M. (2007). "Impacto económico de la mastitis subclínica en hatos bovinos de doble propósito de la Zona Centro del Estado de Yucatán", Tropical and Subtropical Agroecosystems, *7*: 127-131.

[8] Ortega, N.S., Benitez, C., Cabezas, F. (2011). "Antibacterial activity and cualitative composition propolis from two climatic regions Cauca department", Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, *9*(1): 8-16.

[5] Park, Y.K., Ikegaki, M. (1988). "Preparation of water and ethanolic extracts of propolis and evaluation of the preparations", Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 62: 2230-2232.

[7] Palomino, G.L.R., Martínez, G.J.P., García P.C.M., Gil G.J.H., Durango R.D. L. (2010). "Caracterización fisicoquímica y actividad antimicrobiana del propóleos en el Municipio de la Unión (Antioquia, Colombia)", Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín, 63(1): 5373-5383.

[3] Viloria, J. D., Gil J., Durango, D., García, C. (2012)."Caracterización fisicoquímica del propóleo de la región del Bajo Cauca", Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, 10: 77-86.

EFFECT OF SIMULATED GASTROINTESTINAL DIGESTION OF PROTEIN FRACTIONS OF CHIA (*Salvia hispanica* L.) SEEDS, ON THE ANTIOXIDANT ACTIVITY

(Efecto de la simulación de la digestión gastrointestinal de fracciones proteicas de chia (*Salvia hispanica* L.), en la actividad antioxidante)

Edgar Espinosa Hernández [a]*, Flor de Fátima Rosas Cárdenas [a], Silvia Luna Suárez [a+]

[a] Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada del Instituto Politécnico Nacional

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: silvials2004@yahoo.com.mx

Área del Conocimiento: Biotecnología Alimentaria

ABSTRACT
The chia seed has been a Mexican heritage meal consumed since Aztecs times. It contain 19-23% of protein, and has been reported that its consumption bring beneficial health effects, including antioxidant activity. The oxidation of biomolecules is mediated by process of free radicals which leads to many negative impacts on food and biological systems. Proteins and peptides have been proposed as an alternative to prevent some diseases. The objective of this work was to analyze the antioxidant activity (AA) (DPPH) of five protein fractions from chia seeds, and to know the effect of the simulated gastrointestinal digestion (SGID) on this important activity. Every protein fraction (albumin, globulin, glutelin, isolated and concentrated protein) was first hydrolyzed with pepsin at pH 2 at 37°C for 60 minutes and then with pancreatin at pH 6 at 37°C for 30 minutes. Five different concentrations were assayed and control reactions (without enzymes) were performed. We found that the SGID improve the antioxidant activity of the different protein fractions, it was the double in most fractions except to glutelins, where was eight times higher the antioxidant activity.

Keywords: Chia seeds, protein fractions, antioxidant activity, simulated gastrointestinal digestion

RESUMEN
La semilla de chía es un alimento mexicano heredado y consumido desde el tiempo de los aztecas. Este contiene 19-23% de proteína y ha sido reportado que su consumo tiene efectos benéficos para la salud, incluyendo la actividad antioxidante. La oxidación de biomoléculas está mediada por el proceso de radicales libres que conduce a impactos negativos en los alimentos y los sistemas biológicos. Las proteínas y péptidos se han propuesto como una alternativa para prevenir algunas enfermedades. El objetivo de este trabajo fue analizar la actividad antioxidante (AA) (DPPH) de cinco fracciones proteícas de la semilla de chía con y sin hidrolizar por medio de una simulación de la digestión gastrointestinal (SGID). Cada fracción de proteína (albúmina, globulina, glutelina, aislado y concentrado de proteína) primero fué hidrolizada con pepsina 37 ° C durante 60 minutos a pH 2 y luego con pancreatina a 37 ° C durante 30 minutos a pH 6. Se ensayaron cinco concentraciones diferentes y se realizaron reacciones de control (sin enzimas). En este trabajo se observó que la SGID mejorara la actividad antioxidante al doble, de las diferentes fracciones proteicas, excepto para las glutelinas, donde se incrementa ocho veces más la actividad antioxidante.

Palabras Clave: semillas de chía, fracciones de proteínas, actividad antioxidante, simulación de la digestión gastrointestinal.

INTRODUCTION

Biomolecules oxidation has been recognized as a free radical mediated process which leads to many negative impacts on food and biological systems. Free radicals are continuously generated by metabolism in our body. The human body has multiple mechanisms particularly enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems to protect the cellular molecules against ROS (reactive oxygen species) induced damage. The ROS include superoxide anions (O2), hydrogen peroxide (H2O2) and hydroxyl radicals (OH•). Lipid peroxidation, which involves a series of free radical mediated chain reaction processes, is associated with several types of biological damage [1]. A difference between oxidants and antioxidants to produce excess free radicals can cause protein damage, DNA mutation, oxidation of membrane phospholipids and modification of low-density lipoproteins [2]. These processes could lead to several diseases like atherosclerosis, stroke, diabetes, Alzheimer's disease and cancer [3].

Prevention and treatment of complex diseases antioxidant-based drug formulations are used [4]. Some synthetic antioxidants, such as butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT), and propyl gallate, are widely used in food and biological systems to scavenge free radicals. However, these synthetic antioxidants have potential risks to human health [5]. The traditional medicine all over the world is nowadays revalued by an extensive activity of research 79 on different plant species as safe and effective natural sources of antioxidants. Plants produce many antioxidants to control the oxidative stress caused by sunbeams and oxygen, they can represent a source of new compounds with antioxidant activity, which can play an important role in reducing oxidative processes in the human body. Currently, numerous studies suggest that an increase consumption of several plants that containing antioxidants can protect against DNA damage and carcinogenesis [6].

The proteins and peptides inhibit oxidation through multiple pathways including scavenging free radicals, chelating prooxidative transition metal ions, reducing hydroperoxides and inactivating reactive oxygen species [7]. In recent times, there has been mounting evidence that protein, peptides and protein hydrolysates of plants contain antioxidant activities [8,9,10,11].

Moreover, there has been proposed that they can be used as food additive antioxidants. Studies of antioxidant activity of proteins fractions from plants are limited, though has been demostrated that in the barley glutelin fraction hydrolyzed has strong antioxidant activities [12]. Chia seeds have high protein level, which made to this tissue an important protein source and good candidates for analysis of antioxidant activity. The aim of this study was to investigate the antioxidant activity of different protein fractions and hydrolyzed by simulated gastrointestinal digestion from chía seeds.

METHODS

Simulated Gastrointestinal Digestion

The simulated gastrointestinal digestion used method was the reported by Orsini *et al*. [13]. The different protein fractions (albumin, globulin, glutelin, isolated and concentrated protein) was first

hydrolyzed with pepsin at pH 2 at 37°C for 60 minutes and then with pancreatin at pH 6 at 37°C for 30 minutes. Five different concentrations were assayed and control reactions (without enzymes) were performed. After stopping the reaction by heating at 85 °C for 10 min, the suspensions were freeze-dried.

DPPH radical scavenging activity

Evaluation of the radical scavenging activity was performed according to the method used by Wang *et al*. [14] with some modifications. Briefly, 100 µl of different concentrations of sample hydrolysates (2, 1.5, 1, 0.5 and 0.2 mg/mL) were mixed with 100 µl of a 0.1µM of DPPH solution in ethanol, maintained for 10 minutes in the dark, subsequently the absorbance was measured at 517 nm against ethanol as a blank in the spectrophotometer (Genesys 6 Thermo TM).

Lower absorbance of reaction mixture indicated higher free radical scavenging activity. The difference at 517 nm between the blank and the sample was used to measure the radical scavenging activity. The radical scavenging capacity (RSC) was calculated using the following formula:

RSC = (Acontrol-Asample / Acontrol)*100.

This allowed obtain the radical scavenging capacity as percentage inhibition. Each sample was assayed in triplicate and mean values were calculated.

RESULTS

The samples of different protein fractions of chia showed different DPPH scavenging activity, which varied respect to concentration (Table 1). The albumins of chia showed the highest DPPH scavenging activity (25.41%), followed by isolated and concentrated, the worst activity was presented by glutelin fraction.

In order to know if the gastrointestinal digestion has affected in the antioxidant activity of proteins, the different protein fractions were subjected to a simulated gastrointestinal digestion (SGID). After the SGID treatment, the antioxidant activity (AA) (DPPH) was tested (Table 2). There was significant difference by treatment; all the protein fractions showed more antioxidant activity after submitted at SGID, depending on the fraction, in general was an increase of 2 times for concentrate, isolate, albumins and glutelins; meanwhile chia glutelin increase 8 times at 2mg/mL. The albumins showed better antioxidant activity (44.87%) at 3mg/mL, followed by globulins (41.51%) and isolated (39.16%). We found that, different protein concentrations in SGID assay resulted in different values of antioxidant activity, this due to enzyme/substrate ratio; when it decrease, the hydrolysis degree decrease too, which allows obtain more amount of peptides with antioxidant activity, than when hydrolysis is higher. All protein fractions have high antioxidant activity using a concentration of 3mg/ml.

Table 1.Percentage DPPH scavenging of protein fractions of chia seeds without SGDI treatment

Concentration mg/ml	Albumins	Globulins	Glutelins	Concentrate	Isolated
0	0	0	0	0	0
0.2	$6 \pm 5.2_{A}^{a}$	$1.29 \pm 0.87_{A}^{b}$	ND	$9.26 \pm 4.81_{A}^{b}$	ND
0.5	$12.6 \pm 3.96_{B}^{a}$	$6.72 \pm 4.03_{B}^{a}$	ND	$10.61 \pm 3.34_{A}^{a}$	ND
1	$17.73 \pm 1.45_{B}^{a}$	$5.59 \pm 4.49_{AB}^{b}$	$8.79 \pm 5.1_{A}^{b}$	$16.07 \pm 9.34_{AB}^{b}$	ND
2	$26.77 \pm 2.01_{C}^{a}$	ND	$2.82 \pm 2.68_{B}^{b}$	$7.69 \pm 4.71a^{b}$	$7.32 \pm 2.38_{A}^{b}$
3	$25.41 \pm 2.94_{C}^{a}$	ND	$8.1 \pm 3.02_{A}^{b}$	$17.35 \pm 2.03b^{c}$	$17.56 \pm 1.23_{B}^{c}$

The percentage of DPPH Inhibition was determinate at different concentrations. Results are mean values of three replicates ± SD. Values followed by different letters are significantly different by LSD test ($p>0.05$). ND, no detected. The analysis was made by triplicate.

Table 2.Percentage DPPH scavenging of protein fractions of chia seeds with SGDI treatment

Concentration mg/ml	Albumins	Globulins	Glutelins	Concentrate	Isolated
0	0	0	0	0	0
0.2	$11.54 \pm 3.21_{A}^{a}$	$4.53 \pm 1.73_{A}^{b}$	$8.25 \pm 2.4_{A}^{ab}$	$7.06 \pm 6.07_{A}^{ab}$	ND
0.5	$25.57 \pm 0.81_{B}^{a}$	$6.06 \pm 3.01_{A}^{b}$	$13.85 \pm 1.6_{B}^{c}$	$12.72 \pm 0.96_{A}^{c}$	$6.37 \pm 4.79_{A}^{b}$
1	$35.24 \pm 1.49_{C}^{a}$	$15.97 \pm 1.91_{B}^{b}$	$17.59 \pm 4.51_{C}^{b}$	$22.81 \pm 5.03_{B}^{b}$	$11.81 \pm 6.43_{A}^{b}$
2	$40.64 \pm 5.64_{CD}^{a}$	$31.65 \pm 1.94_{C}^{b}$	$23.69 \pm 1.04_{D}^{c}$	$44.04 \pm 2.19_{C}^{a}$	$25.93 \pm 2.42_{B}^{c}$
3	$44.87 \pm 1.9_{D}^{a}$	$41.51 \pm 0.99_{D}^{b}$	$24.54 \pm 1.27_{D}^{c}$	$37.02 \pm 3.63_{D}^{d}$	$39.16 \pm 2.41_{C}^{b}$

The percentage of DPPH Inhibition was determinate at different concentrations. Results are mean values of three replicates ± SD. Values followed by different letters are significantly different by LSD test ($p>0.05$). ND, no detected. The analysis was made by triplicate.

DISCUSION

The results confirm that chia (a underexploited crop) have antioxidant properties. The SGID is an assay to know the effect of human digestion over foods, in this case, we can say that chia protein consumption increase 2 times its antioxidant activity, however, the different protein fractions have a high potential for use as additives in processed foods. Glutelin fraction have lower antioxidant activity compared to the other fractions, however, when it is treated with SGID; the antioxidant capacity increases up to 8 times at 2mg/mL. The same effect can be observed in the protein concentrate which increases up to 6 times at 2mg/mL; this values suggests that hidrolizated glutelin by digestive enzymes, releases a higher percentage of peptides with antioxidant activity than the other protein fractions.

CONCLUSIONS

The antioxidant activity varied in the different protein fractions, the albumins of chia showed the best antioxidant activity. The simulated gastrointestinal digestion of chia protein increase the antioxidant activity.

By other hand, we found a way to produce peptides with strong radical scavenging activity from relatively underexploited seeds; the peptides produced may be a source of natural antioxidants and could be used as a food additive.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was funded by SIP-IPN. (Project No. 20151534).We thank to COFAA-IPN for financial support and to Diego A. Maldonado Torres for his technical assistance.

REFERENCES

[1]Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). "Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health". Pharmacognosy Reviews, 4(8):118-126.

[2]Lee, J., Koo, N., & Min, D. (2004). "Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals". Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 3(1):21–33

[3]Chandrasekara, A., & Shahidi, F. (2010). "Inhibitory activities of soluble and bound millet seed phenolics on free radicals and reactive oxygen species". Journal of Agriculture and Food Chemistry, 59(1):428–36

[4]Ishtiaq, S., Ahmad, M., Hanif, U., Akbar, S., Mehjabeen, & Kamran, S. H. (2014). "Phytochemical and in vitro antioxidant evaluation of different fractions of Amaranthus graecizans subsp. silvestris (Vill.) Brenan". Asian Pacific journal of tropical medicine, 7S1(1), S342–7.

[5]Barlow, S., & Schlatter J. (2010). "Risk assessment of carcinogens in food". Toxicology and Applied Pharmacology, 243(2):180–90.

[6] Rasineni, G. K., Siddavattam, D., & Reddy, A. R. (2008). "Free radical quenching activity and polyphenols in three species of Coleus". Journal of Medicinal PlantsResearch, 2:285–291.

[7] Hook, V. Y. H., Burton, D., Yasothornsrikul, S., Hastings, 424 R. H., & Deftos, L. J. (2001). Proteolysis of ProPTHrP (1–141) by ''Prohormone Thiol Protease'' at multibasic residues generates PTHrP-related peptides: Implications for PTHrP peptide production in lung cancer cells. Biochemical and Biophysical Research Communications, 285, 932–938

[8] Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Recio, I., & Bartolomé, B. (2007). "ACE inhibitory and radical-scavenging activity of peptides derived from β-lactoglobulin f(19–25). Interactions with ascorbic acid". Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55, 3392–3397.

[9] Li, Y., Jiang, B., Zhang, T., Mu, W., & Liu, J. (2008). "Antioxidant and free radical scavenging activities of chickpea protein hydrolysate (CPH)". Food Chemistry, 106(2):444–50

[10] Kong, X. Z., Zhou, H. M., & Hua, Y. F. (2008). "Preparation and antioxidant activity of wheat gluten hydrolysates (WGHs) using ultrafiltration membranes". Journal of the Science of Food and Agriculture, 88, 920–926.

[11] Kou, X., Gao, J., Xue, Z., Zhang, Z., Wang, H., & Wang, X. (2013). "Purification and identification of antioxidant peptides from chickpea (Cicer arietinum L.) albumin hydrolysates". LWT - Food Science and Technology, 50(2), 591–598.

[12] Xia, D.Z., Yu, X.F., Zhu, Z.Y., & Zou, Z.D. (2011). "Antioxidant 489 and antibacterial activity of six edible wild plants (Sonchus spp.) in China". Natural Products Research, 25(20): 1893-1901.

[13] Orsini-Delgado, M., Tironi, V., & Añón, M. (2011) "Antioxidant activity of amaranth proteins or their hydrolysates under simulated gastrointestinal digestion". LWT Food Science and Technology, 44:1752–1760.

[14] Wang, J., Wang, K., Lin, S., Zhao, P., Jones, G., Trang, H., Liu, J., & Ye, H. (2012). "Improvement of antioxidant activity of peptides with molecular weights ranging from 1 to 10 kDa by PEF technology". International Journal of Biological Macromolecule, 51, 244-249.

OBTAINING PROTEIN FRACTIONS WITH ANTIOXIDANT ACTIVITY FROM AMARANTH

(Obtención de fracciones proteicas con actividad antioxidante de amaranto)

Jocksan Ismael Morales Camacho[a], Flor de Fátima Rosas Cárdenas[a], Silvia Luna Suárez[a*+]

[a] Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada del Instituto Politécnico Nacional

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: silvials2004@yahoo.com.mx

Área del Conocimiento: Biotecnología Alimentaria

ABSTRACT
Biomolecules oxidation has been recognized as a free radical mediated process which leads to many negative impacts on food and biological systems. Proteins and bioactive peptides have been proposed as an alternative to prevent some diseases, and they can be used as food additives. Recently there has been a particular focus on peptides as a source of antioxidants. Bioactive peptides, as products of hydrolysis of diverse food proteins, are the focus of current research. They exert various biological roles, one of the most crucial of which is the antioxidant activity. Reverse relationship between antioxidant intake and diseases has been approved through plenty of studies. Antioxidant activity of bioactive peptides can be attributed to their radical scavenging properties. Amaranth grain is an important source of proteins. In this study we analyze the antioxidant activity (AA) (DPPH radical scavenging activity) of the two major protein fractions from amaranth, the fractions were hydrolyzed by flavourzyme during five different times and at three E:S ratios. We found that the hydrolysis did affect positively the AA, it increased the AA from 2 (glutelins) to 2.4 times (albumins), the protein concentration and the E:S showed significant difference on AA. Through enzymatic digestion we found a way to improve the antioxidant activity of the amaranth proteins.

Keywords: Amaranth seeds, protein fractions, antioxidant activity

RESUMEN
La oxidación de las biomoléculas se ha reconocido como un proceso en cuál intervienen radicales libres, que llevan a impactos negativos en los sistemas biológicos y en alimentos. Las proteínas y los péptidos bioactivos se han propuesto como una alternativa para prevenir algunas enfermedades, y además pueden ser utilizados como aditivos alimentarios. Recientemente ha habido un enfoque particular en los péptidos como una fuente de antioxidantes. Los péptidos bioactivos, como producto de la hidrólisis de proteínas alimentarias son el enfoque de trabajos recientes. Estas moléculas tienen varias actividades biológicas, una de las más cruciales es la actividad antioxidante. Se ha probado una relación inversa entre la ingesta de antioxidantes y las enfermedades, en muchos estudios. La actividad antioxidante de los péptidos bioactivos se puede atribuir a sus propiedades de atrapamiento de radicales. El grano de amaranto es una fuente importante de proteínas. En este estudio analizamos la actividad antioxidante (AA) (actividad de atrapamiento de radicales DPPH) de dos de las fracciones mayoritarias de amaranto, las fracciones fueron hidrolizadas por medio de flavourzyme durante cinco diferentes tiempos y tres relaciones enzima sustrato (E:S). Encontramos que la hidrólisis de las fracciones tuvo un efecto positivo en la AA, incrementando de 2 veces (glutelinas) a 2.4 veces (albuminas). La concentración de proteína y

la relación E:S tuvieron efecto significativo en la AA. Mediante digestión enzimática, se encontró una manera de mejorar la actividad antioxidante de las proteínas de amaranto.
Palabras clave: Semilla de amaranto, fracciones proteicas, actividad antioxidante.

INTRODUCCIÓN

La oxidación de biomoléculas es un problema que tiene efectos negativos sobre distintos sistemas biológicos, incluidos los alimentos. Por tal motivo, en los últimos años se han desarrollado diferentes investigaciones en torno al estudio de los procesos oxidativos con la intención de entender los mecanismos que controlan este fenómeno y también para proponer tratamientos para su control o prevención [1]. Es bien sabido que la oxidación de biomoléculas se genera a partir de la presencia de especies reactivas de oxígeno (ERO), las cuáles son moléculas que incluyen al anión superoxido (O2), al peróxido de hidrógeno (H2O2) y a radicales hidroxilo (OH•). Estas sustancias se generan continuamente durante los procesos metabólicos [2]. Los daños que las ERO pueden ocasionar incluyen la peroxidación lipídica, el daño en la función de diferentes proteínas, mutaciones en el ADN, oxidación de los fosfolípidos de la membrana celular y la modificación de lipoproteínas de baja densidad. Este daño celular puede provocar el desarrollo de enfermedades como aterosclerosis, diabetes, cáncer, alzheimer, entre otras [3, 4]. El cuerpo humano cuenta con mecanismos enzimáticos y no enzimáticos para proteger a las células del daño oxidativo pero estos sistemas de protección se pueden ver rebasados por una alta concentración de ERO [5]. Para ayudar en situaciones como estas se han desarrollado tratamientos basados en sustancias sintéticas como el uso o aplicación del butilhidroxitolueno (BHT), el butilhidroxinisol (BHA) o el galato de propilo, las cuáles tienden a ser sustancias tóxicas para el ser humano [6, 7].

El estudio de distintas especies de plantas ha mostrado que existen algunos organismos que producen una gran cantidad de sustancias antioxidantes para controlar el daño oxidativo causado por los rayos del sol y el ambiente. A partir de estos hallazgos, se ha establecido que la ingesta de algunas especies con altas concentraciones de sustancias antioxidantes podría ayudar a prevenir o controlar los procesos oxidativos en el cuerpo humano y con ello disminuir el riesgo de padecer enfermedades asociadas al estrés oxidativo [8]. Por otra parte, también se ha observado que fracciones proteicos extraídos de plantas al ser hidrolizados generan péptidos que inhiben la oxidación, es decir, péptidos con actividad antioxidante que actúan como acarreadores de ERO y como agentes quelantes de iones que promueven procesos de oxidación [9, 10]. Además, se sabe que los péptidos o proteínas poseen propiedades funcionales que se pueden aprovechar en la industria de los alimentos y de esta forma aplicarlos como aditivos antioxidantes.

El amaranto es un grano con un alto contenido proteico, por tal razón, es un buen candidato para la generación de péptidos con actividad antioxidante. En este estudio se analizó la actividad antioxidante (AA) (utilizando del método del DPPH) de los productos hidrolizados por flavourzyme de las dos fracciones proteicas mayoritarias aisladas del grano de amaranto.

METODOLOGÍA

Materiales

La harina de amaranto que se utilizó fue obtenida a partir de la molienda del grano. Esta harina se tamizó con malla de 0.5 mm para uniformar el tamaño de la partícula. El preparado de exopeptidasas Flavourzyme fue adquirido de Novoenzyme (Bagsvaerd, Denmark).

Preparación de la muestra y obtención de las fracciones proteicas
La harina de amaranto se desgrasó mediante agitación por 12 horas con hexano a una relación 1:10 (p/v). Posteriormente, la harina se secó para eliminar los residuos del solvente y se tamizó por segunda ocasión con una malla de 0.18 mm. En seguida, la harina se sometió a un tratamiento de extracción secuencial de proteínas de acuerdo al protocolo de Sandoval-Oliveros y Paredes-López [11. Todas las fracciones se almacenaron a 4 °C y el contenido de proteínas en cada fracción se determinó por el método de Bradford.

Hidrólisis enzimática
Las fracciones con el mayor contenido de proteínas (albúminas y glutelinas) se sometieron a hidrólisis con flavourzyme. Se probaron cinco tiempos distintos de hidrólisis (30, 60, 90, 120 y 150 min) y tres condiciones diferentes de relación enzima:sustrato (1:50, 1:80 y 1:100); los tratamientos se realizaron a pH 7 y a una temperatura de 50 °C. El proceso de hidrólisis se paró mediante tratamiento térmico de las muestras a 80 °C durante 15 min. Posteriormente, las muestras se enfriaron y se centrifugaron a 4000 g por 15 min. El sobrenadante se recuperó, se liofilizó y almacenó a -20 °C.
El grado de hidríolisis (GH) se determinó por la reacción de TNBS con grupos amino libres de acuerdo al método de Tironi y Añón [12].

Actividad antioxidante: captación de radicales DPPH
La evaluación de la actividad antioxidante se realizó de acuerdo al método de Wang y col. [13]. Para esto se utilizaron 100 µL a diferentes concentraciones (0.2, 0.5, 1, 1.5 y 2 mg/mL) de muestra hidrolizada; cada muestra se mezcló con 100 µL de una solución etanólica al 80 % que contenía 0.1 µM DPPH. Cada mezcla se mantuvo en oscuridad por 10 min y posteriormente se midió su absorbancia en un espectrofotómetro (Genesys 6 Thermo TM) a una longitud de onda de 517 nm. Como muestra blanco se utilizó etanol al 80 %. La diferencia entre el blanco y las muestras con el radical DPPH se usaron para determinar la capacidad antioxidante de los hidrolizados (CAH). La CAH se calculó aplicando la siguiente fórmula:
RSC = (Acontrol-Amuestra / Acontrol)*100
En donde Acontrol es la absorbancia del radical DPPH; Amuestra, es la absorbancia de la muestra que además del radical DPPH contiene el hidrolizado.

Análisis estadístico
Todos los experimentos se realizaron por triplicado; los resultados que se obtuvieron se utilizaron para realizar un análisis de varianza (ANDEVA) y para observar diferencias significativas entre medias. El programa estadístico que se utilizó fue el Design-Expert. Los resultados se expresaron como el promedio de las mediciones.

RESULTADOS
A partir de la extracción secuencial se pudieron obtener diferentes fracciones de proteínas según su solubilidad. El rendimiento obtenido de cada una de las fracciones fue: albuminas 23.6%, globulinas 35.8%, prolaminas 3.7% y glutelinas 36.7%. La cuantificación de proteína de cada aislado reveló que la fracción de prolaminas contenía niveles muy bajos de proteína, es decir, probablemente el contenido de proteínas de amaranto solubles en soluciones alcohólicas es muy bajo, por lo tanto, no se pudieron

realizar las pruebas de AA con este aislado. Entonces se midió la capacidad antioxidante de las fracciones de albúminas y glutelinas; los resultados mostraron que en los hidrolizados de albúminas y glutelinas se observó un incremento de la AA al incrementar la concentración de proteína. La relación E:S para el hidrolizado de albúminas mostró una diferencia significativa y, el factor tiempo, no mostró diferencia significativa ($P<0.05$). Las mejores condiciones de hidrólisis que mejoran la AA para esta fracción son la relación E:S 1:80 y el tiempo de hidrolisis durante 60 min. El proceso de hidrólisis incrementó 2.4 veces la AA con respecto al aislado sin hidrolizar. Por otra parte, el hidrolizado de glutelinas mostró mejor AA con las relaciones E:S de 1:50 y 1:80; mientras que, el factor tiempo no mostró diferencia significativa ($p<0.05$), es decir, no hubo efecto en la AA por el factor tiempo, por lo tanto, para fines prácticos bastaría con realizar la hidrólisis con una relación E:S 1:50 y por un tiempo de treinta minutos. El proceso de hidrólisis aumentó 2 veces la AA con respecto al aislado de glutelinas sin hidrolizar. En general, los hidrolizados de glutelinas mostraron una mayor AA (Figura1).

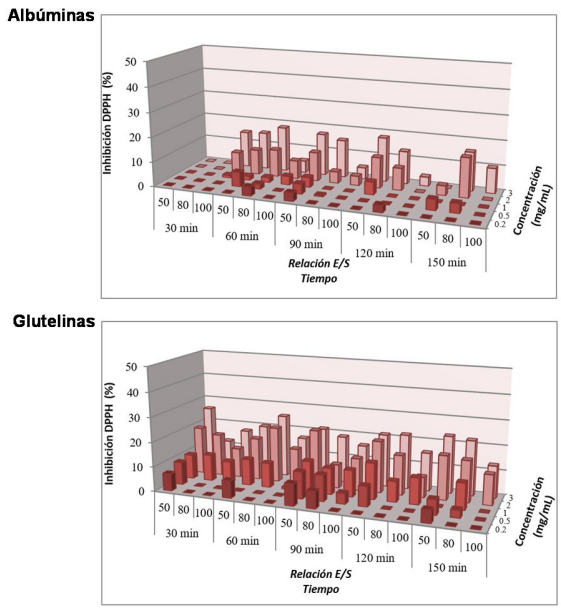


Figura 1. Evaluación de AA de hidrolizados de amaranto a diferente relación E:S, tiempo de hidrólisis y concentración de proteína inicial. El resultado es el promedio de tratamientos realizados por triplicado.

DISCUSIONES.

La AA determinada por la captura del radical DPPH es una técnica colorimétrica que se basa en la capacidad que tiene una molécula para donar o ceder un electrón; esta capacidad provoca la reacción con el radical DPPH el cual es neutralizado y, por lo tanto, se genera la forma reducida del DPPH; esto provoca el cambio de color violeta a amarillo, esta variación en el color se puede medir en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 517 nm [14]. En esta investigación los hidrolizados de albúminas y glutelinas son las moléculas que mostraron una mayor capacidad para donar o ceder un electrón y así neutralizar al radical DPPH en comparación con los fracciones sin hidrolizar esto es porque el proceso de ruptura de las cadenas polipeptídicas ocasionada con la proteinasa flavourzyme genera un mayor número de moléculas que pueden atrapar el radical DPPH. Entonces, los resultados muestran que

los hidrolizados pueden actuar como agentes donadores de electrones que reaccionan con el radical DPPH, esto abre la posibilidad de utilizarlos sobre otros radicales que provocan oxidación (en sistemas biológicos), lo cual generaría neutralización de esas moléculas haciéndolos productos más estables y menos tóxicos para las células.

El aumento de la AA acorde con el aumento a la concentración inicial de proteína que se hidrolizó es un fenómeno que se puede explicar a partir del número de moléculas que se generan por efecto del proceso de ruptura enzimática, es decir, entre mayor sea la cantidad de proteína que se puede hidrolizar mayor será el número de moléculas con AA que se generarán y, por lo tanto, mayor el número de moléculas que podrán neutralizar moléculas oxidantes (en este caso DPPH) [7].

Las fracciones de albúminas y glutelinas tienen diferencias a nivel de estructura primaria, secundaria y terciaria. Por otra parte, las proteinasas actúan sobre las proteínas en sitios de corte que reconocen según su secuencia de aminoácidos (dada por la estructura primaria), la exposición de los sitios de corte (dada por su estructura secundaria y terciaria) y condiciones de hidrólisis (polaridad del solvente, pH temperatura, etc) [15].

Al analizar la relación E:S, observamos que a menor relación E:S, es decir a mayor concentración de enzima, la actividad antioxidante es mayor, esto nos indica que la enzima actúa en los sitios de corte, que al parecer se encuentran expuestos; y rápidamente se liberan péptidos que tienen actividad AA, puesto que el tiempo no tuvo efecto.

En la relación E:S de 50 y 80, a los 60 minutos se obtuvo la mayor actividad en la hidrólisis de albúminas, mientras que en la hidrólisis de las glutelinas, los mejores resultados se encontraron a los 30 minutos con una relación 1:50 y a los 60 minutos con una relación 1:80. Esto nos podría indicar que hay diferencias estructurales entre estas fracciones y que tal vez en las glutelinas hay un menor número de sitios de corte sobre los cuáles actúa el flavourzyme y/o también puede ser porque esos sitios de corte estén más restringidos que en las albuminas.

Los péptidos liberados por la acción de la proteasa tienen mayor AA que las fracciones sin tratamiento, en general se obtuvo que los hidrolizados de las glutelinas tienen mayor AA que los hidrolizados de las albúminas, alrededor de 1.3 veces.

CONCLUSIONES

Este estudio reveló que las albúminas y las glutelinas son dos fracciones proteicas con capacidad antioxidante en el amaranto. Los hidrlizados con flavourzyme de las glutelinas de amaranto tienen mayor capacidad antioxidante que los hidrolizados de albúminas.

Este trabajo reporta una estrategia para producir péptidos con una capacidad antioxidante que se podría aplicar para la generación de nutraceúticos o bien, para la generación de aditivos para la formulación de alimentos.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos el apoyo a la SIP-IPN para llevar este proyecto. Proyecto SIP No. 20151534. Y a la COFAA-IPN por el apoyo económico para la asistencia al congreso.

REFERENCIAS

[1] Gate, L., Paul, J., Ba, G. N., Tew, K. D., Tapiero, H. (1999), "Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants", Biomedicine and Pharmacotherapy, 53(4): 169-80.

[2] Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., &Chandra, N. (2010), "Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health", Pharmacognosy Reviews, 4(8): 118-126.

[3] Alaiz, M., Beppu, M., Ohishi, K., & Kikugawa, K. (1994), "Modification of delipidated apoprotein B of low density lipoprotein by lipid oxidation products in relation to macrophage scavenger receptor binding", Bioogical and Pharmaceutical Bulletin, 17(1): 51–7.

[4] Chandrasekara, A., Shahidi, F. (2010), "Inhibitory activities of soluble and bound millet seed phenolics on free radicals and reactive oxygen species", Journal of Agriculture and Food Chemistry, 59(1): 428–36.

[5] Lee, J., Koo, N., Min, D. (2004). "Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. Comprehensive", Reviews in Food Science and Food Safety, 3(1): 21–33.

[6] Barlow, S., Schlatter J. (2010), "Risk assessment of carcinogens in food", Toxicology and Applied Pharmacology, 243(2): 180–90.

[7] Ishtiaq, S., Ahmad, M., Hanif, U., Akbar, S., Mehjabeen, Kamran, S. H. (2014), "Phytochemical and in vitro antioxidant evaluation of different fractions of Amaranthus graecizans subsp. Silvestris (Vill.) Brenan", Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 7S1(1): S342–7.

[8] Lin, K., Yang, Y., Yang, C., Huang, M., Lo, H., Liu, K., Lin, H. (2013), "Antioxidant activity of herbaceous plant extracts protect against hydrogen peroxide-induced DNA damage in human lymphocytes", BMC Research Notes, 6: 490.

[9]Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Recio, I., Bartolomé, B. (2007), "ACE-inhibitory and radical-scavengingactivity of peptides derived from β-lactoglobulin f(19–25). Interactions with ascorbic acid", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55: 3392–3397.

[10] Hook, V. Y. H., Burton, D., Yasothornsrikul, S., Hastings, R. H., Deftos, L. J. (2001), "Proteolysis of ProPTHrP (1–141) by ''Prohormone Thiol Protease'' at multibasic residues generates PTHrP-related peptides: Implications for PTHrP peptide production in lung cancer cells", Biochemical and Biophysical Research Communications, 285: 932–938.

[11] Sandoval-Oliveros, M.R., Paredes-Lopez, O. (2013), "Isolation and characterization of proteins from chia seeds (Salvia hispánica L.)", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61: 193-201.

[12] Tironi, V., Añón, M. (2010), "Amaranth as a source of antioxidant peptides Effect of proteolysis", Food Research International, 43: 315-322.

[13] Wang, J., Wang, K., Lin, S., Zhao, P., Jones, G., Trang, H., Liu, J., Ye, H. (2012), "Improvement of antioxidant activity of peptides with molecular weights ranging from 1 to 10 kDa by PEF technology", International Journal of Biological Macromolecule, 51: 244-249.

[14] Jothy, S. L., Zuraini, Z., Sasidharan, S. (2011), "Phytochemicals screening, DPPH free radical scavenging and xanthine oxidase inhibitory activities of Cassia fistula seeds extract", Journal of Medicinal Plants Research, 5: 1941-1947.

[15] Hwang, J. Y., Shyu, Y. S., Wang, Y. T., Hsu, C. K. (2010), "Antioxidative properties of protein hydrolysate from defatted peanut kernels treated with esperase LWT", Food Science and Technology, 43(2):285-90.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION AND ANTIOXIDANT CAPACITY FROM RESIDUAL BIOMASS OF THE MICROALGA *Dunaliella tertiolecta*

(Caracterización bioquímica y capacidad antioxidante de la biomasa residual de la microalga *Dunaliella tertiolecta*)

Lourdes J. Germán-Báez[b*], Claudia D. Norzagaray-Valenzuela[b], David U. Santos-Ballardo[b], Roberto Gutiérrez-Dorado[a,b], Cuauhtémoc Reyes-Moreno[a,b], Angel Valdez-Ortiz[a,b+]

[a] Posgrado en Ciencia y Tecnología de Alimentos, FCQB, Universidad Autónoma de Sinaloa. Ciudad Universitaria, CP 80300. Culiacán, Sinaloa, México.
[b] Programa Regional de Posgrado en Biotecnología, FCQB, Universidad Autónoma de Sinaloa. Ciudad Universitaria, CP 80300. Culiacán, Sinaloa, México.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: angelvaldezortiz@yahoo.com.mx

Área del conocimiento: Biotecnología Alimentaria

ABSTRACT
Microalgae production technology is considered as an attractive tool for bioenergy generation due to the environment-friendly characteristics and reduction of CO_2 emissions. However the biofuel produced by the microalgae biomass is not economically viable yet. In this sense, the use of the residual biomass (RB), obtained after the oil extraction (to biodiesel production) from the full microalgae biomass, would allow full use of these crops, through the generation of value-added products. In fact, RB is considered as an attractive source of commercial products, due to its high protein and carbohydrate content and other high value compounds, which could be used in food and healthcare industry. In the present study we carried out the nutritional and nutraceutical characterization of the RB of *Dunaliella tertiolecta*. The biochemical composition was determined according to AOAC methods. The free (FE) and bound extracts (BE) were obtained and their antioxidant capacity was determined by both ORAC and ABTS assays. Content of phenolic compounds was determined by the Folin-Ciocalteu method. The results obtained showed that RB mainly consists in carbohydrates (54.83%), followed by proteins (32.36%), ash (12.38%), humidity (3.05%) and lipids in trace amounts (0.36%). The antioxidant capacities by ORAC assay were 23.26, 94.34 and 117.61 µmoles trolox equivalent g^{-1} sample dw (µmoles TE gdw^{-1}) to FE, BE and total antioxidant capacity respectively. With respect to ABTS assay, the values were 23.99, 45.24 and 68.80 µmoles TE gdw^{-1} to FE, BE and total antioxidant capacity, respectively. The phenolic content values were 0.20, 3.08 and 3.29 mg gallic acid equivalent gdw^{-1} for FE, BE and total phenolic content, respectively. In conclusion, according to the antioxidant capacity, the BE showed the highest value of antioxidant properties compared to the FE, which agree with the highest phenolic content of this extract.

Keywords: *Dunaliella tertiolecta*, biochemical composition, phenolic content, antioxidant capacity.

RESUMEN

La tecnología de producción de microalgas es considerada una herramienta atractiva para la generación de bioenergía dadas las características amigables de estás con el medio ambiente. Sin embargo la producción de biocombustibles a partir de la biomasa de microalgas no se ha logrado producir a costos competitivos. En este sentido, el uso de la biomasa residual (BR), la cual se obtiene después de la extracción de aceite (para la producción de biodiesel) de la biomasa completa, lo cual permite el uso del cultivo completo, además de la generación de productos con valor agregado. De hecho, la BR es considerada una fuente atractiva de productos comerciales, debido a su alto contenido de proteína y carbohidratos, además de compuestos de alto valor, la cual pudiera ser utilizada en la industria alimenticia y farmacéutica. En el presente estudio se realizó la caracterización nutricional y nutracéutica de la BR de *Dunaliella tertiolecta*. La composición bioquímica se determinó de acuerdo a los métodos de la AOAC. Se obtuvieron extractos libres (EL) y ligados (EG) y su capacidad antioxidante se determinó por dos ensayos ORAC y ABTS. Los resultados obtenidos muestran que la BR consiste principalmente de carbohidratos (54.83%), seguidos de proteínas (32.36%), cenizas (12.38%), y lípidos en cantidades traza (0.36%). La capacidad antioxidante por el ensayo de ORAC fue 23.26, 94.34 y 117.61 µmoles equivalentes de trolox g^{-1} sample, bs (µmoles ET gbs^{-1}) para los EL, EG y la capacidad antioxidante total, respectivamente. Respecto al ensayo de ABTS, los valores fueron 23.99, 45.24 y 68.80 µmoles ET gbs^{-1} para los EL, EG y la capacidad antioxidante total, respectivamente. El contenido de compuestos fenólicos fue de 0.20, 3.08 y 3.29 mg equivalente de ácido gálico gbs^{-1} para los EL, EG y el contenido de total de fenólicos, respectivamente. En conclusión de acuerdo a la capacidad antioxidante los extractos ligados mostraron el mayor valor de capacidad antioxidante comparado con los extractos libres, similar comportamiento presentó el contenido de compuestos fenólicos.

Palabras clave: *Dunaliella tertiolecta*, composición bioquímica, compuestos fenólicos, capacidad antioxidante.

INTRODUCCIÓN

Actualmente existe una tendencia internacional hacia la búsqueda de nuevas fuentes de energía de baja emisión de carbono, como la energía solar, térmica, eólica, biocombustibles, entre otras [1]. Dentro de las fuentes energéticas renovables disponibles en la actualidad, las microalgas han despertado un gran interés durante los últimos años gracias a sus altas tasas de crecimiento, su habilidad para fijar gases de efecto invernadero, una alta capacidad de producción de lípidos, además de no competir por tierra ni agua de cultivo. Aún con las ventajas que este biocombustible presenta, en la actualidad no se ha logrado producir a costos competitivos, por ello se ha propuesto el aprovechamiento integral de la microalga a través de un enfoque de biorefinería, con el objetivo de dar una mayor rentabilidad al proceso y como estrategia para aumentar la viabilidad de la industria de microalgas [2]. Una alternativa es la utilización de la biomasa residual (BR), obtenida como producto de desecho después de la extracción de aceite, para producción de biodiesel, ya que se ha encontrado que las microalgas además de ser una potencial fuente de bioenergía sintetizan un gran número de compuestos bioactivos como aminoácidos, ácidos grasos, carbohidratos, vitaminas, minerales, pigmentos, entre otros, los cuales pueden permanecer en la BR [3, 4]. Por ello algunas microalgas como las de los géneros *Spirulina, Chlorella, Haematococcus, Botrycoccus, Phaeodactylum, Porphyridium* y *Dunaliella* han sido cultivadas de manera comercial. De todas estas, *Dunaliella* ha generado gran interés debido a su excepcional capacidad para proliferar en ambientes con grandes intervalos de salinidad y temperatura; destaca también, que al crecer bajo condiciones de estrés extremas puede acumular grandes cantidades de

ácidos grasos [5]. El potencial de las microalgas para el desarrollo de productos de alto valor ha sido ampliamente reconocido; sin embargo el éxito comercial sólo se ha dado para algunas especies; esto abre la oportunidad a un amplio nicho de mercado, ya que tanto la biomasa de microalgas completa como la residual presentan un gran potencial para ser usadas en la elaboración de productos farmacéuticos, cosméticos, como suplemento alimenticio e ingrediente funcional [6]. En el presente estudio se caracterizó la BR de la microalga *Dunaliella tertiolecta* para obtener información acerca de su contenido nutrimental y nutracéutico, ya que existen pocos reportes sobre estas características.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de *Dunaliella tertiolecta*

La microalga *Duanliella tertiolecta* se cultivó utilizando el medio F/2 [7], bajo condiciones controladas de luz constante (6000-6500 lux) y temperatura: 24±2 ºC. Las células fueron recolectadas mediante floculación con quitosano [10 mgL^{-1}] por 24 h, lo cual se realizó una vez que el cultivo alcanzó una densidad óptica ($DO_{678\ nm}$) = 0.4 [8]. La extracción de aceite se realizó utilizando cloroformo y metanol (1:2 (v/v)) de acuerdo a la metodología de Soto-León y col [9]. La BR fue secada a temperatura ambiente y se realizó una trituración manual utilizando mortero y pistilo.

Evaluación de la composición bioquímica de la BR

La composición química de la biomasa residual se determinó de acuerdo a la metodología de la AOAC [10], secando a 105 ºC por 24 h, para humedad (método 925.09 B); incineración a 550 ºC, para cenizas (método 923.03), para la cuantificación de lípidos se utilizó el equipo Soxhlet con hexano (método 920.39 C); para proteína, el equipo microKjeldahl (Nx6.25) (método 960.52) y los carbohidratos se determinaron por diferencia. Todas las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado.

Preparación de los extractos hidrofílicos libres y ligados

Los extractos hidrofílicos libres se obtuvieron según la metodología reportada por Dewanto y col [11] con algunas modificaciones. Para extractos libres se utilizó etanol al 80% como solvente. El residuo fue reutilizado para la obtención de los extractos ligados de acuerdo con Mora-Rochín y col [12]. Los extractos libres y ligados se reconstituyeron en 2 mL de etanol al 80% y metanol puro, respectivamente; estos fueron almacenados a -20 °C hasta su uso. Todas las extracciones se realizaron por triplicado.

Determinación de la Capacidad antioxidante

Se evaluó la capacidad antioxidante a los extractos hidrofílicos, tanto libres como ligados, se determinó usando el ensayo de capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) y el ensayo de decoloración con el radical catiónico (ABTS), usando un lector de Microplacas (Synergy™ HT Multi-Detector, BioTek, Inc., Winooski, VT, USA). Para el ensayo de ORAC los extractos fueron evaluados contra el estándar de Trolox con fluoresceína como lo descrito por Ou y col [13]. Los resultados de los ensayo de ORAC y ABTS fueron expresados como micromoles equivalentes de Trolox/g de muestra en base seca (µmoles ET gbs^{-1}). Todas las mediciones fueron realizadas por triplicado.

Determinación del contenido de Compuestos fenólicos totales

El contenido total de compuestos fenólicos se evaluó para los extractos hidrofílicos tanto libres y ligados y se determinó usando el método colorimétrico de Singleton y col [14]. La absorbancia fue medida usando el lector de Microplacas (Synergy™ HT Multi-Detector, BioTek, Inc., Winooski, VT, USA). El contenido de fenólicos totales fue expresado como miligramos equivalentes de ácido gálico/ g de muestra en base seca (mg EAG gbs^{-1}). Todas las mediciones fueron realizadas por triplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Respecto a la composición bioquímica la BR de la microalga *Dunaliella tertiolecta* presentó una mayor proporción de carbohidratos, seguido de proteínas, cenizas y finalmente lípidos, los cuales se encontraron en cantidades traza ya que está biomasa se obtiene como subproducto de la extracción de aceites para biodiesel, el bajo o nulo contenido de lípidos aquí reportado puede atribuirse a una eficiente metodología de extracción de aceite aplicada a la biomasa microalgal. Los valores de composición bioquímica obtenidos (Tabla 1) concuerdan con lo reportado por algunos autores para esta misma especie [15, 16]. Sin embargo al compararlos con otras especies de microalgas por ejemplo la BR de *Nannochloropsis granulata* se observan diferencias en cuanto a contenidos de proteína, cenizas y carbohidratos (44.57%, 8.62% y 16.59%, respectivamente), lo cual podría deberse a que los macronutrientes presentes en las células de microalgas son altamente dependientes de las condiciones de cultivo y cosecha, al tipo de especie, así como también al método de extracción de aceite utilizado [17, 18]. Por otra parte, la BR de *Dunaliella tertiolecta* al compararla con fuentes tradicionales de alimentos como son la leche, carne y huevo, los cuales presentan un contenido de proteínas y carbohidratos alrededor de 35 y 30%, respectivamente [19]. Con base a esto se puede sugerir la BR como una buena fuente de proteínas y carbohidratos.

En cuanto a la capacidad antioxidante total de la BR, esta varió de 71.67 a 116.48 µmoles ET gbs^{-1} (**Tabla 2)**. En el ensayo de ORAC los resultados fueron, para los extractos libres 21.37 µmoles ET gbs^{-1}, para los ligados 95.11 µmoles ET gbs^{-1} y el contenido total fue de 116.48 µmoles ET gbs^{-1}. La capacidad antioxidante de *D. tertiolecta* se encontró dentro del rango reportado por Goiris y col [20] quienes evaluaron 32 especies de microalgas, encontrando valores que oscilaron entre 3.30-89.70 µmoles ET gbs^{-1}. Por otro lado, Ahmed y col [21] registraron una capacidad antioxidante de 62.5 µmoles ET gbs^{-1} en extractos acuosos de *D. tertiolecta*, dichos valores son menores a los encontrados en el presente trabajo (116.48 µmoles ET gbs^{-1}). Por otra parte, los resultados obtenidos por el método de ABTS son para el extracto libre 24.41 µmoles ET gbs^{-1}, para el extracto ligado 47.26 µmoles ET gbs^{-1} y el contenido total fue de 71.67 µmoles ET gbs^{-1}. Dichos resultado son comparables al trabajo reportado por Li y col [22] quienes encontraron un rango entre 1.33-29.56 µmoles ET gbs^{-1} analizando 23 especies de microalgas; así como también con el trabajo de Goiris y col [23], quienes evaluaron tres especies de microalgas reportando valores de 15 a 25 µmoles ET gbs^{-1}. Los resultados obtenidos en este estudio (116.48 µmoles ET gbs^{-1}); pueden ser comparados a los reportados para diversas frutas, verduras y leguminosas como: arándano (46 µmoles ET gbs^{-1}) [24], fresa (35.77 µmoles ET gbs^{-1}), espinaca (15.15 µmoles ET gbs^{-1}), frijol pinto (77.79 µmoles ET gbs^{-1}) [25]. Se observó que el método de ORAC presento una mayor capacidad antioxidante esto puede deberse a que el ensayo de ORAC es considerado biológicamente más relevante que ABTS y otros protocolos similares ya que es más útil para extractos con múltiples constituyentes y mecanismos de reacción compleja involucrados [20].

Por otro lado, el contenido de compuestos fenólicos para los extractos libres fue de 0.61 mg EAG gbs^{-1}, para los extractos ligados fue de 1.60 mg EAG gbs^{-1}, y el contenido total de compuestos fenólicos se encontró alrededor de 2.21 mg EAG gbs^{-1}, valores similares fuerón los encontrador por Ahmed y col [21], quienes utilizaron un extracto hexánico de *D. tertiolecta,* obteniendo 3.29 mg EAG/g. También, Goiris y col [23] evaluaron extractos de etanol-agua en 32 especies de microalgas encontrando valores entre 0.54- 3.75 mg EAG gbs^{-1}. Por otra parte, los resultados encontrados en el presente trabajo difieren con lo que obtuvieron Ismaiel y col [26], quienes evaluaron extractos acuosos de 11 especies de microalgas encontrando valores de 0.4-9.69 mg EAG gbs^{-1} ; esta discrepancia en los resultados puede explicarse debido a la naturaleza química de los compuestos que contribuyen a la capacidad antioxidante, a la estructura celular de estas especies y a la polaridad de los solventes utilizados para la extracción de los compuestos [25]. A pesar de que el contenido de compuestos fenólicos en microalgas es bajo en comparación con el rango reportado para algunas plantas terrestres, las microalgas podrían representar una fuente atractiva de este tipo de moléculas debido a sus facilidades de cultivo y procesamiento, asi como por la presencia de ciertos compuestos bioactivos que solo pudieran ser encontrados en este tipo de material [21].

En general, los resultados muestran que el extracto hidrofílico ligado presentó la mayor capacidad antioxidante en ambos métodos analizados (ORAC y ABTS), tendencia similar mostraron los compuestos fenólicos, esto podría deberse al método de extracción utilizado, el cuál pudiera haber liberado y dejado expuestos un mayor número de compuestos, siendo estos los responsables del aumento de la capacidad antioxidante [25].

Tabla 1. Análisis químico proximal de la biomasa residual (BR) de *D. tertioleca*

Composición química	Porcentaje en base seca (%)
Proteínas	34.94 ± 0.85
Lípidos	0.36 ± 0.03
Cenizas	12.38 ± 0.01
Carbohidratos	54.26 ± 0.82

Los valores se representan como el promedio de tres réplicas ± la desviación estándar.

Tabla 2. Capacidad antioxidante y contenido de fenólicos en extractos hidrofílicos etanólicos de la biomasa residual (BR) de *D. tertiolecta*

	Propiedad		
Extracto	ORAC[1]	ABTS[1]	Contenido Fenólicos Totales[2]
Libre	21.37 ± 0.40	24.41 ± 0.48	0.61 ± 0.02
Ligado	95.11 ± 0.81	47.26 ± 0.80	1.60 ± 0.09
Total	116.48 ± 0.58	71.67 ± 0.37	2.21 ± 0.07

Los valores se representan como el promedio de tres réplicas ± la desviación estándar. [1]µmoles equivalentes de Trolox (TE)/g de muestra, bs. [2]mg equivalentes de ácido Gálico/ g de muestra, bs (EAG gbs^{-1}).

CONCLUSIONES

En conclusión, de acuerdo a los resultados de capacidad antioxidante, el extracto hidrofílico ligado muestra los valores más altos de capacidad antioxidante comparados con la extracto hidrofílico libre, similar comportamiento fue el que mostraron los compuestos fenólicos. Los resultados experimentales obtenidos indican que la microalga *D. tertiolecta* representa una fuente natural de compuestos bioactivos de interés, además de ser fuente de proteínas y carbohidratos por lo que se requiere de más investigaciones que den a conocer sus posibles actividades biológicas, así como la elucidación de los compuestos responsables que le proporcionan su actividad antioxidante.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen especialmente a CONACyT y a la Universidad Autónoma de Sinaloa a través del Programa de Fomento y Apoyo a Proyectos de Investigación (UAS, PROFAPI2014/080), por el apoyo económico otorgado para la realización de este proyecto.

REFERENCIAS

[1] Larkum, A.W.D., Ross, I.L., Kruse, O., Hankamer, B. (2011), "Selection, breeding and engineering of microalgae for bioenergy and biofuel production", Trends in Biotechnology, 30(4): 198-205.

[2] Gouveia, L., Marquez, A.E., Sousa, J.M., Moura, P., Bandarra, N.M. (2010), "Microalgae- source of natural bioactive molecules as functional ingredients", Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods, 7(2): 21-37.

[3] Tibbetts, S.M., Milley, J.E., Lail, S.P. (2015), "Chemical composotion and nutrtional properties of freshwater and marine microalgal biomass cultured in photobioreactors", Journal Applied Phycology, 27: 1109-1119.

[4] Santos-Ballardo, D., Font-Segura, X., Sánchez-Ferrer, A., Barrena, R., Rossi, S., Valdez-Ortiz, A. (2015), "Valorisation of biodiesel production wastes: Anaerobic digestion of residual *Tetraselmis suecica* biomass and co.digestion with glycerol", Waste Management and Research, 33(3): 250-257.

[5] Khalifa, A.B. (2013), " B -Carotene production by the marine microalgae Dunaliella tertiolecta and D. salina in batch cultivation", Minia Sicence Bulletín, 24(2): 1-9.

[6] Querellou, J., Borresen, T., Boyen, C., Dodson, A., Höfle, M., Ianora, A., Jaspars, M., Kijjoa, A., Olafsen, J., Rigos, G., Wijffels, R. (2010), "Marine Biotechnology: A New Vision and Strategy for Europe: Marine Board-ESF", European Sicence Foundation, Beemem, Belgium. Marine Board.ESF Position, Paper, no. 15.

[7] Guillard, R.R.L, Ryther, R.J. (1962), "Studies of marine planktonic diatoms. *Cyclotella nana* (Hustedt) and *Detonula confervaceae*(Cleve)", Gran Canadian Journal of Microbiology, 8: 229-239.

[8] Knuckey, R.M., Brown, M.R., Robert ,R., Frampton, D.M.F. (2006), "Production of microalgal concentrates by floculation and their assessment as aqua culture feeds", Aquaculture Engineer, 35: 300-313.

[9] Soto-León, S., Zazueta-Patrón, I.E., Piña-Valdez, P., Nieves-Soto, M., Reyes-Moreno, C., Contreras-Andrade, I. (2014), "Extracción de lípidos de *Tetraselmis suecica*: proceso asistido por ultrasonido y solvents", Revista Mexicana de Ingeniería Química, 13(3): 723.737.

[10] AOAC. (1999), "Official Methods of Analysis", 16 th Edition, Association of Official Analytical Chemistry, Washington DC.

[11] Dewanto, V., Wu, X., Adom, K.K., Liu, R.H. (2002), "Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity", Journal Agriculture Food Chemistry, 50: 3010-3014.

[12] Mora-Rochín, S., Gutiérrez-Uribe, J.A., Serna-Saldívar, S.O., Sánchez-Peña, P., Reyes-Moreno, C., Milán-Carrillo, J. (2010), "Phenolic content and antioxidant activity of tortillas produced from pigmented maize processed by conventional nixtamalization or extrusion cooking", Journal Cereal Science, 52: 502-508.

[13] 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 Agriculture Food Chemistry, 49: 4619-4626.

[14] Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M. (1999) "Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin.Ciocalteu reagent", Methods Enzymology, 299: 152-178.

[15] Kyung, O.K., Jeum, A.K., Ho, S.D., Gyun, C.L., Tae, Y.J., Won, J.L., Yeol, E.L. (2013), "Chemo-enzymatic saccharification and bioethanol fermentation of lipid.extracted residual biomass of the microalga, *Dunaliella tertiolecta*", Bioresoruce Technology, 132:197-201.

[16] Seung-Soo, K., Hoang, V.L., Jinsoo, K., Eun, Y.L., Hee, C.W. (2015), "Pyrolysis of microalgae residual biomass derived from *Dunaliella tertiolecta* after lipid extraction and carbohydrate saccharification", Chemical Engineering Journal, 263: 194-199.

[17] Tibbetss, A.M., Bjornsson, W.J., McGinn, P.J. (2015), "Biochemical composition and amino acid profiles of *Nannochloropsis granulata* algal biomass before and after supercritical fluid CO2 extraction at two processing temperatures", Animal Feed Science and Technology, 204: 62-71.

[18] Becker, E.W. (2013), "Microalgae for human and animal nutrition" En: Richmond A, Hu Q (eds) Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology. (2 ed.). Wiley-Blackwell, Oxford, 461-503.

[19] FAO. (2014), "Manual on the production and use of live fooe for Aquaculture. FAO corporate document repository", Disponible en: http://www.fao.org/docrep/003/w3732E/w3732e07.htm. Revisado el 25 Julio de 2015.

[20] Goiris, K., Muylaert, K., Fraeye, I., Foubert, I., De brabanter, J., De Cooman, L.. (2012), "Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content", Journal Applied Phycology, DOI: 10.1007/s10811-012-9804-6. Revisado 4 Julio 2015.

[21] Ahmed, F., Fanning, K., Netzel, M., Turner, W., Li, Y., Schenk, P.M. (2014), "Profiling of carotenoids and antioxidant capacity of microalgae from subtropical coastal and brackish waters". Food Chemistry, 165: 300-306.

[22] Li, H.B., Cheng, K.W., Wong, C.C., Fan, K.W., Chen, F., Jiang, Y. (2007), "Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae", Food Chemistry, 102: 771-776.

[23] Goiris, K., Coles, W.V., Wilches, I., León-Tamariz, F., De Cooman, L., Muylaert, K. (2015), "Impact of nutrient stress on antioxidant production in three species of microalgae", Algal Research, 7: 51-57.

[24] Prior, R.L., Cao, G., Martin, A., Sofic, E., McEwen, J., O´Brien, C., Lischner, N., Ehlenfeldt, M., Kalt, W., Krewer, J., Mainland, M. (1998), "Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46: 2686-2693.

[25] Floegel, A., Kim, D.O., Chung, S.J., Koo, S.I., Chun, O.K. (2011), "Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods", Journal of Food Composition and Analysis, 24: 1043-1048.

[26] Ismaiel, M.M., El-Ayouty, Y.M., Piercey-Normore, M.D. (2014), "Antioxidants characterization in selected cyanobacteria", Annals of Microbiology, 64: 1223-1230.

ANTIOXIDANT CAPACITY AND CONTENT OF PHENOLIC COMPOUNDS OF THE BIOMASS PRODUCED BY THE MICROALGA *Phaeodactylum tricornutum*

(Capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos de la biomasa producida por la microalga *Phaeodactylum tricornutum*)

Lourdes J. Germán-Báez[b*], Claudia D. Norzagaray-Valenzuela[b], David U. Santos-Ballardo[b], Roberto Gutiérrez-Dorado[a,b], Cuauhtémoc Reyes-Moreno[a,b], Angel Valdez-Ortiza,[b+]

[a] Posgrado en Ciencia y Tecnología de Alimentos, FCQB, Universidad Autónoma de Sinaloa. Ciudad Universitaria, CP. 80300. Culiacán, Sinaloa.
[b] Programa Regional de Posgrado en Biotecnología, FCQB, Universidad Autónoma de Sinaloa. Ciudad Universitaria, CP. 80300. Culiacán, Sinaloa.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: angelvaldezortiz@yahoo.com.mx

Área del conocimiento: Biotecnología Alimentaria

ABSTRACT
Microalgae are efficient eukaryotic organisms which transform solar energy and carbon dioxide (CO_2) into nutrient-rich biomass. Microalgae biomass has been used in diverse areas such as human nutrition, aquaculture and even in effluents treatment, due to the vast high value compounds that synthesize naturally. In this sense, a microalgae has been cultivated commercially is the diatom *Phaeodactylum tricornutum* due to its high capacity generation of biomass rich in several compounds of interest. The objective of this study was to evaluate the antioxidant capacity and the content of phenolic compounds of the total biomass (TB) and residual biomass (RB) (obtained after oil-extraction for biodiesel production) of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. Antioxidant capacity (AOXC) was measured through two assays: ORAC and ABTS. Content of phenolic compounds (PC) was evaluated using the Folin-Ciocalteu method. Total AOXC by ORAC assay were 211.32 and 106.22 µmoles Trolox Equivalent g^{-1} sample (dw) (µmoles gdw^{-1}) for TB and RB, respectively. While ABTS assay showed values of 138.93 and 67.93 µmoles TE gdw^{-1} for TB and RB, respectively. Regarding to the total PC, the results obtained showed values of 9.83 and 2.90 mg gallic acid equivalent g^{-1} sample (dw) for TB and RB, respectively. In conclusion, the RB conserved bioactive compounds which could be employed in different areas such as food, healthcare products and others biofuels.

Keywords: *Phaeodactylum tricornutum*, antioxidant capacity, microalgae biomass, residual biomass.

RESUMEN
Las microalgas son organismos eucariotas los cuales transforman de manera eficiente la energía solar y el dióxido de carbono en biomasa rica en nutrientes. La biomasa de microalgas está siendo utilizada en áreas tan diversas como: nutrición humana, acuicultura e incluso en el tratamiento de aguas residuales, dado que son capaces se sintetizar de manera natural compuestos de alto valor. En este sentido, una microalga que está siendo explotada comercialmente es la diatomea *Phaeodactylum tricornutum*, por su alta capacidad de producir biomasa rica en compuestos de interés. Por tanto, el objetivo de este estudio

fue evaluar la capacidad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos totales de la biomasa total (BT) y la biomasa residual (BR) (obtenida después del proceso de extracción de lípidos para la producción de biodiesel) de la microalga *Phaeodactylum tricornutum.* La capacidad antioxidante (CAOX) fue analizada con la ayuda de dos métodos: ORAC y ABTS; el contenido de compuestos fenólicos totales (CF) fue evaluado utilizando el método Folin-Ciocalteu. La CAOX por el método ORAC fue de 211.32 y 106.22 µmoles equivalentes de Trolox g^{-1} de muestra (bs) para la BT y BR, respectivamente. Mientras que por el método ABTS se obtuvieron valores de 138.93 y 67.93 µmoles equivalentes de Trolox g^{-1} de muestra (bs) para BT y BR, respectivamente. De acuerdo al método de CF, los resultados obtenidos fueron valores de 9.83 y 2.90 mg equivalentes de ácido Gálico g^{-1} de muestra (bs) para BT y BR, respectivamente. En conclusión, la biomasa residual conserva compuestos bioactivos de interés, los cuales podrían ser empleados en diferentes áreas como fuente de alimentos, en productos relacionados con el cuidado de la piel, así como en la elaboración de otros biocombustibles.

Palabras Clave: *Phaeodactylum tricornutum*, capacidad antioxidante, biomasa microalgal, biomasa residual.

INTRODUCCIÓN

Las microalgas son organismos fotosintéticos que transforman muy eficientemente la energía solar, el dióxido de carbono y elementos inorgánicos en biomasa rica en nutrientes, crecen tanto en ambientes salinos como en agua dulce. Se ha estimado que existen 50,000 especies, eucariotas en su mayoría, de las cuáles las clases más abundantes son Cyanophyceae (algas verde-azules), Chlorophyceae (algas verdes), Chrysophyceae (incluye algas doradas) y Bacillarophyceae (incluye las diatomeas) [1, 2]. En general, las microalgas presentan un gran potencial para diversas aplicaciones, en áreas como la nutrición y salud humana, acuicultura, biofertilizantes, en el tratamiento de efluentes, biocombustibles, entre otras ya sea utilizando la biomasa completa o bien aprovechandola para la extracción de compuestos de interés. En años recientes la producción de biodiesel de tercera generación ha tomado gran relevancia, destacando la producción de éste a partir del cultivo de microalgas, siendo la clase Bacillarophyceae, en especial los generos Chaetoceros y Phaeodactylum los más utilizados, destacando este último por sus altas tasas de crecimiento [3]. Por otra parte, la utilización del cultivo de microalgas de manera integral, es una forma de aprovechar todos los recursos éstas ofrecen, ayudando a reducir los costos de procesamiento, lo que representa una estrategia con potencial para aumentar la sustentabilidad de la industria microalgal [4]. En el proceso de extracción de aceite para la producción de biodiesel a partir de microalgas se obtiene un material de desecho llamado biomasa residual (BR), la cual es rica en proteínas y carbohidratos. Dicha biomasa podría ser usada como alimento para animales o en la alimentación humana, así como también por su alto contenido de carbohidratos puede ser potencialmente explotada como materia prima para la producción de bioetanol [5, 6, 7]. En este estudio, se evaluó la capacidad antioxidante y el contenido de compuesto fenólicos de la biomasa microalgal y la biomasa residual (obtenida después de la extracción de aceite para la producción de biodiesel) de la microalga *Phaeodactylum tricornutum.*

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de *Phaeodactylum tricornutum*

Phaeodactylum tricornutum se cultivó utilizando el medio F/2 [8], bajo condiciones controladas: 24 h de luz constante (6000-6500 lux) y temperatura de 24±2 ºC. Las células fueron recolectadas, una vez que el cultivo alcanzó una densidad óptica (DO) = 0.4 (677 nm). El cultivo se cosecho mediante floculación con quitosano [10 mg L^{-1}] / 24 h. Para obtener la biomasa residual se realizó la extracción de aceite utilizando una mezcla de solventes cloroformo y metanol en relación 2:1 (v/v) de acuerdo a la metodología de Soto-León [9]. La biomasa residual fue secada en una estufa de secado con aireación a 40°C, y para obtener la biomasa en polvo se utilizó un molino.

Obtención de fitoquímicos hidrofílico libres y ligados

Los fitoquímicos libres se extrajeron de acuerdo a lo reportado por Dewanto [10] con algunas modificaciones, utilizando etanol al 80% como solvente. El residuo fue empleado para la obtención de los fitoquímicos ligados de acuerdo con Adom y Liu [11]. Los fitoquímicos libres y ligados se reconstituyeron en etanol al 80% y metanol puro, respectivamente, mismos que fueron almacenaron a -20 ºC hasta su análisis. Todas las extracciones se realizaron por triplicado.

Evaluación de la capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante se determinó a los fitoquímicos hidrofílicos tanto libres como ligados, se evaluó usando el ensayo de capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) y el radical ABTS ensayo de decoloración de cationes, usando un lector de Microplacas (Synergy™ HT Multi-Detector, BioTek, Inc., Winooski, VT, USA). Para el ensayo de ORAC los extractos fueron evaluados contra el estándar de Trolox con fluoresceína como lo descrito por Ou [12]. Para el ensayo de ABTS los extractos fueron evaluados con el estándar de Trolox como lo describe Re [13]. Los resultados de los ensayo de ORAC y ABTS fueron expresados como micromoles equivalentes de Trolox (ET) por g de muestra en base seca (µmoles ET gbs^{-1}). Todas las mediciones fueron realizadas por triplicado.

Contenido de compuestos fenólicos totales

Se determinó el contenido de compuestos fenólicos totales en fitoquímicos hidrofílicos tanto libres como ligados, mediante el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu de acuerdo a lo reportado por Singleton [14]. La absorbancia fue medida usando un lector de Microplacas (Synergy™ HT Multi-Detector, BioTek, Inc., Winooski, VT, USA). El contenido de fenólicos totales fue expresado como miligramos equivalentes de ácido gálico por g de muestra en base seca (mg EAG gbs^{-1}). Todas las mediciones fueron realizadas por triplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En cuanto a la capacidad antioxidante y el contenido de fenólicos, los fitoquímicos hidrofílicos ligados mostraron la mayor capacidad antioxidante, así como un mayor contenido de fenólicos totales en comparación con los fitoquímicos libres, mismo comportamiento presentó tanto la biomasa microalgal como la residual.

La capacidad antioxidante para la biomasa microalgal (**Tabla 1)** por el método de ABTS para los fitoquímicos libres y ligados fue de 60.11 y 78.81 µmoles ET gbs^{-1}, y la capacidad antioxidante total de

este método fue de 138.93 µmoles ET gbs^{-1}. En el método de ORAC los valores encontrados para los fitoquímicos hidrofílicos libres fueron de 102.17 µmoles ET gbs^{-1}, para los ligados 109.14 µmoles ET gbs^{-1}, y el contenido total fue de 211.32 µmoles ET gbs^{-1}. El contenido de fenólicos totales de la biomasa microalgal para los fitoquímicos libres y ligados fue de 4.60 y 5.23 mg EAG gbs^{-1}, el contenido total se registró alrededor de 9.83 mg EAG gbs^{-1}. La capacidad antioxidante total de la biomasa residual (**Tabla 2**) por el método de ABTS para los fitoquímicos libres fue de 23.02 µmoles ET gbs^{-1}, para los ligados 44.90 µmoles ET gbs^{-1}, el contenido total fue de 67.93 µmoles ET gbs^{-1}. Por el método de ORAC los fitoquímicos libres se encontraron alrededor de 36.20 µmoles ET gbs^{-1}, los ligados fueron de 70.02 µmoles ET gbs^{-1}, la capacidad antioxidante total por este método fue de 106.22 µmoles ET gbs^{-1}. En cuanto al contenido de fenólicos totales de la biomasa residual para los fitoquímicos libres y ligados fue de 1.10 y 1.79 mg EAG gbs^{-1}, el contenido total fue de 2.90 mg EAG gbs^{-1}. Los resultados en cuanto a capacidad antioxidante por el método de ABTS en ambas biomasas son superiores a lo reportado por Goiris y col [15] y Ryckebosch y col [16], quienes evaluaron extractos etanólicos y lipofílicos de *P. tricornutum,* respectivamente. En cuanto al método de ORAC, los valores encontrados en el presente estudio tanto para biomasa microalgal y biomasa residual son comparables con lo reportado por Ahmed y col [17] quien analizo extractos acuosos de la misma microalga. Diferencias encontradas entre los resultados podrían deberse a la naturaleza química de los solventes utilizados para la extracción de los fitoquímicos. Respecto al contenido de fenólicos totales, resultados observados en biomasa microalgal y residual concuerdan con lo reportado por Tibbets y col [18]; Ismaiel y col [19]; Goiris y col [15], mismos que podrían variar de acuerdo al método y tipo de solvente utilizado en la extracción, tomando en cuenta que los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios o compuestos de estrés que están involucrados en mecanismos de protección química contra diferentes factores de estrés bióticos (bacterias u otros tipos de microorganismos) y abióticos (ej. Radiación UV, contaminación metálica) Connan y Stengel [20], por lo que su concentración podría depender de las condiciones de cultivo a las que sean sometidas las microalgas.

CONCLUSIÓN

Los resultados del presente estudio demuestran que la biomasa residual de *P. tricornutum* conserva compuestos bioactivos de interés. Por lo que la biomasa microalgal de *P. tricornutum,* así como su biomasa residual podrían ser objeto de más estudios para ser empleadas en diferentes áreas tal como alimentos, productos para el cuidado de la salud y en la generación de otros biocombustibles, y con esto aprovechar de manera integral la biomasa microalgal.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen especialmente a CONACyT y a la Universidad Autónoma de Sinaloa a través del Programa de Fomento y Apoyo a Proyectos de Investigación (UAS, PROFAPI2014/080), por el apoyo económico otorgado para la realización de este proyecto.

Tabla 1. Capacidad antioxidante y contenido de fenólicos totales de los extractos etanólicos de la biomasa microalgal de la microalga ***P. tricornutum.***

Propiedad Nutracéutica	Extracto Etanólico
Capacidad Antioxidante	
ABTS[1]	
Fitoquímicos libres	60.11 ± 0.54
Fitoquímicos ligados	78.81 ± 1.09
Total	138.93 ± 1.64[a]
ORAC[1]	
Fitoquímicos libres	102.17 ± 1.47
Fitoquímicos ligados	109.14 ± 1.59
Total	211.32 ± 1.83
Contenido Fenólicos Totales[2]	
Fitoquímicos libres	4.60 ± 0.07
Fitoquímicos ligados	5.23 ± 0.08
Total	9.83 ± 1.32

Los valores representan el promedio de tres replicas ± desviación estándar. [1]µmoles equivalentes de Trolox (TE)/g de muestra, bs. [2]mg equivalentes de ácido Gálico (EAG)/g de muestra, bs.

Tabla 2. Capacidad antioxidante y contenido de fenólicos totales en extractos hidrofílicos etanólicos de la biomasa residual de la microalga ***P. tricornutum***.

Propiedad Nutracéutica	Extracto Etanólico
Capacidad Antioxidante	
ABTS[1]	
Fitoquímicos libres	23.02 ± 0.75
Fitoquímicos ligados	44.90 ± 0.90
Total	67.93 ± 0.36
ORAC[1]	
Fitoquímicos libres	36.20 ± 0.30
Fitoquímicos ligados	70.02 ± 0.62
Total	106.22 ± 0.59
Contenido Fenólicos Totales[2]	
Fitoquímicos libres	1.10 ± 0.04
Fitoquímicos ligados	1.79 ± 0.06
Total	2.90 ± 0.02

Los valores representan el promedio de tres replicas ± desviación estándar. [1]µmoles equivalentes de Trolox (TE)/g de muestra, bs. [2]mg equivalentes de ácido Gálico (EAG)/g de muestra, bs.

REFERENCIAS

[1] Chacón-Lee, T.L., González-Mariño, G.E. (2010), "Microalgae for "Healthy" Foods-Possibilities and Challenges", Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 9: 655-675.

[2] Becker, E.W. (2013), "Microalgae for human and animal nutrition" En: Richmond A, Hu Q (eds) Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology. (2 ed.). Wiley-Blackwell, Oxford, 461-503.

[3] Tibbetts, S.M., Whitney, C.G., MacPherson, M.J., Bhatti, S., Banskota, A.H., Stefanova, R., McGinn, P.J. (2014), "Biochemical characterization of microalgal biomass from freshwater species isolated in Alberta, Canada for animal feed applications", Algal Research. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2014.11.011. Revisado 30 Junio 2015.

[4] Atienza-Martínez, M., Fonts, I., Lázaro, L., Ceamanos, G. (2015), "Fast pyrolysis of torrefied sewage sludge in a fluidized bed reactos", Chemistry Engineering Journal, 259: 467-480.

[5] Raposo, J.M.F., Santos, C.M., Bernando, A.M. (2013), "Health applications of bioactive compounds from marine microalgae", Life Sciences, 93: 479-486.

[6] Subhadra, B., Grison, G. (2010), "Algal biorefinery-based industry: and approach to address fuel and food insecurity for a carbón-smart world", Journal Science Food Agriculture, 91: 2-13.

[7] Egardt, J., Lie, O., Aulie, J., Myhre, P. (2012), "Microalgae, a market analysis carried out as part of the Interreg KASK IVA Project: Blue Biotechnology for sustainable innovations Blue Bio", Blue Bio, 82, Revisado en: http://www.bluebio.org/. Consultado: 1 Julio de 2015.

[8] Guillard, R.R.L, Ryther, R.J. (1962), "Studies of marine planktonic diatoms. *Cyclotella nana* (Hustedt) and *Detonula confervaceae*(Cleve)", Gran Canadian Journal of Microbiology, 8: 229-239.

[9] Soto-León, S., Zazueta-Patrón, I.E., Piña-Valdez, P., Nieves-Soto, M., Reyes-Moreno, C., Contreras-Andrade, I. (2014), "Extracción de lípidos de *Tetraselmis suecica*: proceso asistido por ultrasonido y solvents", Revista Mexicana de Ingeniería Química, 13(3): 723.737.

[10] Dewanto, V., Wu, X., Adom, K.K., Liu, R.H. (2002), "Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity", Journal Agriculture Food Chemistry, 50: 3010-3014.

[11] Adom, K.K., Liu, R.H. (2002), "Antioxidant activity of grains", Journal Agriculture Food Chemistry, 50: 6182-6187.

[12] 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 Agriculture Food Chemistry, 49: 4619-4626.

[13] Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pnnala A., Yang M., Rice-Evans C. (1999), "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cationdecolorization assay", Free Radical Biology and Medicine, 26: 1231-1237.

[14] Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M. (1999) "Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin.Ciocalteu reagent", Methods Enzymology, 299: 152-178.

[15] Goiris, K., Coles, W.V., Wilches, I., León-Tamariz, F., De Cooman, L., Muylaert, K. (2015), "Impact of nutrient stress on antioxidant production in three species of microalgae", Algal Research, 7: 51-57.

[16] Ryckebosch, E., Bruneel, C., Termote-Verhalle, R., Goiris, K., Muylaert, K., Imogen, F. (2014), "Nutritional evaluation of microalgae oils rich in omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids as an alternative for fish oil", Food Chemistry,160: 393–400

[17] Ahmed, F., Fanning, K., Netzel, M., Turner, W., Li, Y., Schenk, P.M. (2014), "Profiling of carotenoids and antioxidant capacity of microalgae from subtropical coastal and brackish waters". Food Chemistry, 165: 300-306.

[18] Tibbetts, S.M., Milley, J., Lall, S. (2015), "Chemical composition and nutritional properties of freshwater and marine microalgal biomass cultured in photobioreactors", Journal Applied Phycology, 27: 1109-119.

[19] Ismaiel, M.M., El-Ayouty, Y.M., Piercey-Normore, M.D. (2014), "Antioxidants characterization in selected cyanobacteria", Annals of Microbiology, 64: 1223-1230.

[20] Connan, S., Stengel, D.B., Popper, Z.A. (2011), "Algal chemodiversity and bioactivito: Sources of natural variabilita and implicaitons for commercial application", Marine Biotechnology in Europe, 29(5): 483-501.

IMPORTANCE OF CHIA SEED (*Salvia hispanica*) AS TRIGLYCERIDE LOWERING NUTRACEUTICAL

Importancia de la semilla de la chia (*Salvia hispanica)* como nutracéutico la disminución de triglicéridos

Jaime Tonatiuh Nava- Del Real[a]*, Luz Adriana Vizcaíno Rodríguez[a], Alejandro Brena-Becerril [a+]

[a] Ingeniería en Biotecnología de la Universidad Politécnica de la Zona Metropolitana de Guadalajara, Departamento de Biotecnología Jal. Mex. *jaime200794@gmail.com

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: abrena2012upzmg@mail.com

Área del Conocimiento: Biotecnología Alimentaria.

ABSTRACT
At present, the increase in calls metabolic diseases or metabolic syndrome contributing to have become more important, not only with respect to human health, but also the economy, work, personal aesthetics, mobility, self-esteem, etc. It is not a minor problem that Mexico occupies the first in the world in child and adult obesity, and it is no coincidence that we are the main consumers of soft drinks, sweets and refined flour "junk". Etc. This makes it necessary to turn their eyes to natural foods and nutraceuticals called and therefore born and developed areas of research in nutrigenomics, pharmacogenomics, or relationship to individual reactions and the various human populations. Among these foods today stands Chia (*Salvia hispanica*), the seed molecules attributed to decreasing blood triglycerides, excess fat, has been shown to induce intake body weight loss and glucose Blood improving cardiovascular risk factors in type 2 diabetes is a plant native to Mesoamerica, used as food and medicine since pre-Columbian times, it is believed to have been the third in economic importance. This work began the bioinformatics and phylogenetic analysis of the gene with biotechnological technology could be modified to improve the absorption of triglycerides, for this search programs NCBI were used to obtain a collection of sequences and perform sequence alignment was used Clustalx and refining Bioedit with which a phylogenetic tree was obtained and this could find similarities between tree species was published in Mega 4 is expected to find other species and genes that help us in combating metabolic diseases.

Keywords: Salvia Hispanic, triglycerides, nutraceutical, food and bioinformatics.

MICROPLATE ASSAY FOR QUANTITATION OF NEUTRAL LIPIDS IN EXTRACTS FROM *Nannochloropsis salina*

(Ensayo de microplaca con rojo de Nilo para la cuantificación de lípidos neutros en extractos de *Nannochloropsis salina*)

Deyla Azucena Barranco Montesinos[a*+], Annaliese K. Franz[b], Andrew Burch [b], Juan Rodríguez Ramírez [a]

[a] Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Oaxaca, Instituto Politécnico Nacional, Hornos 1003 Colonia Noche Buena, Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca de Juárez, Oaxaca, C.P. 71230, México.
[b] Departamento de Química, Universidad de California Davis, One Shields Ave, Davis, CA 95616, USA.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: deylabarranco@gmail.com

Área del conocimiento: Biotecnología alimentaria

ABSTRACT
Multiple methods have been used to quantify microalgal lipids, including gravimetric methods, thin layer chromatography, gas chromatography and mass spectrometry, however this methods requires a fairly large sample size, can be expensive and time-consuming. Furthermore, some assays measures all material extracted by the organic solvent, not just neutral lipids. In contrast to total crude lipid, neutral lipids are of particular interest for biodiesel production and nutrition applications. Nile red is a lipophilic dye that has frequently been used to assess relative lipid levels in various strains of algae, yeast, fungi, and mammalian cells. The aim of this study was to test a microplate assay that uses Nile red dye to quantify neutral lipids that have been extracted from *Nannochloropsis salina.* Three different solvent mixtures (chloroform/methanol, hexane/isopropanol and 2-ethoxyethanol) were also tested for lipid extraction. The method was then compared with lipid levels determined by gravimetric analyses. In both methods, the higher lipid yields were found when 2-ethoxyethanol was used for the lipid extraction. The Nile red assay was found to be a viable approach for quantifying neutral lipids in extracts from *Nannochloropsis salina.* It was a rapid assay to quantify lipids compared with gravimetric lipid assay.

Keywords: *Nannochloropsis salina*, Neutral lipid assay, Nile red, Microalgal lipids.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

COMPARATIVE ANALYSIS OF AGAVE INULIN AND OTHER PREBIOTICS ON GROWTH OF DIFFERENT *Bifidobacterium* AND *Lactobacillus* STRAINS

(Análisis comparativo del efecto de la inulina de agave y otros prebióticos sobre el crecimiento de diferentes cepas de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*)

Emmanuel Ulíbarri Navarro[a*], Marcela De la Mora Amutio[a], Julia Del Carmen Martínez-Rodríguez[a+], TetsuyaOgura[a]

[a] Laboratorio 311, Departamento de Química, Instituto de Ciencias Exactas y Terrestres (ICET), Universidad Autónoma de Guadalajara (UAG), Av. Patria 1201, Col. Lomas del Valle, CP 45129, Zapopan, Jalisco, México.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: juliam@edu.uag.mx

Área del Conocimiento: Biotecnología Alimentaria.

ABSTRACT.
Non-digestible oligosaccharides possess important physiological properties, and are claimed to behave as prebiotics. Prebiotics function as proliferation and growth promoters in specific microorganisms known as probiotics for the improvement of intestinal microbiota, giving health benefits to the host if given in appropriate amounts. Fibers such as inulin, including agave inulin, are considered prebiotics by excellence, mainly because human gut is incapable of their hydrolyzation so they need enzymes from bacteria to catalyze the rupture into prebiotics molecules. The aim of this work is to evaluate and compare five different prebiotics (chicory inulin, synthetic inulin, agave inulin, Nutriose and Modified dextrin) with different *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* species with probiotic activity. The *Bifidobacterium* strains were all cultivated in selective BFM medium in anaerobic conditions and growth was assessed by Optic Density at 600 nm (OD_{600}) to determine bacterial growth. The results obtained show agave inulin presents prebiotic properties for *Bifidobacterium* as other inulins but with the advantage of its solubility making it a better candidate for industrial applications. Modified dextrin, although claimed as a prebiotic did not promoted growth of any of the *Bifidobacterium* strains tested, implying this kind of bacteria does not have the required enzymes to hydrolyze this compound.

Keywords: prebiotic; probiotic; *Bifidobacterium*; agave inulin.

GENE EXPRESSION tph-1 IN CELL ENTERIC FROM MOUSE, BY ADMINISTERING DIETARY FIBER FROM BLACKBERRY, *Rubus fruticosus*.

(Expresión relativa del gen tph-1 en células entéricas de ratón, por la administración de fibra dietética de *Rubus fruticosus*).

Rafael Ortiz-Alvarado[a+], Itzirherhi Carol Molina-Cuadros[b*], Carmen Víctor Meza [a].

[a] Cuerpo Académico de Fisiopatologías- 211 de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Facultad de Químico Farmacobiología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
[b] Facultad de Quimico Farmacobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: rortizalvarado@gmail.com

Área del Conocimiento: Functional foods (Alimentos Funcionales).

ABSTRACT
Serotonin plays multiple functions in organisms including regulation of intestinal functions, serotonin is synthesized by the enzyme tryptophan hydroxylase (TPH), which has two isoforms TPH-1 and TPH-2, the TPH-1 is expressed in cells small bowel enterochromaffin mammals, the enzyme TPH-1 is encoded by the tph-1 gene. Dietary fiber promotes bowel function, but so far there is no evidence of the involvement of dietary fiber and induction of gene messenger RNA enzyme like TPH-1, so that the work aims to establish the expression ratio tph-1 gene coding for the receptor to butyrate concentration and dietary fiber from the fruit blackberry, as a fiber source. Evidence that dietary fiber from *Rubus fruticosus* at a concentration of 10% is an alternative for the induction of mRNA of tph-1 gene intestinal level in mouse C57BL / J6 strain shown mammals. Therefore puts the dietary fiber of this fruit as a novel alternative as food derived from the fruits that are not sold in fresh for export. It was determined that after 14 days of administration of dietary fiber *R. fruticosus* at a concentration of 10% the maximum expression of mRNA gene tph-1 in mouse colon intestine of the C57BL / 6 strain is achieved.

Keyword: Serotonin, TPH, Dietary fiber, GPR-43, Ffar-2.

Grant support: Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH proyecto 2014-2015 y Proyecto de Fortalecimiento de cuerpos académicos (PRODEP) proyecto IDCA 9305, CLAVE UMNSH-CA-211.

MAP FOR OBTAINING NUTRACEUTICALS FROM SPECIES OF THE GENUS *Rubus spp .* AND RELATIONSHIP IN THE PREVENTION OF CHRONIC DISEASES

(Mapa de ruta para la obtención de nutraceuticos de las especies del genero *Rubus spp*. y su relación en la prevención de enfermedades crónicas)

Rafael Ortiz Alvarado[a+], Alvaro[a] Rodríguez-Barron, José Silva-Avalos [b*]

[a]Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Cuerpo Académico-211 de Fisiopatologias. Morelia, Michoacán, México. Calle Tzintzuntzan 173 Colonia Matamoros. Morelia, Michoacan, México.C.P. 58240.
[b] Facultad de Químico Farmacobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: rortizalvarado@gmail.com

Área del Conocimiento: Biotecnología Alimentaria.

ABSTRACT
Mexico is positioned as an emerging economy, where the population attends public health problems arising from the implementation of this economic model, large amounts of calories and low nutritional quality, and there are economic niches that set the tone worldwide in production and distribution of food, but with repercussions on regional economies and in agricultural societies, where Mexico has changed since the twentieth century to the current century (from an agricultural society to a society steeped in world markets, with the opening and release of sectors including food processing, signing FTAs). In this paper we described the roadmap that has been implemented through Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo with the link between producers and the called Zarzamich. S.P.R.L. from Ziracuaretiro, Michoacán, which has helped develop the different methods they have achieved and characterized chemically to the nutritional compounds with high added value in the food industry (nutraceuticals), derived from the fruits of the genus *Rubus spp*., that do not meet export quality. Thereby generating data that enable diversification in the production from fatty acid polyunsaturated and dietary fiber, and not only, of a primary industry also allows to raise an emerging nutraceutical extraction industry, which can be exploited in the pharmaceutical industry for the prevention of degenerative diseases, all this as a strategic part in the production and processing of red fruits produced in Michoacan.

Keyword: Functionals foods, *Rubus spp*. Chronic Diseases.

Grant support: Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH proyecto 2014-2015 y Proyecto de Fortalecimiento de cuerpos académicos (PRODEP) proyecto IDCA 9305, CLAVE UMNSH-CA-211.

COMPARATIVE STUDY BETWEEN ULTRA-HIGH PRESSURE HOMOGENIZATION AND PASTEURIZATION TREATMENTS OF ALMOND MILK AND AGAVE FRUCTANS FUNCTIONAL BEVERAGE

(Estudio comparativo entre la homogeneización a ultra-alta presión y la pasteurización de una bebida funcional a base de la leche de almendra y fructanos de agave)

Mayvi Nallely Chico-Castillo*[a], Blanca Flor Figueroa[a], Alejandra Sánchez-Quiroz[a]; Francisco Javier Perez Martínez[b], Rogelio Ramírez-Prado[b]; Ángela Suárez-Jacobo[a+].

[a]Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A. C. (CIATEJ)-Unidad Noreste- Tecnología Alimentaria. Vía de Innovación 404. Parque de Investigación e Innovación Tecnológica. Apodaca, Nuevo León, México. C.P. 66600
[b]Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A. C. (CIATEJ)-Unidad Zapopan. Tecnología Alimentaria. Camino Arenero 1227, El Bajío del Arenal, Zapopan, Jalisco, C.P. 45019

**** Chico-Castillo, Mayvi Nallely***

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: asuarez@ciatej.mx; angelasj_12@yahoo.com.mx

Área del Conocimiento: Biotecnología Alimentaria.

ABSTRACT
Ultra-high pressure homogenization treatment (UHPH) has become an emerging technology for food preservation free of additives. Some research works have indicated that the UHPH can get microbiologically safe and stable quality products preserved with features such as color and taste. Functional beverage consumption worldwide has experienced a marked increase in the last decade due to the positive impact on human health. The heat treatment has been the preservation method most commonly used in the food industry however, has been observed that this can adversely affect the nutritional and sensory qualities of the product. In this research, the effect of ultra-high pressure homogenization (UHPH) to 200 MPa at 1, 3 and 5 passes in combination with temperature (45 °C) were studied in functional drink made of almond milk and agave fructans. Functional beverage treated with UHPH was compared to an untreated sample and pasteurized functional drink (90 °C, 2 min). After treatment, the samples were stored at 4 °C. Microbiological analysis (total count of aerobic mesophilic bacteria, lactic acid bacteria and enterobacteriaceae), physical measurements and color stability were performed immediately after treatments. UHPH-treated functional beverage presented a significant microbiological reduction compared to the pasteurized sample. Furthermore, during storage, increased physical stability of the sample treated by UHPH to 3 and 5 passes compared to pasteurized sample was observed. This research could be considered as a guideline to influence the development of the next generation of functional foods and perhaps can open doors to new functional products available for Mexican consumers.

Keywords: almond milk, agave fructans, ultra-high pressure homogenization, functional beverage.

INNOVATIVE PROCESS TO OBTAIN A RED-PURPLE PRICKLY PEAR-BASED FUNCTIONAL BEVERAGE STABILIZED BY ULTRA-HIGH PRESSURE HOMOGENIZATION

(Desarrollo de un proceso innovador para la obtención de una bebida funcional a base de tuna estabilizada por homogeneización a alta presión)

Ángela Suárez-Jacobo[a+], Alejandra Sánchez-Quiroz[a*], Jorge Alberto García-Fajardo[a].

[a]Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A. C. (CIATEJ)-Unidad Noreste-Tecnología Alimentaria. Vía de Innovación 404. Parque de Investigación e Innovación Tecnológica. Apodaca, Nuevo León, México. C.P. 66600

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: asuarez@ciatej.mx; angelasj_12@yahoo.com.mx

Área del Conocimiento: Biotecnología Alimentaria.

SUMMARY:
Mexico is the largest producer of prickly pear in the world, coming to cover up to 45% of total production from 2006 to 2010. Due to the abundant production of prickly pear (*Opuntia spp.),* there is a greatest potential to expand its market to different areas least supplied. Prickly pear is not only able to feed, but also provides various bioactive compounds that are needed in treating some diseases, which can be exploited by developing new products and process. It is also important to have technological developments to give added value through proper preservation and facilitate their acquisition throughout the year. Currently, the technology to produce functional beverages using ultra-high pressure homogenization (UHPH) is being investigated in the food industry. The beverage was submitted to different treatments: pasteurization (85 ° C for 5 minutes) an UHPH-treated (100 and 200 MPa). Later, physicochemical analysis (pH, soluble solids, density, and color) and microbiological analysis (mesophilic aerobic, lactic acid bacteria, enterobacteriaceae, mold and yeasts) were performed. When a red-purple prickly pear-base functional beverage was UHPH-treated above 200 MPa, it proved to be microbiologically and physicochemically (pH, soluble solids, and color) stable. In addition, it was observed that the functional beverage preserved the quality characteristics at refrigeration temperature (4 °C). Finally, it is important to have a technology able to increase the commercial value in this product, at the same time that reflects the necessity to increase the production and productivity of such a crop in the primary sector.

Keywords: prickly pear, ultra-high pressure homogenization, functional beverage.



FEASABILITY OF THE PRODUCTION OF NUTRACEUTICS BY ENZYMATIC ACYLATION

(Viabilidad de la producción de nutraceuticos por acilación enzimática)

Leticia Casas-Godo[a*], Laura E. Cerón-Modragón [a], Javier Arrizon[a], Daniel Arrieta[b], Francisco J.P lou[c], Georgina Sandoval[a+*]

[a] Unidad de Biotecnología Industrial, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ), 44270 Guadalajara, México
[b] Centro de Nanociencias y Micro y Nanotecnología del Instituto Politécnico Nacional, México D.F., México.
[c]Instituto de Catálisis y Petroleoquímica, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), 28049 Madrid, Spain.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: gsandoval@ciatej.mx/gsandoval@confluencia.net

Área del Conocimiento: Alimentos funcionales

ABSTRACT
Nutraceutics are functional molecules that have medical or health benefits and can be used in the preventions and treatment of diseases. Due to their properties carbohydrate fatty acid esters (CFAE) can be considered nutraceutics. The CFAE are non-ionic surfactants with a broad spectrum of applications. CFAE can be obtained by enzymatic acylation using lipases and proteases. The objective of this study was to produce CFAE using a model reaction between 1-kestose and an acyl donor by lipase-catalyzed acylation. The synthesis of acylated kestose was tested with four commercial immobilized lipases. With the most efficient enzyme CFAE were significantly detected in the organic phase after 24 hours. Due to the lack of standards for these molecules, a mass analysis was carried out. After acylation the adduct peaks (m/z) showed a molecular mass shift between 183 and 366 g/mol which indicated that the CFAE obtained were mono- and diacylated. Carbohydrate fatty acid esters (CFAE) have multiple industrial applications. A commercial lipase was used for the synthesis of esters using kestose and obtaining mono and di-acylated esters. From the results obtained in this model reaction, more research is being carried out using a more complex mixture of sugars.

Key words: Nutreaceutics, kestose, acylation, enzymes.

ISOLATION OF *Aeromonas* spp. IN FRESH FISH SAMPLES MARKETED IN PAMPLONA (NORTE DE SANTANDER)

(Aislamiento de *Aeromonas* spp., en muestras de pescado fresco comercializado en Pamplona, Norte de Santander)

William Hernando Suarez Quintana [a*+], Fanny Consuelo Herrera Arias[b].

[a] Microbiólogo con Énfasis en Alimentos, M.Sc. en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad de Pamplona. Docente Ocasional. Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Básicas. e-mail: aquifex3@hotmail.com
[b] Ph.D. Universidad de Pamplona. Docente asociado. Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Básicas. e-mail: fannyh@unipamplona.edu.co Grupo de Investigación en Microbiología y Biotecnología (GIMBIO). Ciudad Universitaria. Pamplona Norte de Santander. Colombia. Universidad de Pamplona

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: aquifex3@hotmail.com

Área del Conocimiento: Microbiología General y Aplicada/Biotecnología alimentaria.

ABSTRACT
Members of the genus *Aeromonas* are recognized agents of diseases in humans, which can cause a variety of gastroenteritis and extraintestinal processes, this bacteria is acquired primarily through consumption of waterborne food such as fish, seafood and drinking water. In order to determine the presence of *Aeromonas* in fish samples marketed in Pamplona (Norte de Santander), there were analyzed a total of 51 fresh fish samples: Catfish (*Brachyplatistoma* spp.), Trout (*Oncorhynchus mykiss*), Tilapia (*Oreochromis* spp.), Rampuche (*Pimelodus navarroi*), Bocachico (*Prochilodus magdalenae*), Dorada (*Brachyplatystoma flavicans*) and Sierra (*Pristis pectinata*); additionally, it was compared the traditional biochemical identification of the strains with the miniaturized Microbact™ kit. In 37 samples corresponding to 76.47 %, it was confirmed the growth of *Aeromonas* spp. The results showed that the highest prevalence of *Aeromonas* spp. appeared in: Trout 100% and Rampuche 100%, Dorada 80%, Catfish 73.33%, Bocachico 60%, Sierra 60% and Tilapia 50%. By using the Microbact™, 87% of the strains corresponded to *A. hydrophila*, *A. caviae* 8%, A. *veronii veronii* 2% and *Plesiomonas shigelloides* 2%. The high percentage of isolation of *Aeromonas* strains in the samples indicates that the fish commercialized in Pamplona can be an important vehicle for this microorganism, considered emergent pathogen for humans.

Keywords: Aeromonas, fish, Microbact, emergent bacteria

RESUMEN

Miembros del género *Aeromonas* son reconocidos agentes de enfermedades de anfibios, reptiles y peces y también patógenos para el hombre, pudiendo ocasionar una gran variedad de procesos

extraintestinales así como gastroenteritis; esta bacteria se adquiere principalmente por el consumo de alimentos de origen acuático como pescado, mariscos y agua de bebida. Con el fin de determinar la presencia de *Aeromonas* en muestras de pescado comercializado en la Ciudad de Pamplona (Norte de Santander), se analizaron un total de 51 muestras correspondientes a bagre (*Brachyplatistoma* spp.), trucha (*Oncorhynchus mykiss*), mojarra (*Oreochromis* spp.), rampuche (*Pimelodus navarroi*), bocachico (*Prochilodus magdalenae*), dorada (*Brachyplatystoma flavicans*) y sierra (*Pristis pectinata)*; adicionalmente se comparó la identificación bioquímica tradicional de las cepas de *Aeromonas* con el kit miniaturizado Microbact™. En 39 muestras correspondientes, al 76,47%, se confirmó el crecimiento de *Aeromonas* spp. Los resultados mostraron, que el mayor nivel de prevalencia de *Aeromonas* spp., se presentó en trucha 100% y en rampuche 100%, seguida por dorada 80%, bagre 73,33%, bocachico 60%, sierra 60% y mojarra 50%. Al usar el kit Microbact™, el 87% de las cepas correspondió a *A. hydrophila*, el 8% a *A. caviae*, el 2% a *A. veronni bio veronni* y el 2% a *Plesiomonas shigelloides*. El elevado porcentaje de aislamiento de cepas de *Aeromonas* en las muestras indica que el pescado comercializado en Pamplona puede ser vehículo importante para este microorganismo, considerado patógeno emergente para el hombre.

Palabras Clave: *Aeromonas*, bacterias emergentes, Microbact, pescado.

INTRODUCCIÓN

El pescado y los productos de la pesca son una fuente muy importante de nutrientes, especialmente, de proteína para el hombre; sin embargo, estos alimentos pueden ser fuente de enfermedades, al ser vehículo de patógenos humanos, entre ellos, bacterias emergentes de origen acuático, como *Aeromonas* [1,2]. El género *Aeromonas* está conformado por bacilos Gramnegativos, oxidasa-positivos y anaerobios facultativos; en la actualidad incluye 30 especies y 12 subespecies, con la reciente inclusión de *A. tecta* [3]. *A. hydrophila*, *A. veronii sobria*, *A. caviae*, *A. jandaei*, *A. schubertii* y *A. trota*, son las especies frecuentemente aisladas de muestras clínicas [4,5]; mientras que todas estas especies se han aislado a partir de muestras fecales, *A. hydrophila*, *A. veronii sobria* y *A. caviae* se asocian, habitualmente, con gastroenteritis [3, 6]. El papel de *Aeromonas* spp., como agente causal de gastroenteritis es debatible, debido a la baja incidencia de grandes brotes epidémicos reportados y a la carencia de un modelo animal adecuado; no obstante, datos epidemiológicos ponen de manifiesto su notable participación en patologías gastrointestinales, llegando a ser en España el tercer agente bacteriano, productor de gastroenteritis [7]. *Aeromonas* es una bacteria que se aísla con gran asiduidad en pacientes con diarrea [5, 8,]. Bravo *et al*., analizando muestras de heces de pacientes con Enfermedad Diarreica Aguda (EDA) en Cuba, aislaron cepas de *A. caviae*, en el 33% y de *A. hydrophila*, en el 29%, de las muestras en las que se logró la identificación hasta especie de las cepas [9]. En Venezuela, se lograron aislar cepas de *Aeromonas* en el 12,5% de heces de pacientes con EDA, siendo las especies recuperadas *A. caviae, A. hydrophila* y *A. sobria* [10]. En Rusia, más del 8,1% de los casos de EDA fueron ocasionados por *Aeromonas*, consiguiendo aislar las mismas cepas de los pacientes en el agua y en pescado de la región [11]. En México, *Aeromonas* es una de las bacterias más usualmente involucradas en los episodios de diarrea [12].

Se ha relacionado a *Aeromonas* como causante de enfermedades de origen alimentario en el hombre [11,13]. El hombre, se expone a esta bacteria por el consumo de pescado o de derivados

insuficientemente cocidos, o por contaminación cruzada con otros alimentos, agua o materias primas, o por manipulación no higiénica de los alimentos [14,15,16]; es importante mencionar que, aunque se considera a *Aeromonas* como una bacteria termosensible, algunas toxinas pueden resistir tratamientos de 56ºC durante 10 min [13,14]; además, la gran mayoría de cepas ambientales de *Aeromonas* son psicrotróficas, de tal manera que pueden crecer a temperaturas de refrigeración, aumentando el peligro de contaminación por esta bacteria [11].

En todo el mundo existen muchos reportes acerca de la presencia de *Aeromonas* en pescado. Salgado-Miranda *et al*., analizando trucha procedente de piscifactorías en México, indicaron que *Aeromonas* fue la bacteria más frecuentemente aislada [17]; Silva *et a*l., recuperaron *Aeromonas* en el 50% de muestras de pescado procedentes de un Mercado en Sao Paulo, Brasil [1]; Vivekanandhan *et al*., aislaron *Aeromonas* en el 33,58% de muestras de pescado comercializado en India [18]; Abrahim *et al*., aislaron *Aeromonas* a partir de pescado expendido en Grecia en el 65% de las muestras [19]; Morales *et al*., detectaron *Aeromonas* a partir del 98% de las tilapias evaluadas en Costa Rica [20]; Newaj-fyzul *et al*., identificaron *Aeromonas* en el 44% de muestras de tilapia en Trinidad y Tobago [15]; y Ullman *et al*., analizaron muestras de pescado y derivados en Berlín (Alemania), logrando detectar la presencia de *Aeromonas* en el 32,1% de las muestras [21]; sin embargo, en la revisión realizada, no existen datos relacionados con el aislamiento de *Aeromonas* en pescado en Colombia.

Los objetivos del presente trabajo fueron conocer la prevalencia de *Aeromonas* spp., en muestras de pescado comercializado en la plaza de mercado de la Ciudad de Pamplona (Norte de Santander) y comparar la caracterización bioquímica tradicional de las cepas aisladas, con el método miniaturizado Microbact™.

METODOLOGIA

Número de muestras: Se realizó una encuesta, aplicando un muestreo para proporciones, con el fin de determinar qué tan frecuente es el consumo de pescado en la ciudad de Pamplona. Los resultados revelaron que del total de la población entrevistada, correspondiente a 256 personas, 163 consumen pescado y, de ellas, 73 lo adquieren en la plaza de mercado de la ciudad, 35 en supermercados, 40 en ventas callejeras y 15 en ventas detalladas. Teniendo en cuenta que la gran mayoría de las personas compran el pescado en la plaza de mercado, se decidió muestrear el pescado expendido en este lugar. Con base en el dato de 73 personas, se aplicó un muestreo para proporciones, con un nivel de confianza del 95%, error del 7,4% y aplicando la fórmula del muestreo para proporciones con población finita, el resultado fue de 51 muestras.

Muestras: Se analizaron las siguientes especies de pescado: bagre (*Brachyplatistoma* spp.), 15; trucha (*Oncorhynchus mykiss*), nueve; mojarra (*Oreochromis* spp.), seis; rampuche (*Pimelodus navarroi*), seis; bocachico (*Prochilodus magdalenae*), cinco; dorada (*Brachyplatystoma flavicans*), cinco y sierra (*Pristis pectinata*), cinco. Estas especies de pescado fueron seleccionadas, debido a la preferencia que reflejaron los consumidores en la encuesta. Los pescados, se hallaban refrigerados al momento del muestreo y procedían, principalmente, de los ríos Magdalena y Orinoco y de piscifactorías de la Provincia de Pamplona. Se tomaron 100g de cada muestra que fueron trasladadas al laboratorio en bolsas estériles, en nevera portátil y fueron analizadas, de manera inmediata, después de su recolección.

Aislamiento primario Aeromonas spp.: Se realizó un preenriquecimiento en agua peptona alcalina (APA); se pesaron, asépticamente, 25g de la muestra y se homogenizaron en 225 ml de agua peptona

alcalina APA; se incubó a 30^{0}C por 24 horas. Se inoculó una asada de cultivo, a partir del pre-enriquecimiento, usando el Agar Base Rojo de fenol, adicionado de Almidón (10%) y Ampicilina (10mg/L); se incubaron a 30ºC durante 24 horas [22]. Para la identificación, se tuvieron en cuenta las colonias amarillas rodeadas de un halo de aclaramiento, aparecido después de adicionar unas gotas de lugol sobre las mismas; luego, se pasaron a caldo infusión cerebro corazón BHI, más glicerol 30%, para su conservación.

Identificación preliminar de *Aeromonas* spp.: A partir de las cepas almacenadas en glicerol, se tomaron 20 µL y se inocularon en Agar Base Rojo de fenol, incubando a 30ºC por 18 horas, comprobando la pureza. Después, las colonias típicas fueron sembradas en Agar Nutritivo para realizar las pruebas de tinción de Gram; actividad citocromo-c-oxidasa; actividad catalasa; oxidación-fermentación de la glucosa.

Pruebas para la identificación bioquímica tradicional de *Aeromonas* spp.: Las cepas que fueron bacilos Gram negativos, oxidasa y catalasa positivas y fermentadoras, se transfirieron a Agar Nutritivo y se les continuó realizando las siguientes pruebas: Resistencia al agente vibriostático O-129; sulfuro Indol Movilidad; hidrólisis de la esculina; producción de gas a partir de la D-glucosa; test del rojo de metilo-Voges-Proskaüer; descarboxilación de L-lisina y L-ornitina e hidrólisis de la L-arginina; producción de ácido a partir de D-manitol, Salicina, L-arabinosa, Inositol y Sacarosa; prueba de gelatina e hidrólisis del almidón, siguiendo protocolos tradicionales en cada caso.

Identificación de cepas de *Aeromonas* spp., mediante Microbact™ 24E: El Microbact™ 24E es un kit miniaturizado de pruebas bioquímicas que permite identificar bacilos aerobios y anaerobios facultativos Gram negativos, entre ellos, *Aeromonas*. Con el fin de comparar la identificación bioquímica tradicional con este kit rápido, a partir de las cepas almacenadas en glicerol, se tomaron 20µL y se inocularon en Agar Base Rojo de fenol, incubando a 30ºC por 18 horas, con el propósito de comprobar la pureza del cultivo. Después, las colonias típicas fueron sembradas en Agar Nutritivo e incubadas a 30°C por 18 horas; a partir de este cultivo, se inoculó la prueba, siguiendo las instrucciones del fabricante e incubando a 30ºC durante 18-24 horas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En 39 muestras analizadas, correspondiente al 76,47%, se confirmó el crecimiento de *Aeromonas* spp. Teniendo como base los lineamientos establecidos por Abbott *et al.,* [23] en cuanto a la adscripción a especie de *Aeromonas*, se encontró que las especies de *Aeromonas* correspondían, principalmente, a *A. hydrophila* (29,7%) y *A. veronii sobria* (19,1%), seguidas de *A. jandaei y A. veronii veronii* (17*%), A. popoffii* (6,4%), *A. caviae/A. media* (4,3%), *A. eucrenophila* (4,3%) y, finalmente, *A. schubertii*, con una prevalencia del 2,1%. Mediante el empleo del kit miniaturizado Microbact™ 24E, se halló que el 87% de las cepas correspondía a *A. hydrophila*; el 8% a *A. caviae*; el 2% a *A. veronii veronii*; y el 2% a *Plesiomonas shigelloides*.

La presencia de *Aeromonas* en las muestras de pescado analizadas, se relaciona con los datos obtenidos por Neyts *et al*., [24], quienes aislaron *Aeromonas* en el 72% de muestras de pescados y de camarones; Yucel *et al*., [14] aislaron cepas de *Aeromonas* en el 82,8%, de muestras de pez carpa *Cyprinus carpio*, siendo las especies más prevalentes *A. caviae* (66%), seguida por *A. hydrophila* (22,6%) y *A. veroni sobria*

(11,6%); *Castro-Escarpulli et al*., [25] analizaron muestras de tilapia congelada en México, de las cuales, fueron identificadas 82 cepas de *Aeromonas* por métodos bioquímicos tradicionales, siendo las especies más prevalentes *A. salmonicida*, *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii sobria* y *A. eucrenophila*. La alta prevalencia de cepas de *Aeromonas* en las muestras es importante desde el punto de vista de salud pública, si se tiene en cuenta que estos microorganismos pueden ocasionar una gran variedad de procesos intestinales y extraintestinales, incluyendo bacteriemia, meningitis, infecciones en heridas y en pulmones y Síndrome Urémico Hemolítico [3, 26, 27,28].

De las especies aisladas, el mayor porcentaje correspondió a *A. hydrophila*, con una prevalencia del 29,7%. González *et a*l. [29], analizando muestras de trucha y lucio, aislaron, principalmente, cepas de *A. hydrophila*, hallando una prevalencia muy cercana a la aquí registrada (29%); Yucel & Balci [2], observando muestras de pescado de agua dulce procedentes de mercados de Ankara (Turquía), aislaron únicamente cepas de *A. hydrophila*, en el 10% de las mismas; Davies *et al*., [30] (2001), a partir de muestras de pescados tomadas en diferentes países europeos, detectaron una incidencia de *A. hydrophila* del 40%; Herrera *et al*., [31] estudiando muestras de pescado de origen marino, aislaron *Aeromonas* spp., con una incidencia del 62%; de éstas, el 48,4% correspondía a *A. hydrophila*; Savitthamani *et al*., [32], examinando pescado de río, apreciaron una prevalencia del 51,1% para *A. hydrophila* y Boari *et al.,* [33] aislaron Aeromonas en todas las muestras de filetes de tilapia en Brasil, siendo la especie más prevalente *A. hydrophila*. Los resultados del estudio en cuestión no se relacionan con los obtenidos por otros autores, como Radu *et al*., [34], quienes reportaron que a partir de muestras de pescado tomadas de mercados con venta al público en Malasia, 55%, 11,5% y 2,3% portaban *A. veronii sobria*, *A. hydrophila* y *A. caviae*, respectivamente. Tampoco concuerdan con los resultados de Silva *et al*., [1] quienes analizando muestras de pescado procedentes de mercados en Sao Paulo (Brasil), aislaron, principalmente, cepas de *A. allosaccharophila*. El hecho de encontrar un alto porcentaje de *A. hydrophila* en las muestras refuerza la suposición que el pescado representa un riesgo potencial para la salud de los consumidores, ya que esta especie es una de las que expresa más factores de virulencia [13,16], y es la una de la más relacionada con patogenicidad en el hombre [11,27].

Adicionalmente, se lograron aislar especies de *Aeromonas* que se consideran patógenas para el hombre, como son*: A. veronii sobria*, *A. caviae, A. jandaei*, *A. veronii veronii* y *A. schubertii*, que han sido aisladas a partir de infecciones en el ser humano [4, 8, 35]. Por lo tanto, el pescado que se expende en la plaza de mercado de Pamplona puede ser una fuente importante de cepas de *A. hydrophila* y de otras especies de *Aeromonas*, que expresan factores asociados a la virulencia.

Dentro de las especies de pescado, las que mostraron mayor presencia de *Aeromonas* spp., fueron: trucha y rampuche (100%), seguido por dorada (80%), bagre (73,33%), bocachico (60%), sierra (60%) y mojarra (50%). A continuación, se relacionan las especies de *Aeromonas* aisladas de las muestras de pescado (figura 1). Si se tienen en cuenta que en los resultados de la encuesta realizada previamente a los consumidores para determinar su preferencia por tipo de pescado, la trucha ocupó el segundo lugar después del bocachico y que, en el 100% de las muestras de trucha, se recuperaron especies de *Aeromonas*, correspondiendo el 50% a *A. veronii veronii* y el 20% a *A. hydrophila*, donde se concluye que la trucha es la especie de pescado que representa mayor riesgo potencial para la salud del consumidor y se acentúa, aún más, al considerar que la trucha se encuentra en todas las épocas del año, a diferencia del bocachico, que sólo se halla por temporadas.

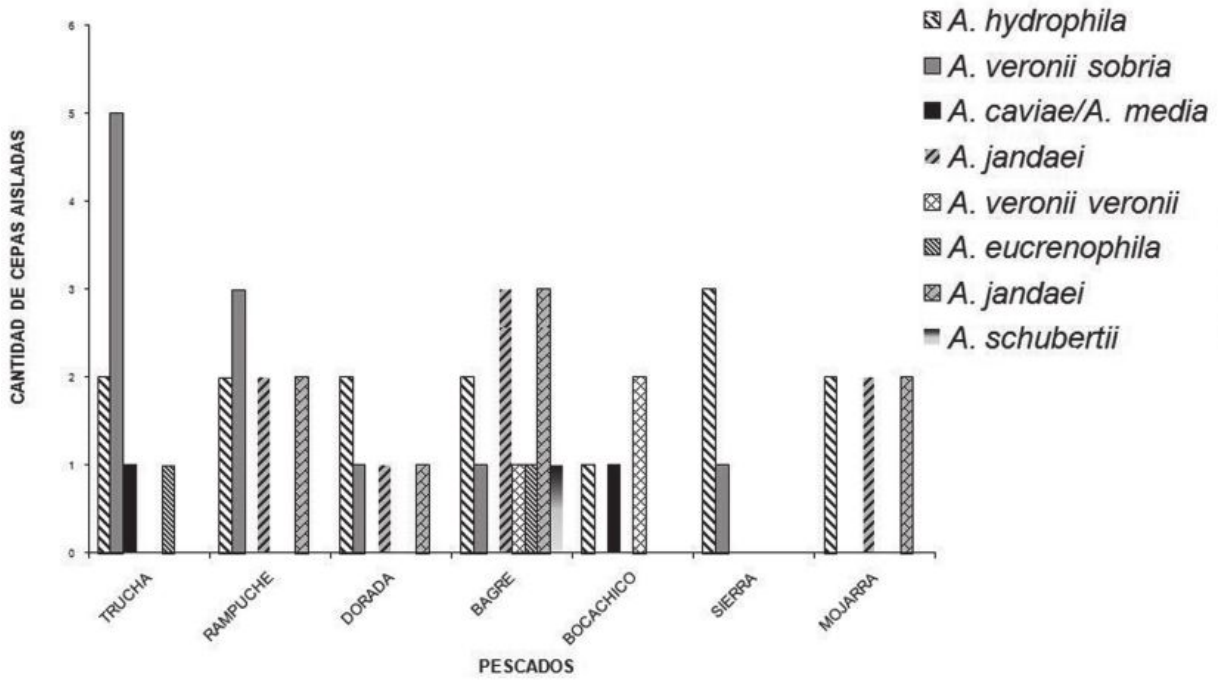


Figura1: Presencia de *Aeromonas* spp., en las diferentes especies de pescado analizadas

En este estudio, el 87% de las cepas identificadas por Microbact™ 24E correspondió a *A. hydrophila*; el 8% a *A. caviae*; el 2% a *A. veronii veronii*; y el 2% a *Plesiomonas shigelloides*, (pero por pruebas bioquímicas tradicionales esta cepa arroja un resultado negativo a la fermentación del m-inositol). Al comparar la identificación bioquímica tradicional con el Microbact™ 24E, el porcentaje de concordancia fue del 27,65%. Las ventajas que ofrecen los métodos miniaturizados, como el Microbact™, es el ahorro de tiempo en la preparación de los medios de cultivo, la minimización de errores en la preparación de los mismos y la facilidad y la rapidez al momento de la inoculación del kit; sin embargo, es un hecho bien reconocido que los kits miniaturizados comerciales identifican de manera incorrecta especies de *Aeromonas* [3]. Las diferencias de identificación obtenidas a nivel de especie entre el método tradicional y los miniaturizados son, básicamente, debidas a que las bases de datos de estos sistemas son inapropiadas e incompletas, además porque estos métodos no incluyen algunos sustratos clave requeridos para la identificación de especies, como es la reducción de la esculina. A pesar la existencia de métodos genéticos capaces de identificar de forma rápida y fiable todas las especies del género, los laboratorios destinados al diagnóstico clínico siguen utilizando métodos bioquímicos tradicionales, principalmente, en países en vía de desarrollo.

Se determinó que el uso del Microbact™ no fue lo suficientemente fiable para identificar *Aeromonas* a partir de muestras de pescado. Dentro de las limitantes que presentó el método Microbat™ 24E es importante recalcar el bajo poder discriminatorio entre especies, ya que sólo permite la identificación de cuatro especies: *Aeromonas hydrophila*, *A. veronii sobria*, *A. veronii veronii* y *A. caviae*.

La alta prevalencia de *Aeromonas* en las muestras de pescado está relacionada con varias fuentes; en primer lugar, con la contaminación del agua de donde proceden los peces; contaminación secundaria, proveniente de la manipulación; almacenamiento; transporte e incluso durante el expendio, ya que, como se mencionó anteriormente, ésta bacteria es psicrotrófica, logrando crecer a temperaturas de

refrigeración o en el hielo que se utiliza para conservar el pescado durante su venta [1, 2, 13, 15, 21] . Por lo anterior, para controlar la presencia de *Aeromonas* en el pescado que se expende en la plaza de mercado de Pamplona es prioritario que los vendedores de pescado implementen Buenas Prácticas de Manufactura, que en las piscifactorías se controle la calidad microbiológica de estanques donde habitan los peces y, finalmente, que el comprador realice una adecuada cocción del pescado antes de consumirlo.

En conclusión, se encontró una alta prevalencia de *Aeromonas* spp., en las muestras de pescado fresco comercializado en 11 la plaza de mercado de la Ciudad de Pamplona, pudiendo representar un peligro para la salud, especialmente, en niños, en ancianos y en personas inmunosuprimidas.

Agradecimientos: A la Universidad de Pamplona. Facultad de Ciencias Básicas, Departamento de Microbiología, Grupo de Investigación en Microbiología y Biotecnología (GIMBIO). Financiación: Este estudio fue financiado por el Grupo de Investigación en Microbiología y Biotecnología (GIMBIO). Universidad de Pamplona.

REFERENCIAS

[1] Silva, M.P., Matté, G., Leal, P., Matté, M. (2010). Occurrence of pathogenic microorganisms in fish sold in Sao Paulo, Brazil. J. food Safety. 30:94-110.

[2] Yucel, N., Balci, S. (2010). Prevalence of *Listeria*, *Aeromonas* and *Vibrio* species in fish used for human consumption in Turkey. J. food Prot. 73(2):380384.

[3] Janda, J.M., Abbott, S.I. (2010). The genus *Aeromonas*: Taxonomy, pathogenicity and infection. Clin. Microbiol. Rev. 23:35-73.

[4] Martin-Carnahan, A., Joseph, S.W. (2005). Aeromonadaceae. En: Brenner, D.J.; Krieg, N.R.; Staley, J.T.; Garrity, G,M. (eds). The Proteobacteria, Part B, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd Ed. Springer-Verlag, New York. v. 2. p. 556-577.

[5] Von Graevenitz, A. (2007). The role of *Aeromonas* in diarrhea: A review. Infection. 35(2):59-64.

[6] Albert, M.J., Ansaruzzaman, M., Talukder, K.A., Chopra, A.K., Kuhn, I., Rahman, M., Faruque, A.S., Islam, M.S., Sack, RB., Mollby, R. (2000). Prevalence of enterotoxin genes in *Aeromonas* spp., isolated from children with diarrhea, healthy controls, and the environment. J. Clin. Microbiol. 38(10):37853790.

[7] ANÓNIMO. (2003). Comentario epidemiológico de las enfermedades de declaración obligatoria y sistema de información microbiológica. España. Año 2002. Boletín Epidemiológico Semanal 11:157-168.

[8] EPA. (2006). *Aeromonas*: Human health criteria document. Disponible desde Internet en: http://www.epa.gov/waterscience/criteria/humanhealth/microbial/aeromonas-200603.pdf (con acceso 09/06/11).

[9] Bravo, l., Abreu, A.F., González, D., Ramírez, M., Aguila, A., Cabrera, N., Martínez, I., Fernández, C., Sánchez, l., Cruz, Y. (2011). Caracterización fenotípica de cepas de *Aeromonas* aisladas de pacientes con enfermedad diarreica aguda. Rev. Cubana Med. Trop. 63(1):76-80.

[10] Luzmila, A., Samper, I., Guzmán, M. (2005). *Aeromonas* spp. como agente causal de síndrome diarreico agudo en niños menores de 6 años de edad. Kasmera. 33:17.

[11] Novotny, L., Dvorska, L., Lorencova, A., Beran, V., Pavlik, I. (2004). Fish: a potential source of bacterial pathogens for human beings. Vet Med– Czech. 49(9):343-358.

[12] Castro-Escarpulli, G., Aguilera-Arreola, M., Giono, S., Hernández-Rodríguez, C., Rodríguez, M., Soler, l., Aparicio, G., Figueras, M. (2002). El género *Aeromonas*. ¿Un patógeno importante en México? Enf. Infec. Micro. 22(4):206-216.

[13] Daskalov, H. (2006). The importance of *Aeromonas hydrophila* in food safety. Food Control 17:474-483.

[14] Yucel, N., Aslim, B., Beyatli, Y. (2005). Prevalence and resistance to antibiotics for *Aeromonas* species isolated from retail fish in turkey. J. food Qual. 28:313-324.

[15] Newaj-Fyzul, A., Mutani, A., Ramsubhag, A., Adesiyun, A. (2008). Prevalence of bacterial pathogens and their anti-microbial resistance in tilapia and their pond water in Trinidad. Zoonoses Public Health. 55:206-213.

[16] Leal, Y., Reyes, M., Álvarez, J., Obregon, J., Viña, X. (2009). Enteropatogenicidad de bacterias aisladas de peces, del agua y plancton de su entorno en Venezuela. FCV-LUZ. 19(5):446-454.

[17] Salgado-Miranda, C., Palomares, E., Jurado, M., Marín, A., Vega, F., Soriano-Vargas, E. (2010). Isolation and distribution of bacterial flora in farmed rainbow trout from Mexico. J. Aquat. Anim. Health. 22: 244-247.

[18] Vivekanandhan, G., Hathab, A., Lakshmanaperumalsamy, P. (2005). Prevalence of *Aeromonas hydrophila* in fish and prawns from the seafood market of Coimbatore, South India. Food Microbiology. 22:133-137.

[19] Abrahim, A., Soultos, N., Steris, V., Papageorgiou, K. (2007). Incidence of *Aeromonas* spp. in marine fish and the environment of fish markets in northern Greece. Ital. J. food Sci. 19(1):111-116.

[20] Morales, G., Blanco, l., Arias, M., Chaves, C. (2004). Evaluación de la calidad bacteriológica de tilapia fresca (*Oreochromis niloticus*) proveniente de la Zona Norte de Costa Rica. ALAN. 54(4):433-437.

[21] Ullman, D., Krause, G., Knabner D., Weber, H., Beutin, l. (2005). Isolation and characterization of potentially human pathogenic, cytotoxin producing *Aeromonas* strains from retailed seafood in Berlin, Germany. J. Vet. Med. B 52:82-87.

[22] APHA. (2000). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of foods. 3rd ed. APHA. Washington, D.C.1108p

[23] Abbott, S.L., Cheung, W.K.W., Janda, J.M. (2003). The genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. J. Clin. Microbiol. 41:2348-2357.

[24] Neyts, K., Huys, G., Uyttendaele, M., Swings, J., Debevere, J. (2000). Incidence and identification of mesophilic *Aeromonas* spp. from retail foods. Lett. Appl. Microbiol. 31(5):359-363.

[25] Castro-Escarpulli, G., Figueras, M., Aguilera-Arreola, G., Soler, L., Fernández-Rendón, E., Aparicio, G., Guarro, J., Chacón, M. (2003). Characterization of *Aeromonas* spp. isolated from frozen fish intended for human consumption in México. Int. J. food Microbiol. 84:41-49.

[26] Cabrera, L.E., Bravo, L., Ramírez, M.M., Llop, A., Fernández, A., Morier, L., Borrego, G. (2007). Factores de virulencia en cepas de *Aeromonas* spp. aisladas de pacientes con bacteriemia. Rev. Panam. Infectol. 9(4):19-23.

[27] Tena, D., González-Praetorius, A., Gimeno, C.; Pérez-Pomata, M., Bisquert, J. (2007). Infección extraintestinal por *Aeromonas* spp. revisión de 38 casos. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 25:235-241.

[28] Yucel, N., Erdogan, S. (2010). Virulence properties and characterization of *Aeromonads* isolated from foods of animal origin and environmental sources. J. food Protect. 73(5):855-860.

[29] González, C.J., Santos, J.A., García-López, M.L., González, N., Otero, A. (2001). Mesophilic Aeromonads in wild and aquacultured freshwater fish. J. food Prot. 64(5):687-691.

[30] Davies, A.R., Capell, C., Jehanno, D., Nychas, G.J.E., Kirby, R.M. (2001). Incidence of foodborne pathogens on European fish. Food Control. 12:67-71.

[31] Herrera, F.C., Santos, J.A., Otero, A., García-López ML. (2006). Ocurrence of foodborne pathogenic bacteria in displayed portions of marine fish. J. Appl. Microbiol. 100:527-536.

[32] Savitthamani, K., Vivekanandhan, G., Thayumanavan, T., Lakshmanaperumalsamy, P. (2005). Occurrence of *Aeromonas hydrophila* in river fish. Asian J. Microbiol, Biotechnol, Environ, Sci 7(2):261-264.

[33] Boari, C.A., Pereira, G., Valeriano, C., Silva, B., Morais, V., Figueiredo, H., Piccoli, R. (2008). Bacterial ecology of tilapia fresh fillets and some factors that can influence their microbial quality. Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas. 28(4):863-867.

[34] Radu, S., Ahmad, N., Ling, F., Reezal, A. (2003). Prevalence and resistance to antibiotics for *Aeromonas* species from retail fish in Malaysia. Int. J. food Microbiol. 81:261-266.

[35] Kannan, S., Suresh, P.K., Karkuzhali, K., Chattopadhyay, U.K., Pal, D. (2001). Direct detection of diarrheagenic *Aeromonas* from faeces by polymerase chain reaction (PCR) targeting aerolysin toxin gene. Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. 5(3):91-94.

DETERMINATION OF VIRULENCE FACTORS IN STRAINS OF *Aeromonas* spp, ISOLATED FROM FISH

(Determinación de factores de virulencia en cepas de *Aeromonas* spp, aisladas a partir de pescado)

William Hernando Suarez Quintana [a*+], Fanny Consuelo Herrera Arias[b].

[a] Microbiólogo con Énfasis en Alimentos, M.Sc. en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad de Pamplona. Docente Ocasional. Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Básicas. e-mail: aquifex3@hotmail.com
[b] Ph.D. Universidad de Pamplona. Docente asociado. Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Básicas. e-mail: fannyh@unipamplona.edu.co Grupo de Investigación en Microbiología y Biotecnología (GIMBIO). Ciudad Universitaria. Pamplona Norte de Santander. Colombia. Universidad de Pamplona

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: aquifex3@hotmail.com

Área del Conocimiento: Biotecnología Alimentaria.

ABSTRACT
A study was carried out to know the phenotypic expression of five virulence factors in *Aeromonas* strains isolated previously in fish being sold in Pamplona, Colombia. A total of 47 strains previously identified were used. Haemolytic activity on blood agar, supplemented with 5% sheep erythrocytes, and blood agar supplemented with 5% human erythrocytes; proteolytic activity in Mueller-Hinton agar supplemented with 10% (w/v) skim milk; lipolytic activity on tributyrin agar and deoxyribonuclease (DNase) activity on DNAse agar plates were evaluated. Strains of*A. hydrophila*, *A. veronii* GH 8, *A. jandaei*, *A. veronii* GH 10 and *A. eucrenophila* demonstrated haemolytic, proteolytic, lipolytic and nuclease capacities. All *A. popoffii* strains were ß-haemolytic, proteolytic and with DNase activity on human blood agar. Strains of A. *caviae*, also were haemolytic and lipolytic, whereas the strain of *A. schubertii* presented haemolytic and DNase activity. The frequence of the Fvirulence factors in the studied strains was: 87% of the isolates presented nuclease production, 83% were ß-hemolytic on human erythrocytes, 68% presented lipase production, 63% were proteolytic, and 53% were found to be haemolytic on sheep erythrocytes, these data indicate the possible pathogenic potential of the strains. These results also suggest that the fish sold in Pamplona, could be an important source of *Aeromonas* species expressing factors associated with virulence in humans.

Keywords: *Aeromonas*, desoxirribonucleases, fish, hemolysis, lipases, virulence (*Sources:CAD,DeCS*).

RESUMEN
Se realizó un estudio para conocer la expresión fenotípica de cinco factores de virulencia en cepas de *Aeromonas* aisladas previamente en el pescado que se vende en Pamplona, Colombia. Se utilizaron 47 cepas identificadas previamente. Se evaluaron: actividad hemolítica en agar sangre, suplementado con 5% de eritrocitos de cordero y agar sangre suplementado con 5% eritrocitos de sangre humana; actividad proteolítica en agar Mueller-Hinton suplementado al 10% (p/v) con leche descremada, actividad lipolítica en agar tributirina; actividad desoxirribonucleasas en agar DNAsa. Se encontró que las

cepas de *A. hydrophila*, *A. veronii* GH 8, *A. jandaei*, *A. veronii* GH 10 y *A. eucrenophila*, demostraron capacidad hemolítica, proteolítica, lipolítica y nucleasa. Todas las cepas de *A. popoffii* fueron ß-hemolíticas en agar sangre humana, proteolíticas y con actividad DNAsa. Las cepas de *A. caviae*, coincidieron en ser hemolíticas y lipolitícas, mientras que la cepa de *A. schubertii*, manifestó la presencia de actividad hemolítica y DNAsa. La frecuencia de los factores de virulencia en las cepas estudiadas fue: el 87% demostraron producción de nucleasas; el 83% fueron ß-hemolíticas sobre eritrocitos humanos; el 68% expresaron producción de lipasas, el 63% fueron proteolíticas y el 53% resultaron ser hemolíticas sobre eritrocitos de cordero, indicando estos datos el posible potencial patógeno de las cepas. Estos resultados mostraron que el pescado comercializado en Pamplona, puede ser una fuente importante de especies de *Aeromonas* que expresan factores asociados a la virulencia para el hombre.

Palabras Clave: *Aeromonas*, desoxirribonucleasa, hemólisis, lipasa, pescado, virulencia

INTRODUCCION

El género *Aeromonas* está formado por bacilos Gram-negativos, oxidasa-positivos y anaerobios facultativos. Algunas especies han sido relacionadas como agentes de infecciones gastrointestinales y de infecciones extraintestinales. El género *Aeromonas* en la actualidad incluye 30 especies y 12 subespecies, con la inclusión de *A. tecta* [1]. *A. hydrophila*, *A. veronii* biovar *sobria*, *A. caviae*, *Aeromonas* jandaei, *A. schubertii* y *A. trota* son las especies frecuentemente aisladas de muestras clínicas [2]. En Colombia, por sus condiciones culturales y socioeconómicas, las enfermedades gastrointestinales son un gran problema de salud pública [3].

Los estudios epidemiológicos relacionados con la función etiológica de *Aeromonas* spp., en episodios de diarrea son limitados, ya que pocos laboratorios de microbiología emplean técnicas y métodos específicos para su aislamiento e identificación [4]; los procesos entéricos afectan a todos los grupos de edad, sin embargo la población infantil es la más afectada [5,6]. La presencia de factores de virulencia en *Aeromonas* spp., es un hecho reconocido. Sin embargo, la patogénesis de las infecciones causadas por *Aeromonas* spp., se desconoce. Los factores de virulencia descritos en *Aeromonas* spp., incluyen tanto componentes estructurales como flagelos, pilis, cápsula, capa S, LPS y proteínas de la membrana externa y productos extracelulares como hemolisinas [7], enterotoxinas citotóxicas y citotónicas [8] proteasas, lipasas, desoxirribonucleasas y sideróforos [4,9,10].

El objetivo del presente estudio fue determinar la presencia de marcadores fenotípicos de virulencia en cepas de *Aeromonas* aisladas a partir de muestras de pescado comercializado en la ciudad de Pamplona, Colombia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas. En un estudio realizado previamente, se analizaron muestras de pescado comercializado en Pamplona (Colombia), con el fin de determinar la presencia de *Aeromonas*, logrando aislar un total de 47 cepas. La adscripción a especie de estas cepas se realizó por métodos bioquímicos tradicionales [11]. La tabla 1 indica las especies aisladas.

Tabla 1. Especies de *Aeromonas* aisladas en muestras de pescado

Especie	Número de cepas[1]
A. hydrophila	14
A. veronii GH 8	9
A. jandaei	8
A. veronii GH 10	8
A. popoffii	3
A. eucrenophila	2
A. caviae/A. media	2
A. schubertii	1
TOTAL	**47**

[1]Cantidad de cepas aisladas de cada especie.

Las cepas se conservaron congeladas en glicerol, de donde se tomaron 20 µL y se inocularon en Agar Base Rojo de Fenol incubando a 30ºC durante 18 horas, para confirmar la pureza del cultivo. Después las colonias fueron sembradas en Agar Nutritivo (AN), y se evaluaron las siguientes actividades:

Actividad hemolítica. Se empleó el agar sangre suplementado con 5% eritrocitos de cordero y agar sangre suplementado con 5% eritrocitos de sangre humana. Para esto, a partir de cada una de las cepas cultivadas en el medio AN, se tomó una asada de cultivo y se sembró en spot en la superficie de cada uno de los dos tipos de medios de cultivo, incubando a 30°C durante 24 h. La presencia de zonas claras alrededor de las colonias indicó la actividad ß-hemolítica.

Actividad proteolítica. Se evaluó la actividad caseinolítica de las cepas de la siguiente manera. Las colonias cultivadas en el medio AN se inocularon en spot sobre la superficie de placas de petri conteniendo agar Mueller Hinton suplementado al 10% (p/v) con leche descremada, y se incubaron A 30°C durante 24 h. La presencia de una zona transparente alrededor de las colonias indicó la actividad proteolítica.

Actividad lipolítica. La actividad lipasa se determinó tomando una asada a partir del cultivo de las cepas en el medio AN, sembrando en spot en la superficie de placas de petri conteniendo agar Tributirina, e incubando a 30°C durante 24 h, la presencia de un halo opaco alrededor de las colonias, indicó la actividad de la lipasa.

Actividad Desoxirribonucleasa. A partir de colonias de las cepas cultivadas en el medio AN, se transfirió una asada sobre el agar DNAsa, realizando siembra en spot y se incubó a 30°C durante 24 h. Posteriormente, se reveló inundando la caja con HCl 1 M, evaluando como positivo las que presentaron un halo alrededor de las colonias.

RESULTADOS

Tabla 2. Incidencia de cinco factores de virulencia en especies de Aeromonas.

CEPA	Número de cepas (%)	Nº de cepas				
		β-hemólisis		Proteólisis	Lipólisis	DNAsas
		Sangre de cordero	Sangre humana			
A. hydrophila	14	8 (57)	10 (71)	7 (50)	10 (71)	11 (79)
A. veronii GH 8	9	5 (56)	7 (78)	7 (78)	6 (67)	8 (89)
A. jandaei	8	4 (50)	8 (100)	6 (75)	7 (88)	7 (88)
A. veronii GH 10	8	4 (50)	6 (75)	5 (63)	3 (38)	8 (100)
A. popoffii	3	2 (67)	3 (100)	3 (100)	2 (67)	3 (100)
A. eucrenophila	2	1 (50)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	2 (100)
A. caviae	2	1 (50)	2 (100)	0 (0)	2 (100)	1 (50)
A. schubertii	1	0 (0)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	1 (100)
Total	**47**	**25(53)**	**39(83)**	**30 (63)**	**32 (68)**	**41 (87)**

Como puede observarse, la gran mayoría de las cepas de *A. hydrophila*, *A. veronii* GH 8, *A. jandaei*, *A. veronii* GH 10, *A. eucrenophila* y *A. popoffii*, expresaron todos los factores de virulencia analizados, indicando esto, el posible potencial patógeno de las cepas. Con relación a la frecuencia de los factores de virulencia en las cepas analizadas, los resultados más altos se presentaron para producción de nucleasas (87%), para actividad hemolítica en eritrocitos humanos (83%), siendo menor la producción de lipasas (68%), la producción de proteasas (63%) y la actividad hemolítica en eritrocitos de cordero (53%). Las cepas de *A. caviae* no expresaron actividad caseinolítica y aquéllas identificadas como *A. schubertii* no presentaron ß-hemólisis en eritrocitos de cordero y fueron negativas para la actividad proteasa, proteolítica y lipolítica.

DISCUSIÓN

Aunque se han realizado numerosos estudios para esclarecer los mecanismos de patogenicidad en las infecciones causadas por *Aeromonas* spp., aún no se han dilucidado completamente [1,4]. Sin embargo, se han identificado varios factores de virulencia entre los que se incluyen un gran número de enzimas extracelulares que parecen jugar un papel importante en la patogenicidad de estas bacterias [12, 13]; la producción de enzimas extracelulares es muy variable dentro de las especies de *Aeromonas*, se considera que *A. hydrophila* y *A. sobria* los tienen con mayor frecuencia y *A. caviae* con menor frecuencia [7]. Entre estos factores, la actividad hemolítica es la más relacionada con la enterotoxicidad de las cepas, siendo la aerolisina la hemolisina mejor estudiada [1]. Las cepas de *A. hydrophila* aisladas en este estudio, demostraron una alta capacidad hemolítica, resultados que concuerdan con los hallados por otros autores [11,12]; las cepas de *A. caviae* fueron hemolíticas en agar sangre humana y de cordero. Un estudio diferente reveló que el 52% de las cepas de *A. caviae* eran ß-hemolíticas en agar sangre de cordero [11]. El 50% de las cepas de *A. jandaei* aisladas aquí fueron hemolíticas en sangre de cordero. Resultados de otro ensayo demostraron que el 100% de las cepas de *A. caviae* y *A. jandaei* aisladas de pacientes con bacteriemia eran hemolíticas [12]. De igual forma, se ha determinado que el 56.25% de cepas de *A. hydrophila*, el 26.05% de las cepas de *A. caviae* y el 100% de cepas *A. veronii* biovar sobria aisladas de niños menores de cinco años con enfermedad diarreica aguda, eran ß-

hemolíticas [14]. Otra publicación reveló que el 100% de las cepas *A. hydrophla* y *A.caviae*, de origen ambiental y clínico expresaron esta actividad [15]. En cuanto a las cepas de *A. popoffii*, un alto porcentaje de ellas demostró actividad ß-hemolítica (Tabla 2), coincidiendo con los resultados encontrados por otros autores [16]. Respecto a los sustratos empleados, el 83% de las especies de *Aeromonas* expresaron actividad hemolítica sobre eritrocitos humanos, mientras que el 53% lo hicieron sobre eritrocitos de cordero, aspecto que fue analizado previamente, indicando que los eritrocitos de cordero son menos sensibles que los eritrocitos de otros mamíferos [10].

El 87% de las especies estudiadas demostraron actividad nucleasa (DNAsa) y, aunque no se conoce con precisión su posible función en la patogenia de *Aeromonas*, se sabe que son importantes para la nutrición bacteriana [16]; estas enzimas son importantes para el establecimiento (invasión de las células huéspedes), desarrollo de la infección y, en otras bacterias como *Streptococcus*, se ha demostrado que las DNAsas están involucradas en infecciones bacterianas en humanos [17].

Adicionalmente, se ha señalado que cepas de *Aeromonas* DNAsas positivas están relacionadas con septicemia en humanos [12,17]; se considera a *A. hydrophila* como la principal especie productora de nucleasas aspecto que, si se tienen en cuenta el número de cepas aisladas pertenecientes a esta especie, fue ratificado con los resultados de este estudio. El 50% de las cepas de *A. caviae* aisladas demostraron actividad DNAsa (Tabla 2); Otros autores [13], detectaron actividad DNAsa en el 66% de cepas de *A. caviae* aisladas de muestras fecales de niños con diarrea aguda.

Con relación a la producción de lipasas, el 68% de las cepas de *Aeromonas* evaluadas expresaron esta actividad; se cree que estas enzimas pueden alterar la membrana plasmática del huésped (16). Igualmente, se sabe que las lipasas interactúan con los leucocitos humanos y que la deleción en los genes que las codifican reducen los efectos letales de las cepas en ratones y peces [18,19]; se reconoce a *A. hydrophila* como una importante productora de lipasas, lo que fue corroborado por los resultados del estudio en cuestión. Se ha reportado, además, que por lo menos el 91% de las cepas de *A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. veronii* biovar sobria aisladas de pacientes con diarrea en Brasil demostraron actividad lipolítica [18].

En conjunto, en el 63% de las especies se detectaron proteasas. Se considera que el papel principal de las proteasas es establecer y mantener la infección. Éstas son capaces de degradar diferentes compuestos como albúmina, fibrina, gelatina y elastina [20] y pueden estar involucradas en el mantenimiento de infecciones en heridas de humanos [20,21].

Resultados de otro estudio han indicado que el 100% de cepas de *A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. veronii* biovar sobria aisladas de pacientes con diarrea demostraron actividad proteolítica [18]. En el presente estudio, 50% de las cepas de *A. hydrophila* fueron proteolíticas (Tabla 2); Se ha reportado que el 90% de las cepas de *A. hydrophila* de origen clínico evidenciaron actividad proteolítica [22]. En cuanto a las

cepas de *A. caviae*, ninguna de ellas mostró actividad proteasa, resultado que no se relaciona con los hallazgos de otro ensayo, en el que se comprobó actividad proteasa en por lo menos el 58% de las cepas de *A. caviae* aisladas de infección intestinal en humanos [13].

Es importante destacar, que un alto porcentaje de las cepas identificadas como *A. veronii* biovar sobria o *A. veronii* GH 8 (anteriormente, *A. sobria*), presentaron actividad hemolítica, proteolítica, lipasa y DNAsa, coincidiendo con los resultados obtenidos en diferentes estudios [18,23]; otros autores, encontraron que el 100% de *A. veronii* biovar sobria aisladas de pacientes con septicemia eran hemolíticas [12]. Adicionalmente, se reportó que el 50% de aislamientos provenientes de procesos diarreicos en humanos correspondientes a *A.veronii* biovar sobria, arrojaron resultados positivos para actividad hemolítica [24]. En total, el 83% de las cepas ensayadas fueron ß-hemolíticas sobre eritrocitos humanos, 63% fueron proteolíticas, 68% expresaron producción de lipasas y el 87% demostraron producción de DNAsa, resultados que concuerdan con los hallados en un estudio realizado previamente, en el que se demostró actividad hemolítica, proteolítica, lipasa y DNAsa en el 60.5, 69.5, 73.6 y 68.6% respectivamente, de cepas de *Aeromonas* aisladas a partir de alimentos, señalando que estas cepas pueden representar un riesgo potencial para la salud del hombre [25].

En conclusión, en este estudio se logró determinar que un elevado porcentaje de cepas de *Aeromonas*, aisladas a partir de pescado consumido en la Ciudad de Pamplona (Colombia), demostraron marcadores fenotípicos de virulencia relacionados con la patogenicidad de las mismas en el ser humano. En todo caso, es importante investigar la presencia de genes que codifican factores de virulencia en las cepas estudiadas, como son *hlyA*, *aerA*, *act*, *alt* y *ast*, y así confirmar el rol de las cepas como vehículos de enfermedad en el hombre.

FERERENCIAS

[1] Janda JM, Abbott SL. (2010) The genus *Aeromonas*:Taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clin Microbiol Rev*; 23:35-73.

[2] Martin-Carnahan A. Joseph SW. (2005) *Aeromonadaceae*. En: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity GM. Eds. The Proteobacteria, Part B, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd Ed. NewYork, NY: Springer-Verlag.

[3] INVIMA. (2008) Ministerio de la Protección social. Informe de la vigilancia de las enfermedades transmitidas por alimentos. [en línea]. [Consultado Mayo 16 de 2011] URL Disponible En: http://web.invima.gov.co/portal/documents/portal/documents/root/INFORMEETA_%20IITRIMESTRE%20200801.pdf.

[4] Von Graevenitz A. (2007). The role of *Aeromonas* in diarrhea: a review. *Infection*; 35(2):59-64.

[5] Vila J, Ruiz J, Gallardo F, Vargas M, Soler L, Figueras MJ, Gascón J. (2003) *Aeromonas* spp. and traveler's diarrhea: Clinical Features and Antimicrobial Resistance. *Emerg Infect Dis*; 9(5):552-555.

[6] Krzyminska S, Mokracka J, Laganowska M, Wlodarczak K, Guszczynska E, Liszkowska J, Popkowska E, Lima I, Lemanska I, Wendt M. (2001) Enhancement of the virulence of *Aeromonas* caviae diarrhoeal strains by serial passages in mice. J Med Microbiol; 50:303-312.

[7] Farmer JJ, Arduino MJ, Hickman-Brenner FW. (2006). The genera *Aeromonas* and Plesiomonas. Prokaryotes; 6:564–596.

[8] Balaji V, Jesudason V, Sridharan G. (2004). Cytotoxin testing of environmental *Aeromonas* spp. In Vero cell culture. Indian J Med Res; 119:186-189.

[9] González-Serrano CJ, Santos JA, García López ML y Otero A. (2002) Virulence markers in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii* biovar sobria isolates from freshwater fish and from a diarrhoea case. J Appl Microbiol; 93:414–419.

[10] Santos A, González J, Otero A, García-López ML. (1999). Hemolytic activity and siderophore production in different *Aeromonas* species isolated from fish. Appl Environ Microbiol; 65(12):5612-5614.

[11] Abbott SL, Cheung KW. Janda M. (2003). The genus *Aeromonas*: Biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. *J Clin Microbiol*; 37(11):2348-2357.

[12] Cabrera LE, Bravo L, Ramírez MM, Llop A, Fernández A, Morier L, Borrego G. (2007). Factores de virulencia en cepas de *Aeromonas* spp. aisladas de pacientes con bacteriemia. *Rev Panam Infectol* 2007; 9(4):19-23.

[13] Castro-Escarpulli G, Peña del Barrio D, Castañeda N, García A, Morier L, Aguilera-Arreola MG, Bravo L. (2002). Virulence factors of *A. caviae* strains isolated from acute diarrheic disease in Cuba. Rev Latinoam Microbiol; 44(1):11-13.

[14] Longa A, Vizcaya L, Nieves B, Bravo L, Morier L, Pérez-Schael I, Cabrera LE. (2005) Factores de virulencia asociados a la enteropatogenicidad en cepas de *Aeromonas* spp. aisladas de niños con diarrea en Mérida, Venezuela. Rev Cubana Med Trop; 57(2):85-91

[15] Castilho, M.C.; Castro, T.L.; Araújo, V.S.; Trajano, R.S.; Santos, P.A.; Pimenta, P.M.; Lucheze, K.; Melo, J.T.; Gonçalves, A.M.; Nogueira, R.T.; de Luna, M.G.; Freitas-Almeida, A.C. (2009). High frequency of hemolytic and cytotoxic activity in *Aeromonas* spp. isolated from clinical, food and environmental in Rio de Janeiro, Brazil. Antonie Van Leeuwenhoek; 96:53–61.

[16] Soler L, Figueras MJ, Chacón MR, Vila J, Marco F, Martinez-Murcia AJ, Guarro J. (2002). Potential virulence and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas popoffii* recovered from freshwater and seawater. FEMS Immunol Med Microbiol; 32:243-247.

[17] Chacón MR, Figueras MJ, Castro-Escarpulli G, Soler L, Guarro J. (2003). Distribution of virulence genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp. Antonie Van Leeuwenhoek; 84:269–278.

[18] Guerra MF, Fadanelli R, Figueiró M, Schreiner F, Delamare AP, Wollheim C, Costa SP, Echeverrigaray S. (2007). *Aeromonas* associated diarrhoeal disease in south Brazil: prevalence, virulence factors and antimicrobial resistance. Braz J Microbiol; 38(4):638-643.

[19] Merino S, Aguilar A, Nogueras MM, Regue M, Swift S, Tomas JM. (1999). Cloning, sequencing, and role in virulence of two phospholipases (A1 and C) from mesophilic *Aeromonas* sp. serogroup O:34. Infect Immun; 67(8):4008-4013.

[20] Castro-Escarpulli G, Aguilera-Arreola M, Giono S, Hernández-Rodríguez C, Rodríguez M, Soler L, Aparicio, G.; Figueras, M. (2002). El género *Aeromonas*. ¿Un patógeno importante en México? *Enf Infec Micro*; 22(4):206-216.

[21] Cascón A, Yugueros J, Temprano A, Sánchez M, Herranz C, Luengo JM. (2000). A major secreted enastase is essential for pathogenicity of *Aeromonas hydrophila*. *Infect Immun*; 68:3233-3241.

[22] Sechi LA, Deriu A, Falchi MP, Fadda G y Zanetti S. (2002). Distribution of virulence genes in *Aeromonas* spp. isolated from Sardinian waters and from patients with diarrhea. *J App Microbiol*; 92:221-227.

[23] Ivanova EP, Zhukova NV, Gorshkova NM, Chaikina EL. (2001) Characterization of *Aeromonas* and *Vibrio* species isolated from a drinking water reservoir. *J Appl Microbiol*; 90:919-927.

[24] Rahman M, Colque-Navarro P, Kunh I, Huys G, Swings J, Möllby R. (2002). Identification and characterization of pathogenic *Aeromonas veronii* Biovar sobria associated with epizootic ulcerative syndrome in fish in Bangladesh. Appl Environ Microbiol; 68(2):650-655.

[25] Yucel N, Erdogan S (2010). Virulence properties and characterization of aeromonads isolated from foods of animal origin and environmental sources. J Food Prot; 73(5):855-60.

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF *Listeria* spp. FROM FRESH FISH SAMPLES, MARKETED IN PAMPLONA (North of Santander)

[Aislamiento e identificación de *Listeria* spp. a partir de muestras de pescado fresco expendido en pamplona (norte de Santander)]

Fanny Consuelo Herrera Arias[a+], William Hernando Suarez Quintana [b*].

[a] Ph.D. Universidad de Pamplona. Docente Titular. Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Básicas. Grupo de Investigación en Microbiología y Biotecnología (GIMBIO). Ciudad Universitaria. Pamplona, Norte de Santander. Colombia. Correspondencia: fannyh@unipamplona.edu.co
[b] Microbiólogo con Énfasis en alimentos, M.Sc. en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad de Pamplona. Docente catedrático. Departamento deMicrobiología, Facultad de Ciencias Básicas. e-mail: aquifex3@hotmail.com Universidad de Pamplona

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: fannyh@unipamplona.edu.co

Área del Conocimiento: Biotecnología Alimentaria.

ABSTRACT
The genus *Listeria* comprises eight species between them *Listeria monocytogenes*, pathogenic to humans, causing gastroenteritis, meningitis, neuroencephalitis, septicemia, abortions and even death. *L. monocytogenes* is an ubiquitous bacterium which can be isolated from ecosystems inhabited by fish, reaching the finished product, even at high concentrations, when the fish is processed using inadequate cleaning and disinfection practices and/or is stored for a long time at refrigeration temperatures because it is psychrotrophic. The objectives of this study were to determine the presence of *Listeria* spp., in fresh fish samples expended in the market place of Pamplona, comparing the traditional method with an immunochromatografic one, and to verify whether there is a correlation between the presence of *Escherichia coli* and *Listeria* spp., in the samples. *L. monocytogenes*, *L. innocua* and *L. grayi* were isolated, with prevalences of 3.9%, 17.6% and 13.7%, respectively, with an overall incidence of 35.3%. By comparing the isolation methods, traditional and immunochromatografic, no significant differences between them were found. Finally, it was established that the presence of *E. coli* is a good indicator of the presence of strains of *Listeria* in the samples. The presence of *L. monocytogenes* in the samples indicates that fish sold in the market place of Pamplona can be an important vehicle for this pathogen and implies, that this food might pose a health risk to consumers, especially the vulnerable population.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, fish, *Escherichia coli*, prevalence.

GENERATION OF A HYBRID GENE THAT ENCODES A RECOMBINANT FUSION PROTEIN OF VIRULENCE ANTIGENS ESAT-6 AND CFP-10 FROM *Mycobacterium bovis*

(Generación de un gen híbrido que codifica para una proteína de fusión recombinante de los antígenos de virulencia ESAT-6 y CFP-10 de *Mycobacterium bovis*)

Sabina A. Ferrari-Palacios[a*+], Abel Gutiérrez-Ortega[a], Sara E. Herrera-Rodríguez[a], Angel H. Alvarez-Herrera[a]

[a]Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y diseño del Estado de Jalisco, A.C., Av. Normalistas 800. Col. Colinas de la Normal. C.P. 44270, Guadalajara, Jal., México.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: sabiferra@hotmail.com

Área del Conocimiento: Biotecnología Clínica.

ABSTRACT
The bacterium *Mycobacterium bovis* is a member of the *M. tuberculosis* complex, a highly related mycobacteria despite its host preference. Although *M. bovis* causes bovine tuberculosis (TB), it also infect humans. Bovine TB is diagnosed using the Tuberculin skin test with a complex mixture of antigens called PPD. Recently specific virulence antigens ESAT-6 and CFP-10 are being used for the diagnosis of human and bovine TB with greater specificity. Genes *esxA* and *esxB* encoding ESAT-6 and CFP-10, respectively, are adjacent each other in the RD1 region of the mycobacterial genome, its proteins form a 1:1 heterodimer and they are detected extracellularly in liquid media of *M. tuberculosis* and *M. bovis* cultures. Both, the ESX-1 antigen secretion system, and the species specific codon usage for protein translation in this bacteria genus are very specific, which difficult protein production of ESX antigens in *Escherichia coli*. This work presents the methodology used to obtain a single recombinant fusion protein that allows its expression in *E. coli* retaining its antigenicity. High-fidelity PCR was used to amplify *esxA* and *esxB* using DNA from the standard *M. bovis* AN5 strain, the amplicons were sequentially cloned into the pET28a expression vector through specific restriction sites. In addition, *esxA-esxB* hybrid gene with specific codon usage for *E. coli* translation was synthesized and cloned into pUC57 and then subcloned in pET28a expression vector. Expression of the chimeric ESAT-6:CFP-10 protein will be induced in cultures of *E. coli* BL21, and antigenicity of purified protein will be measured by means of the bovine interferon-gamma *in vitro* test using blood from cattle with a natural *M. bovis* infection.

Keywords: ESAT-6:CFP-10, hybrid gene, protein fusion, *Mycobacterium bovis*.

IDENTIFICATION OF AUTOANTIBODIES AGAINST CYTOKERATIN-19 AND CYFRA-21.1 IN PATIENT'S SERUM WITH LUNG CANCER AS POTENTIAL DIAGNOSTIC MARKERS FOR THE DISEASE

(Identificación de autoanticuerpos contra Citoqueratina-19 y Cyfra-21.1 en suero de pacientes con cáncer de pulmón como marcadores potenciales de la enfermedad)

Carlos Enrique Hirales Casillas[a]*, Rodolfo Hernández Gutiérrez[a], Ernesto Prado Montes de Oca[a], Moisés Martínez Velázquez[a]

[a] Departamento de Biotecnología Medica y Farmacéutica, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A. C.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: carloshirales@icloud.com

Área del Conocimiento: Biotecnología Clínica

ABSTRACT
Lung cancer is the leading cause of cancer-related death, causing the death of more than 1.59 million people worldwide in 2012. Current studies have achieved detection of autoantibodies in patients with lung cancer and people at high risk of developing the disease, detecting these autoantibodies until five years before the tumor develops. It is not clear how patients with lung cancer produce antibodies against its own proteins, but this may be because the proteins have some differences that make them immunogenic, such as misfolding, glycosylation, overexpressed or aberrantly localized in tumor cells. Therefore, we can use these autoantibodies as tumor markers to the development of new tests for the early detection of the disease. The main objective of the study is to determine the presence of antibodies against Cytoqueratin-19 and Cyfra-21.1 in serum samples from patients with lung cancer whose altered overexpression has previously been shown and propose them as potential diagnostic markers for the disease. We performed the amplification of genes that encode these proteins and cloning in the expression vector pET 101. Recombinant proteins were expressed and purified by affinity purification and finally we performed the autoantibodies detection assay by Western blot using serum samples from lung cancer patients and samples from people with high risk to developing the disease as COPD and heavy smokers. It was achieved the detection of autoantibodies against Cytokeratin 19 in a 60% of lung cancer serum samples, 16% in COPD serum samples and finally 3% in heavy smokers serum samples, unlike Cyfra 21.1 where the detection of autoantibodies was not observed, despite of being one of the major proteins that are overexpressed in the majority of lung cancer cases. Our results support the hypothesis that protein overexpression in lung cancer can cause autoantibodies production against overexpressed proteins.

Keywords: Lung Cancer; Biomarkers; Overexpression; Autoantibodies

RESUMEN
El cáncer de pulmón es la principal cause de muerte relacionada con cáncer, causando la muerte de más de 1.59 millones de personas a alrededor del mundo en 2012. Estudios actuales han llevado a la detección de autoanticuerpos en pacientes con cáncer de pulmón así como en gente de alto riesgo para

desarrollar la enfermedad, detectando estos autoanticuerpos hasta 5 años antes de que se desarrolle el tumor. No está claro como los pacientes con cáncer de pulmón producen anticuerpos contra sus propias proteínas, esto podría deberse a que las proteínas tienen algunas diferencias que las hacen inmunogenicas, tales como perdida de plegamiento, glicosilación, sobreexpresión o aberrantemente localizadas en las células tumorales. Por consiguiente, podemos hacer uso de esos autoanticuerpos como marcadores tumorales para el desarrollo de nuevas pruebas para el diagnóstico temprano de la enfermedad. El principal objetivo del estudio es determinar la presencia de autoanticuerpos contra Citoqueratina 19 y Cyfra 21.1 en sueros de pacientes con cáncer de pulmón cuya sobreexpresión ha sido previamente demostrada y proponer estos como potenciales marcadores de la enfermedad. Realizamos la amplificación de los genes que codifican para estas proteínas y se clonaron en el vector de expresión pET 101. Las proteínas recombinantes fueron expresadas y purificadas por purificación de afinidad y finalmente realizamos el ensayo de detección de autoanticuerpos por Western blot utilizando muestras de suero de pacientes con cáncer de pulmón y muestras de gente con alto riesgo de desarrollar la enfermedad tales como EPOC y fumadores. Se llevó a cabo la detección de autoanticuerpos contra Citoqueratina 19 en un 60% de los sueros de pacientes con cáncer de pulmón, 16% en sueros de personas con EPOC y 3% en sueros de personas fumadoras, a diferencia de Cyfra 21.1 donde la detección de autoanticuerpos no fue observada, a pesar de ser una de las principales proteínas que se encuentran sobreexpresadas en la mayoría de los casos de cáncer de pulmón. Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que la sobreexpresión de proteínas en cáncer de pulmón puede causar la producción de autoanticuerpos contras las proteínas sobreexpresadas.

Palabras Clave: Cáncer de pulmón; Biomarcadores; Sobreexpresión; Autoanticuerpos.

INTRODUCTION

Cancer figures among the leading causes of morbidity and mortality worldwide, with approximately 14 million new cases and 8.2 million cancer related deaths in 2012. The most common causes of cancer death are lung (1.51 million deaths), liver (745,000 deaths), stomach (723,000 deaths), colorectal (694,000 deaths), breast (521,000 deaths) and oesophageal cancer (400,000 deaths) [1]. The detection of lung cancer is often performed by X-ray, CT scan, biopsy or related primary tumor signs and symptoms, but when the cancer is detected, this is already in a very advanced stage and very few patients are cured with treatment [2,3]. Scientists have searched for specific tumor biomarkers for decades; these new biomarkers can be used clinically as markers for early detection of cancer and monitoring therapy or recurrent disease. A suitable cancer biomarker is a substance found in the body in an altered amount, implying that a certain type of cancer is present; ideally should be detectable in the blood or other body fluids which can be accessed in a non-invasive way [4]. It has been shown in recent years that circulating serum autoantibodies that react against intracellular proteins are not an exclusive feature of autoimmune and rheumatic diseases, since they have been found in a variety of diseases, including cancer. Still not completely clear how intracellular proteins become the target of autoantibodies, but has been suggested that post-translational modifications associated with aberrant cell death may increase immunogenicity under a pro-inflammatory environment. Other possibilities are that specific autoantigens such as fetal proteins are aberrantly expressed in tumor cells or overexpressed in abnormally high amounts in tissues affected by cancer cells, contributing to the loss of immune tolerance to these antigens [5]. Many researchers have been interested in the use of antibodies as serological markers for the diagnosis of cancer, especially due to the general absence of these autoantibodies in healthy individuals and on a non-cancer condition [6]. These antibodies have been

detected in the blood of patients, even five years before they developed the disease, long before CT scanner was able to detect a tumor. Consequently, monitoring of people with increased risk of developing lung cancer, by determining the presence of autoantibodies in the serum could allow early detection of the disease, thus allowing a timely therapeutic intervention [7].

METHODS

Propagation of the A549 cell line

The lung carcinoma cell line A549 was donated by Dr. Raul Barrera Rodriguez of the National Institute of respiratory diseases-SSA. Cells were grown in culture medium DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum and antibiotics (100U/ml penicillin and 100 g/ml streptomycin). The cells were maintained in an incubator at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO2.

RNA extraction and cDNA synthesis

RNA extraction from 10 million cells was performed using TRIzol® Reagent (Invitrogen) following the manufacturer's protocol. The cDNA was synthesized by RT-PCR using the SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix kit (Invitrogen) using the manufacturer's protocol.

Amplifying the genes encoding cytokeratin 19 and Cyfra 21.1

The amplification reaction was performed using the primers for Cyt-19 (sense primer 5´- C ACC ATG ACT TCC TAC AGC TAT CGC AGT C- 3´: antisense primer 5´- GAG GAC CTT GGA GCC AGA CAA ATT GTT GTA- 3´) and Cyfra 21.1 (sense primer: 5´- C ACC ATG CGA AGC CAATAT GAG GT- 3´: antisense primer 5´- GAG GAC CTT GGA GGC AGA C- 3´) using as template cDNA from the lung adenocarcinoma cell line A549.

Cloning of amplified sequences and transforming One Shot TOP10 Chemically Competent E. coli cells

The purification of DNA segments was performed using the QIAEX II Gel Extraction kit (QIAGEN) and the inserts were cloned using the Champion™cloning kit Directional TOPO Expression pET101 (Invitrogen). Finally, the one shot E. coli Top10 chemically competent cells provided in the kit were transformed following the manufacturer's protocol.

Transforming BL21 Star™ (DE3) One Shot® Cells and pilot expression.

Plasmid extraction was performed using the QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN). Analysis of positive transformants by PCR was performed and the amplified sequences were sent to National Laboratory of Genomic for Biodiversity (LANGEBIO) for sequencing. When plasmids containing the insert of interest were identified, the BL21 Star™ (DE3) One Shot® Cells provided in the kit were transformed and a protein pilot expression was performed using the manufacturer's protocol. The protein expression was analyzed by SDS-PAGE and the proteins were transferred to AmershamTM HybondTM- ECL nitrocellulose membrane (GE Healthcare). To end, we performed the Western blot using His-probe (H-3) mouse monoclonal IgG1 as primary antibody and Goat Anti-Mouse IgG (H-L)-HRP Conjugate (BIO-RAD) as secondary antibody. For the detection of proteins, the substrate HRP Color Development Reagent 4 CN (BIO-RAD) was used, using the manufacturer's protocol.

Expression and purification of recombinant proteins

The massive expression was performed using the same protocol as seen above. Subsequently, we performed the purification of the recombinant proteins using the nickel chelate columns Bio-ScaleTM ProfinityTM Cartridges IMAC (BIO-RAD), using the denaturing method provided by the manufacturer. Once the recombinant proteins were purified we proceeded to perform 2-D electrophoresis to verify the purity of the proteins using the ReadyStripTM IPG Strips 7 cm, pH 3-10 (BIO-RAD) [8]. The protein of interest was cut from the polyacrylamide gel and electroeluted using the 422 Electro-Eluter equipment and the eluted proteins were separated in a 12% polyacrylamide gel electrophoresis and stained with ProteoSilverTM Silver Stain Kit (SIGMA) using the manufacturer's protocol.

Autoantibody detection assay

The purified proteins were separated in a preparative 12% SDS-PAGE using the Mini-PROTEAN Tetra Cell (BIO-RAD). The separated proteins were then transferred to AmershamTM HybondTM- ECL nitrocellulose membrane (GE Healthcare) using the Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell equipment (BIO-RAD). The nitrocellulose membrane was cut in 2 mm strips and placed into Mini-Incubators Trays (BIO-RAD). The western blot was performed using as primary antibodies the lung cancer serum as well as serum from people with high risk to developing the disease as COPD and heavy smokers. As secondary antibody Goat Anti-Human IgG (H+L)-HRP Conjugate (BIO-RAD) was used and, for the detection of the reaction of antibodies, HRP Color Development Reagent 4 CN (BIO-RAD) was used as a substrate, using the manufacturer's protocol.

RESULTS

Amplifying the genes encoding Cytokeratin 19 and Cyfra 21.1

The amplification of genes that encode Cytokeratin 19 and Cyfra 21.1 was performed using cDNA from A549 cell line as template. Each sequence analyzed had the molecular weight consistent with the predicted size which was 1204 bp for Cytokeratin 19 (Figure 1A) and 451 bp for Cyfra 21.1 (Figure 1B).

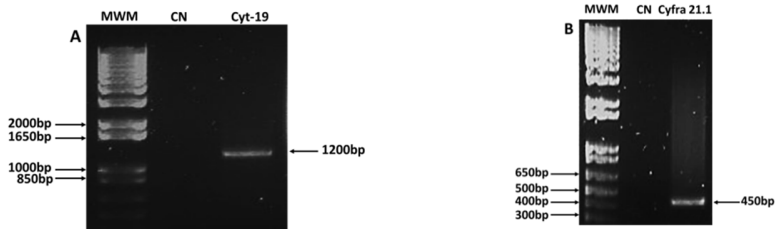


Fig 1. Cytokeratin 19 (A) and Cyfra 21.1 (B) gene amplification by PCR using Cyt-19 and Cyfra 21.1 primers and cDNA from the cell line A549 as template. The size of the amplified sequences (1200 bp for Cytokeratin 19 and 450 bp for Cyfra 21.1) matches with the expected sizes. Line 1: MWM 1Kb Plus DNA Ladder; Line 2: negative control; Line 3: amplified Cytokeratin 19 (A) and Cyfra 21.1 (B).

Cloning and expression of cytokeratin 19 and Cyfra 21.1 recombinant proteins

Once the inserts were cloned in the vector, induction of the recombinant proteins was performed. The result of the induction is shown in Figure 2A. Overexpression of the recombinant proteins is observed in the expected weight for cytokeratin 19, which is 48 kDa and 22 kDa for Cyfra 21.1. Subsequently, we performed a Western blot to confirm that antibodies react against the recombinant proteins (figure 2B).

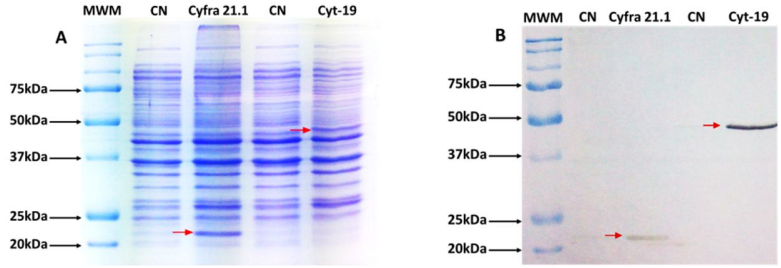


Fig. 2. (A) Coomassie stained 12% SDS-PAGE of bacterial lysate after protein expression. The arrows denote the presence of overexpressed proteins (22 kDa and 48 kDa). (B) A Western blot assay was used to detect the recombinant proteins Cytokeratin 19 and Cyfra 21.1 using commercial Anti-His antibodies.

Lane 1: molecular weight marker; lane 2 and 4: negative control; line 3 and 5: bacterial lysate after expression of Cyfra 21.1 and Cytokeratin 19.

Purification of cytokeratin 19 and Cyfra 21.1 recombinant proteins

The purification of the recombinant proteins was performed using nickel chelating columns. After the purification the fraction obtained was separated in a 12% polyacrylamide gel electrophoresis to verify the protein purity. Fig. 3A shows four fractions of each recombinant proteins obtained in the purification process.

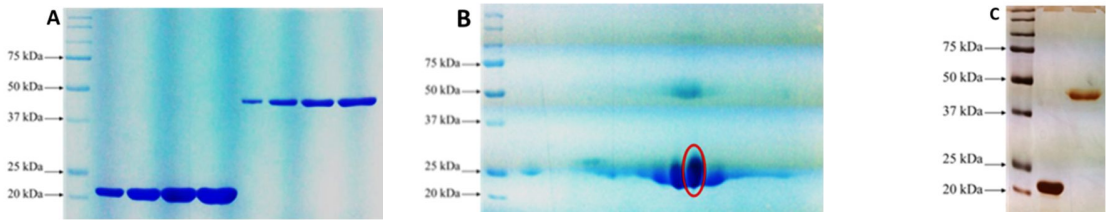


Fig. 3. (A) Fractions obtained from purification process. A 22 kDa Cyfra 21.1 and 48 kDa Cytokeratin 19 his tagged proteins were purified from the insoluble fraction using the standard Profinity IMAC denatured purification protocol. Lane 1: MWM Precision Plus Protein Unstained; Lane 2-5: Cyfra 21.1; Lane 6-9: Cytokeratin 19. (B) Coomassie stain of Cyfra 21.1 recombinant protein separated by 2-D gel electrophoresis. The red circle shows the protein that was removed for subsequent electroelution. MWM Precision Plus Protein Unstained. (C) Silver-stained SDS-PAGE gel of protein obtained by electroelution to verify the protein purity.

The purified proteins were separated in 2-D electrophoresis using 7 cm IPG strips pH 3-10 (Fig. 3B) and the protein more concentrated (red circle) was cut and electroeluted. The eluted proteins were analyzed by electrophoresis and the gel was stained with silver (Fig. 3C) determining by this way that the proteins were completely pure since another proteins were not observed in the gel.

Autoantibody detection assay

The presence of anti-Cytokeratin 19 and Cyfra 21.1 autoantibodies in the sera of lung cancer patients was determined by using recombinant human proteins, developed by our research group, as autoantigens. Fig. 4 shows the detection of anti-Cytokeratin 19 autoantibodies in lung cancer sera.

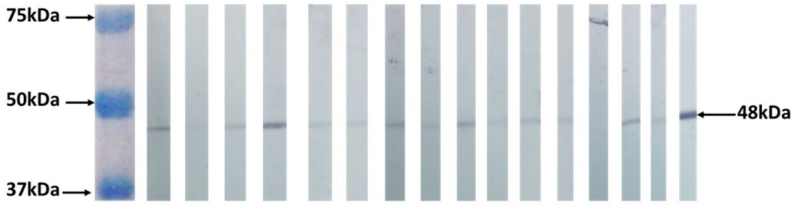


Fig. 4. Western blot detection of autoantibodies against recombinant human Cytokeratin 19 protein in the sera of lung cancer patients. Each line was in contact with sera from an individual subject. Lane 1: MWM Precision Plus Protein All Blue.

Autoantibodies to Cytokeratin 19 protein were detected more frequently in lung cancer patients (18/30; 60%) than in COPD subjects (5/30; 16%) and heavy smoker subjects (1/30; 3%). Unlike cytokeratin 19, reaction of autoantibodies against the recombinant protein Cyfra 21.1 was not observed.

DISCUSSION

It´s well known that the immune system can respond to cancer cells reacting against molecules that are unique in cancer cells such as tumor-specific antigens (TSAs) or against molecules that are expressed differently by cancer cells and normal cells as tumor-associated antigens (TAAs) [9]. There are a great number of studies that describe the presence of a humoral immune response (autoantibodies) to TAAs in solid tumors included lung cancer, and has been described the presence of these autoantibodies up to 5 years before symptomatic disease [7, 10]. Profiling cancer antigen–related autoantibodies has shown potential in early detection of lung cancer [11]. A previous study analyzed the humoral immune response in cancer patients, finding a humoral response against a wide variety of cellular and extracellular proteins. The more relevant proteins found in the study were derived from overexpressed or mutated proteins [12]. Based on the evidence that the overexpression of proteins can trigger a humoral response, the present work was developed for the searching of autoantibodies against Cytokeratin 19 and Cytokeratin 19 fragment Cyfra 21.1, whose overexpression in lung cancer has been previously demonstrated. Cytokeratin 19 is a member of the acidic type 1 (CK9-CK20) keratins. The main function of the keratins is to maintain the integrity of the epithelial cells because they constitute the cytoskeleton. It has been shown that full-length cytokeratin-19 is released by human tumor cells [13]. During apoptosis Cytokeratin 19 is cleaved by caspase 3 and the soluble fragment (Cyfra 21.1) is released by cancer cells [13, 14]. Cyfra 21.1 and some others proteins such as Neuro-Specific or Carcinoembryonic Antigens are commonly used in lung cancer diagnoses, however, it has been shown that none of these markers are optimal for the early detection of the disease [15, 16], hence the importance of searching for new sources of biomarkers such as autoantibodies against TAAs. In our study, the presence of autoantibodies against Cytokeratin 19 was detected in 18 out of 30 (60%) sera of patients with lung cancer. It has been demonstrated that autoantibodies against a particular TAA are found in only 10-30% of patients, and this is due to the heterogenic nature of cancer [17]. Regarding the control group, the presence of autoantibodies against Cytokeratin 19 was detected in 5 out of 30 (16%) sera of COPD subjects and 1 out of 30 (3%) sera of heavy smokers. Accordingly, several studies have demonstrated the presence of autoantibodies in 0-3% of sera controls [12]. In the case of COPD group, the autoantibodies detection frequency against Cytokeratin 19 is above the reported in the literature and this could be because some patients may already be developing carcinogenesis. This was corroborated with follow up on some patients and was discovered that some of them developed lung cancer. Unlike cytokeratin 19, autoantibodies against Cyfra 21.1 were not detected in the three groups of study, despite of be one of the major overexpressed proteins in the majority of lung cancer cases. To our knowledge, this is the first report that approaches Cytokeratin 19 and Cyfra 21.1autoantibodies detection in sera of lung cancer patients.

CONCLUSION

Our study demonstrated the presence of autoantibodies against Cytokeratin 19 in lung cancer patient sera. However, this does not mean that this protein can be used as biomarker alone, because a single autoantibody test lacks the sensitivity and specificity required for cancer diagnosis; nevertheless autoantibodies test against Cytokeratin 19 could be used altogether with a stablished panel for detection of lung cancer to increase sensitivity and specificity of that panel.

REFERENCES

[1] Torre, L., Bray, F., Siegel, R., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., Jemal, A. (2015), "Global Cancer Statistics, 2012", CA: A Cancer Journal for Clinicians, 65 (2): 87-108.

[2] Sun, Z., Fu, X., Zhang, L., Yang, X., Liu, F., Hu, G. (2004) "A protein chip system for parallel analysis of multi-tumor markers and its application in cancer detection", Anticancer Research, 24: 1159-1166.

[3] Beckles, M.A., Spiro., S.G., Colice, G.L., Rudd, R.M. (2004) "Initial Evaluation of the Patient With Lung Cancer. Symptoms, Signs, Laboratory Tests, and Paraneoplastic Syndromes", Chest, 123: 97S-104S.

[4] Seibert, V., Ebert, M., Buschmann, T. (2005) "Advances in clinical cancer proteomics: SELDI-ToF-mass spectrometry and biomarker discovery", Briefings in functional genomics and proteomics, 4: 16-26.

[5] Casiano, C.A., Varela, M.M., Tan, E.M., (2006) "Tumor-associated Antigen Arrays for the Serological Diagnosis of Cancer", Molecular and Cellular Proteomics, 5(10): 1745-1759.

[6] Zhang, J.Y., Casiano, C.A., Peng, X.X., Koziol, J.A., Chan, E., Tan, E.M. (2003) "Enhancement of Antibody Detection in Cancer Using Panel of Recombinant Tumor-associated Antigens", Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention, 12: 136 – 143.

[7] Murray, A., Champman, C.J., Healey, G., Peek, L.J., Parsons, G., Balwin, D., Barnes, A., Sewell, H.F., Fritsche, H.A., Robertson, F.R. (2010) "Technical validation of an autoantibody test for lung cancer", Annals of Oncology, 21: 1687–1693.

[8] Berkelman, T., Stenstedt, T., Bjellqvist, B., Laird, N., McDowell, M., Olsson, Ingmar., Westermier, Reiner. (1998) "2-D Electrophoresis using immobilized pH gradients. Principles and Methods", Amersham Biosciences, 57-73.

[9] Finn, O.J. (2008) "Cancer Immunology", The New England Journal of Medicine", 358: 2704-2715

[10] Chapman, C.J., Murray, A., McElveen, J.E., Sahin, U., Luxemburger, U., Türeci, Ö., Wiewrodt, R., Barnes, A.C., Robertson, J,F. (2008) " Autoantibodies in lung cancer: possibilities for early detection and subsequent cure", Thorax 63 (4): 228-233.

[11] Wu, L., Chang, W., Zhao, J., Yu, Y., Tan, X., Su, T., Zhao, L., Huang, S., Liu, S., Cao, G. (2010) "Development of Autoantibody Signatures as Novel Diagnostic Biomarkers of Non–Small Cell Lung Cancer", Clinical Cancer Research, 16 (14): 3760-3768.

[12] Reuschenbach, M., Doeberitz, M., Wentzense, N. (2009) "A systematic review of humoral immune responses against tumor antigens", Cancer Immunolog, Immunotherapy, 58 (10): 1535-1544.

[13]cAlix-Panabiéres, C., Vendrell, J.P., Slijper, M., Pelle, O., Barbotte, E., Mercier, G., Jacot, W., Fabbro, M., Pantel, K. (2009) "Full-length cytokeratin-19 is released by human tumor cells: a potential role in metastatic progression of breast cancer" Breast Cancer research, 11(3): 1-10.

[14] Dohmoto, K., Hojo, S., Fujita, J., Yang, Y., Ueda, Y., Bandoh, S., Yamajo, Y., Ohtsuki, Y., Dobashi, N., Ishida, T., Takahara, J. (2001) "The role of Caspase 3 in producing Cytokeratin 19 fragment (Cyfra 21.1) in human lung cancer cell lines", International Journal of Cancer, 91(4): 468-473.

[15] Xiao, T., Ying, W., Li, L., Hu, Zhi., Ma, Y., Jiao, L., Ma, J., Cai, Y., Lin, D., Guo, S., Han, N., Di, X., Li, M., Zhang, D., Su, K., Yuan, J., Zheng, H., Gao, M., He, J., Shi, S., Li, W., Xu, N., Zhang, H., Liu, Y., Zhang, K., Gao, Y., Qian, X., Cheng, S. (2005) "An Approach to Studying Lung Cancer-related Proteins in Human Blood", Molecular & Cellular Proteomics, 4: 1480–1486.

[16] Zhang, Y., Ying, X., Han, S., Wang, J., Zhou, X., Bai, E., Zhang, J., Zhu, Q. (2012) " Autoantibodies against insulin-like growth factor binding protein-2 as a serological biomarker in the diagnosis of lung cancer", international Journal of Oncology, 42 (1): 93-100.

[17] Tong Tang, H., Low, J., Gee Lim, S., Chung, M. (2009) "Serum autoantibodies as biomarkers for early cancer detection", The FEBS Journal, 276: 6880-6904.

DETOXIFICATION ENZYMES INVOLVED IN TRICLABENDAZOLE RESISTANCE IN *Fasciola hepatica*

(Enzimas detoxificantes involucradas en la resistencia de *Fasciola hepatica* al triclabendazol)

Estefhan Miranda-Miranda[a], Raquel Cossío-Bayúgar[a], Juan Diego Pérez-De la Rosa[b], Bernardo Sachman-Ruiz[a*+].

[a] Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria, INIFAP. Boulevard Cuauhnáhuac No 8534 Col. Progreso. CP 62550. Jiutepec, Morelos México.

[b] Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal, SENASICA- SAGARPA. Boulevard Cuauhnáhuac No 8534 Col. Progreso. CP 62550. Jiutepec, Morelos México.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: sachman.bernado@inifap.gob.mx

Área del Conocimiento: Biotecnología Clínica.

ABSTRACT
The ubiquitous enzymes carboxylesterases (CE) are part of xenobiotic metabolizing enzymes in most invertebrate species, an important metabolic pathway for anthelmintic resistance in different species of parasitic helmints. The liver fluke *Fasciola hepatica,* causative agent of fasciolasis, affects most of the species of domestic animals and humans, *F. hepatica* exhibit abundance of CE activity reported in the literature, however very little scientific information is available regarding CE on triclabendazol (TCBZ) resistance or its assessment as a marker for fasciolicide resistance diagnosis, an important problem for livestock health control and treatment of human fasciolasis. The objective of this study was to assess TCBZ resistant compared to susceptible laboratory-cultured *F. hepatica* reference strains, considering as a hypothesis that CE are in part responsible for TCBZ resistance. Crude extracts from adult flukes were analyzed by PAGE CE zymograms, and CE specific activity measurements by biochemical procedures. A 90 kDa. band containing most of the enzyme activity ranked at 2500-6000 enzyme units/mg of protein by Gomori's assay for susceptible and TCBZ resistant respectively, was found in both strains under denaturing SDS-PAGE, however when the proteins were sorted by charge under non-denaturing PAGE, the 90 kDa band split into seven different isozymes each exhibiting a different electrophoretic retention factor (Rf), which combined showed a distinctive zymogram pattern for each strain. Statistically significant differences ($P<0.001$ Student test) were found in CE expression and densitometric zymograms produced distinctive patterns for TCBZ susceptible and resistant parasites. Our results suggest that CE play an important role on TCBZ resistance exhibited by *Fasciola hepatica* in Mexico and the CE clinical values may be used for anthelintic resistance diagnosis of the liver fluke, this type of diagnostics, is urgently required at livestock facilities and hospitals for a better administration of existing anthelmints on TCBZ resistant liver fluke populations.

Keywords: Fasciolasis, Anthelmintic resistance, parasitosis, triclabendazole.

RESUMEN

Las enzimas carboxilesterasas (CA), presentes de manera ubicua en la gran mayoría de los metazoarios, son parte de un sistema detoxificante metabólico que a menudo se asocia con la resistencia a pesticidas y medicamentos en plagas de interés agrícola y parásitos de animales y humanos. La duela hepática es el agente causal de la fasciolasis, enfermedad que afecta gravemente el parénquima y las vías biliares de la mayoría de los animales de interés pecuario y el hombre. Se ha descrito una creciente resistencia de *Fasciola hepatica* a el único fasciolicida de uso veterinario autorizado en México cuya fórmula se baza en el triclabendazol (TCBZ), pero no hay estudios sobre el papel que las enzimas detoxificadoras de xenobiontes y las CA en particular, jueguen en el mecanismo de resistencia de la duela hepática al TCBZ. Es el objetivo de este trabajo el analizar el papel de las CA, tomando como hipótesis de trabajo el que las CA juegan un papel el este proceso de resistencia. Se usaron extractos crudos de cepas suceptibles y resistentes al TCBZ, que se analizaron como zimogramas en geles de poliacrilamida procesados electroforéticamente (PAGE), bajo condiciones nativas y desnaturalizantes y por actividad específica por procedimientos espectrofotométricos. Se identificó una banda de 90 kDa. Que se dividió en siete isozimas al someterse a PAGE nativo cada una exhibiendo un diferente factor de retención (Rf) que combinado mostraron un patrón característico para parásitos resistentes y susceptibles. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P<0.001$ prueba se Student) en la expresión de CE medido por densitometría. Nuestros resultados sugieren que las CE juegan un papel como enzimas detoxificantes del TCBZ y la expresión característica de CE en los parásitos resistentes encontrada durante este estudio, puede servir como ensayo diagnóstico de la resistencia de la duela hepatica al TCBZ en explotaciones pecuarias, rastros y hospitales para hacer un mejor manejo de los fasciolicidas sobre poblaciones de F. hepatica resistentes al TCBZ.

Palabras Clave: Fasciolasis, resistencia, parasitósis, triclabendazol.

INTRODUCCIÓN

La fasciolasis es provocada por el trematodo parásito equinostómido *Fasciola hepatica* que afecta gravemente el parénquima hepático y bloquea las vías biliares de equinos, bovinos, ovinos, caprinos, cerdos, conejos y humanos (Scarcella et al 2012, 2015., Miranda et al 1994, 1995). La fasciolasis es catalogada por la OMS como la más descuidada de las helmintiasis zoonóticas, ya que es ignorada por las campañas de salud de la mayoría de los países, pese a que afecta a 17 millones de personas a nivel mundial y 91 millones de personas más se encuentran en áreas endémicas con el riesgo de contraerla (Scarcella et al 2015). Dado que *F. hepatica* parasita a la mayoría de los animales de interés pecuario, también afecta de manera adversa a la industria ganadera causando pérdidas mundiales por alrededor de cuatro millones de dólares ¿al año? (Scarcella et al 2012). En México existen reportes de prevalencias de hasta el 70 % en animales sacrificados en rastros ubicados en algunos estados, con el consecuente decomiso de vísceras y carne declaradas no aptas para el consumo humano (Miranda et al 1994, 1995). Si bien en México no existen faciolicidas autorizados para el tratamiento de las personas parasitadas, la fasciolasis del ganado es tratada principalmente con triclabendazol (TCBZ), que es un derivado halogenado del tiol-benzimidazol (Miranda et al 1994). Los trematodos parásitos metabolizan TCBZ mediante su complejo de Enzimas Metabolizantes de Xenobióticos (EMX) y la exposición de *F. hepatica* a productos antiparasitarios ha generado resistencia y/o tolerancia al TCBZ en varias regiones del mundo (Scarcella et al 2012, 2015). El complejo EMX incluye enzimas tales como Citocromo P-450,

Monoxigenasas dependientes de flavina, Alcohol y aldehído deshidrogenasas, Glutatión S transferasas y Carboxilesterasas (Scarcella et al 2015), que protegen a los helmintos de la acción tóxica de los xenobióticos naturales y actualmente constituyen la primera defensa de los parásitos contra los compuestos antihelmínticos (Miranda-Miranda et al 2006, 2008). Existe la necesidad de estudiar el papel de estas enzimas con el fin de diseñar procedimientos diagnósticos que permitan identificar los niveles de resistencia y el papel que estas enzimas juegan en otras rutas metabólicas que susceptibles de ser atacadas por nuevos compuestos faciolicidas. Este estudio analiza el papel de la EMX carboxil esterasa en cepas susceptibles y resistentes al TCBZ de la duela hepática por procedimientos de densitometría de zimogramas digitalizados.

METODOLOGÍA

Cepas de helmintos

Se utilizaron diferentes cepas de *F. hepatica* resistente y susceptible a triclabendazol proporcionadas por el SENASICA/SAGARPA, las cuales han sido identificadas y seleccionadas por su resistencia y/o suceptibilidad a compuestos antihelmínticos.

Extractos

Se utilizaron helmintos pesados en lotes de 100 mg y macerados en 1ml de Solución Salina Amortiguadora de Fosfatos pH 7.2 (SSAF). El extracto se centrifugó a 14,000 g durante 5 minutos y al sobrenadante se le determinaró el contenido protéico acorde al método de Bradford. Los extractos así obtenidos se almacenaron en alícuotas de 50 µl a -20 ˚ C.

Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS

Se utilizó el método descrito previamente (Miranda et al 2008) en geles de 100 X 82 X 1.5 mm con 15 pozos de muestras con 75 µg de proteína de extracto por cada pozo. La separación electroforética se hizo a 15 mA durante 90 min.

Zimogramas

Los geles de poliacrilamida se sumergieron en una solución de agua-tritón X-100 al 2.5% con agitación durante 15 min. y 2 lavados posteriores en SSAF-triton X 100 al 0.2% para detectar esterasas, los geles así preparados se sumergieron en solución de substrato, siguiendo las metodología previamente descrita (Miranda et al 2004), hasta la aparición de bandas. Los zimogramas obtenidos se registraron digitalmente en un procesador de imágenes Epichem (UVP Life Sciences).

Densitometría

Se procesaron las imágenes digitales de cada gel en la modalidad de densitometría del paquete de programas de computadora LabWorks 4.0 (UVP Life Sciences. www.uvp.com) y se calibró el densitómetro para cuantificar la densidad óptica de cada banda enzimática obtenida. Las densitometrías se conjuntaron para complementar las zimografías junto con la Movilidad Electroforética Relativa (Rf) y Masa Molecular (MM), para lo cual se utilizaron las proteínas marcadoras de MM preteñidas Page Ruler (Fermentas Life Sciences www.fermentas.com) con un rango de 11 a 170 kDa que se separaron simultáneamente con los extractos de trematodos para formar una curva de calibración de MM, a partir

de la cual el programa de computadora se calibraró para hacer de manera automática el cálculo de la Rf, la correspondiente MM así como la Densidad óptica de cada banda presente en los zimogramas.

RESULTADOS

Los extractos de *F. hepatica* exhibieron abundante actividad de esterasas, con una actividad enzimática específica de 2500 U/mgP para los helmintos susceptibles y 6000 U/mgP para los resistentes enzimáticas diferencias que fueron estadísticamente significativas por la prueba t de Student ($P<0.001$). Los zimogramas detectaron una sola banda de 90 kDa. Que una vez separada por isoelectroenfoque, origina un patrón zimográfico distintivo para los estadios de desarrollo analizados mostrando cuatro y ocho isozimas para las cepas resistente y susceptibles respectivamente (Tabla 1), lo que sugiere que las esterasas cumplen una función en el metabolismo detoxificador del TCBZ en los trematodos resistentes. Los análisis densitométricos también mostraron que las diferentes isozimas tienen una actividad enzimática específica distintiva para las diferentes cepas lo que refuerza la hipótesis de que la actividad de esta enzima modula la resistencia del parásito al TCBZ.

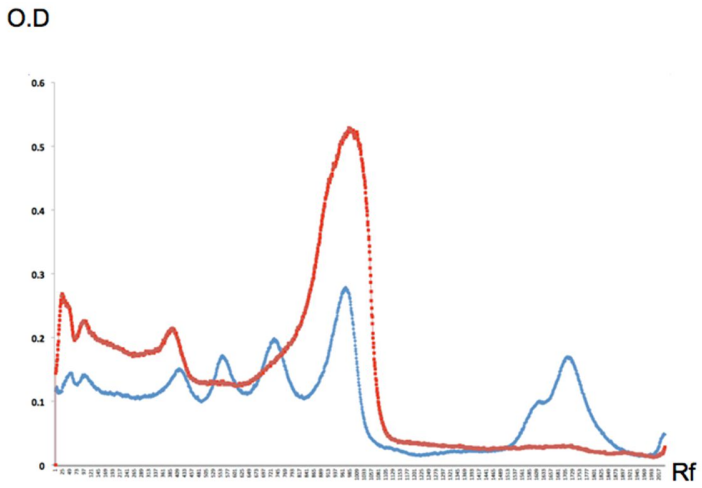


Figura 1. Densitograma de patrón zimográfico. Las diferente bandas de esterasas del zimograma se representan como picos y la gráfica representa la densidad óptica (O.D.) en el eje X y la migración electroforética relativa (Rf) en el eje Y. La línea roja representa la cepa resistente y la azul representa la cepa susceptible al TCBZ.

Tabla 1. Relación de isozimas de 90 kDa detectadas por densitometría de zimogramas digitales de las esterasas encontradas en cepas suceptibles y resistentes al TCBZ. Se indican las movilidades electroforética relativas de cada una (Rf) así como la actividad enzimática específica de cada una de ellas (U/mgP).

BANDA DE 90 KDa	SUSCEPTIBLE 2500U/mgP	RESISTENTE 6000 U/mgP
ISOZIMA RF 0.8476	D.O. 0.189 Act. 965 U/mgP	----------
ISOZIMA RF 0.4804	D.O. 0.282 Act. 825 U/mgP	D.O. 0.582 Act. 5620 U/mgP
ISOZIMA RF 0.3632	D.O. 0.205 Act. 105 U/mgP	----------
ISOZIMA RF 0.2790	D.O. 0.170 Act. 69 U/mgP	----------
ISOZIMA RF 0.1972	D.O. 0.157 Act. 400 U/mgP	D.O. 0.221 Act. 190 U/mgP
ISOZIMA RF 0.0488	D.O. 0.142 Act. 31 U/mgP	D.O. 0.252 Act. 97 U/mgP
ISOZIMA RF 0.03125	D.O. 0.120 Act. 24 U/mgP	D.O. 0.272 Act. 93 U/mgP

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

Las carboxil esterasas son una de las enzimas más importantes del sistema EMX que se ha reportado como involucrado en la resistencia de otros parásitos a los productos antiparasitarios (Scarcella et al 2015). Las diferencias estadísticamente significativas en la actividad enzimática específica de esterasas encontradas entre cepas, sugiere que en la duela hepática resistente al TCBZ, las esterasas juegan un papel importante. Esta premisa se refuerza al constatar que existen diferentes isozimas con diferentes niveles de actividad catalítica lo que sugiere que las isozimas distintivas de la cepa resistente se han seleccionado para contrarrestar la toxicidad del TCBZ. Nuestros resultados también sugieren que el análisis densitométrico de zimogramas digitalizados de esterasas en *F. hepática,* puede ser usado como ensayo diagnóstico de la resistencia de este importante parásito a los fasciolicidas.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por recursos fiscales del INIFAP proyecto 911132001

REFERENCIAS

[1]Scarcella S., Miranda-Miranda E., Solana M. V. and Solana H. Approach to molecular characterization of different strains of Fasciola hepatica using random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. Parasitol Res. 2015 Apr; 114(4):1341-5. doi: 10.1007/s00436-015-4310-9

[2]Scarcella S, Miranda-Miranda E, Cossío-Bayúgar R, Ceballos L, Fernandez V, Solana H. Increase of carboxylesterase activity in Fasciola hepatica recovered from triclabendazole treated sheep. Mol Biochem Parasitol. 2012. 185:151-153

[3]Miranda-Miranda. E y García-Vazquez Z. 1994. Aislamiento e identificación in situ de antígenos de *Fasciola hepatica*. Vet, Mex. 25(3): 267-281. Miranda-Miranda. E. y García-Vazquez Z. 1995. Identificación de antígenos de diferentes fases de desarrollo de *Fasiola hepatica*. Tec. Pecu. Mex. 33(1): 8-15.

[4]Miranda-Miranda E, Zamora-Ruiz A, Cossio-Bayugar R. 2009. Molecular cloning and expression of a

Caenorhabditis elegans cathepsin b-like protease. Biotechnology 8(2): 242-247.33.

[5]Miranda-Miranda E, Murillo-Sánchez MH, Cossío-Bayúgar R. 2008. Expression of a *Haemonchus contortus* cysteine protease in the baculovirus system". Electronic Journal of Biotechnology. 10(4): 49-55

[6]Miranda-Miranda E Liébano-Hernandez E. López-Arellano M.E.; Mendoza-de-Gives P; Cossío- Bayúgar R. 2006. Marcadores enzimáticos como indicadores de resistencia a los antihelmínticos en el nematodo parásito gastroentérico de rumiantes *Haemonchus contortus*. Bioquimia 31(1). p. 6-12

HOMOLOGIES PHYLOGENETIC 3 BETA-HYDROXYSTEROID DEHYDROGENASE, IN FINDING OTHER SOURCES TO CLINICAL TREATMENT

(Homologías filogenéticas de la 3 beta-hidroxiesteroide dehydrogenasa, en la búsqueda de otras fuentes para tratamiento clínico)

María Del Rosario Díaz Rodríguez[a*], Luz Adriana Vizcaíno-Rodríguez[a], Vania S. Farías Cervantes[a], Alejandro Brena-Becerril[a+]

[a] Universidad Politécnica de la Zona Metropolitana de Guadalajara.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: abrena.upzmg.ibt@gmail.com

Área del Conocimiento: Biotecnología clínica.

ABSTRACT
5α-Dihydrotestosterone, o Dihidrotestosterona abbreviated as 5α-DHT or (DHT) androstanolone according to INN, is an androgen, biologically active metabolite of the hormone testosterone, synthesized primarily in the prostate, testes, hair follicles and adrenal glands by the enzyme 5α-reductase. This enzyme reduces the 4,5 double bond of testosterone hormone. Illustrating the significance of a DHT for the development of secondary sexual characteristics such is congenital deficiency disease called 5-alpha-reductase, which can cause pseudohermaphroditism. Elevated levels of DHT in women may cause the development of androgynous male sexual characteristics in them, including a deepening of the voice or presence of facial hair. DHT plays a role in the development and exacerbation of benign prostatic hyperplasia, prostate cancer as well as by extending this gland. This paper is intended to use a sequence of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase from Homo sapiens, to search for homologies in different species to form groups and find relationships between them and create a taxonomic-evolutionary approach. To do this using the sequences DHT *Brucella canis, Pseudomonas fluorescens, Escherichia coli, Roseobacter litoralis,* as probes and a collection of sequences obtained by screening the database with PSI-BLAST. The analysis process was to search for homologous sequences with BLAST, the multiple alignment using Clustal programs and Bioedit, phylogenetic tree generation and editing relations with MEGA 4.

Keywords: 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase, 5α-Dihydrotestosterona, seudohermafroditismo, cáncer.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

COMPARISION OF SPECIFICITY AND SENSITIVITY OF SECUNDARY ANTIBODIES DEVELOPED IN EGG AND GOAT FOR INMUNOLOGICAL APPLICATIONS

(Comparación de la especificidad y sensibilidad de anticuerpos secundarios desarrollados en huevo y cabra para aplicaciones inmunológicas)

Daniela Rivera Martinez[a], Jorge Isaac Castro Aldrete[b], Carlos Ordoñez Sánchez[b], Abel Gutierrez Ortega[c], José Carlos Vega Sánchez[c], Deyanira Berenice López Dimas[c], Jorge Bravo Madrigal[c+].

[a] Universidad Autónoma de Guadalajara. AV. Patria 1201, Lomas del Valle, 45129, Zapopan, Jalisco, Mexico.
[b] Casal's international S.A. de C.V. Av. Manuel Avila Camacho 1888, Jardines del country, Guadalajara, Jalisco, Mexico.
[c] Biotecnología Médica y Farmacéutica. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A. C. Av. Normalistas No. 800 Colinas de la Normal, 44270, Guadalajara, Jalisco, México.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: jbravo@ciatej.mx

Área del Conocimiento: Biotecnología Clínica.

ABSTRACT
Antibodies or immunoglobulins are glycoproteins responsible for detection and protection against various infectious agents. It is important to know that the antibodies are effective due to their ability to recognize protein patterns in the Antigen, called epitopes. Knowing this principle immunological detection tests, have been designed such as ELISA tests, or Western blot tests. These techniques are based on the principle of union Antigen-antibody, which acts as a target of recognition of a secondary antibody attached to an enzyme that reflects a recognition of the Antigen sought. To be able to detect the presence or absence of the antigens of interest, it is important to consider that the antibodies must be both sensitive and specific. A disadvantage of the use of antibodies is their high cost either production or import. In this sense there is an attractive alternative, based on generating IgY antibodies to egg with better performance and cheaper processes. This project considered assess specificity and sensitivity and detect if it is similar or better than that obtained with mammalian IgG antibodies, such as secondary antibodies in an ELISA or Western blot test. Our hypothesis is that IgY antibodies recognize with greater specificity and sensitivity to antigens in comparison of an antibody developed in goat. To determine the above was to purify 2 antibodies obtained goats and eggs of laying hens subject to a scheme of immunization with the same antigen. Sensitivity and specificity were determined by comparing the ability of recognition of antigens and non. Preliminary results showed feasibility in the isolation and purification of immunoglobulins, on the other hand are ongoing results of sensitivity and specificity that will compare the advantages of each type of antibody.

Keywords: IgY; ELISA; Antibody; Goat IgG; ELISA specificity and sensitivity.

HYPOGLYCEMIC EFFECT OF AN ETHYL ACETATE EXTRACT FROM THE ROOT OF *Ibervillea sonorae* (S.Watson) Greene

(Efecto hipoglucémico de un extracto de acetato de etilo de la raíz de *Ibervillea sonorae* (S.Watson) Greene)

David Luna Orea [a]*, Minarda De la O Arciniega [b], Claudia Velázquez González [b], Mariano Martínez Vázquez [a]

[a] Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria. Delegación Coyoacán, 04510, México D.F .
[b] Instituto de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Circuito Ex hacienda La Concepción, Km 1.5, San Agustín Tlaxiaca, Hgo. CP. 42160

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: Lunaoread@gmail.com

Área del Conocimiento: BIOTECNOLOGÍA CLÍNICA.

ABSTRACT
It is very well known that type 2 diabetes mellitus (DM-2) is associated with several diseases. The pharmacological treatment to treat DM-2 incorporates α–glycosidase, insulin secretagogues and others. However, none of these drugs can fully restore the health of patients, even more they can exert undesirable side-effects. So, there is a need to find new anti-diabetic drugs with better pharmacological profile and less side-effects. Among the Mexican medicinal plants with history as anti-diabetic remedies highlight *Ibervillea sonorae* known as "Wereque". Recently has been suggested that an aqueous extract of this species induces the glucose uptake in human adipocytes by activating a PI3K-independent pathway. The authors proposed that hydrosoluble compounds such Gallic acid are the responsible of the biological activity. Nevertheless, the objective of this study was assessment the anti-diabetic properties of a root EtOAc extract of *I. sonorae*. 32 eight-week-old Wistar rats weighing 200-220 g were divided into a diabetic control group (DCG), and metformin (Met, 100 mg/kg), EtOAc extract (Ext, 100 mg/kg) and BMC (100 mg/kg) treatments group (n=8). The rats were injected IP with streptozotocin. After 12 hours of fasting, the rats orally received glucose (2000 mg/kg). Blood glucose (BG) was quantified at 0, 15, 30, 60, 90, 120, and 180 min. BG increased from 15 to 30 min after the glucose administration. Although all treatments at 90 min diminish BG, however, only the Met group was significantly different from DCG. At 120 min both Met ($p<0.01$) and BMC ($p<0.05$) decreases significantly BG and at 180 min all treatments Met ($p<0.01$), BMC ($p<0.01$) and Ext ($p<0.05$) decreases significantly BG. There were not significant difference between all treatment groups. It is worth to note that a chemical analyses demonstrate that EtOAc extract is constituted mainly by two cucurbitacin-type triterpenes.

Keywords: *I. sonorae*; Wereque; diabetes; hypoglycemic.

RESUMEN
La Diabetes *mellitus* es un grupo de alteraciones metabólicas que representa un grave problema de salud pública. El tratamiento farmacológico resulta costoso y presenta efectos adversos. En la medicina tradicional mexicana se conocen aproximadamente 300 especies vegetales usadas para el tratamiento de la DM, entre éstas destaca *Ibervillea sonorae* (S. Watson) Greene (*I. sonorae*), popularmente conocida como "Guareque" y cuya raíz posee un efecto hipoglucémico al ingerirse como infusión. Aunque se conoce su constitución de los extractos (glicósidos de cucurbitacina) y su efecto hipoglucémico, aún queda por establecer qué metabolitos son los responsables de esta actividad biológica. Tomando en cuenta lo anterior, se decidió estudiar las posibles propiedades hipoglucémicas de los extractos y metabolitos secundarios mayoritarios obtenidos de *I. sonorae*. Los extractos de la raíz se obtuvieron con hexano, acetato de etilo y metanol. La cromatografía en columna abierta del extracto de AcOEt permitió el aislamiento de una mezcla binaria de cucurbitacinas (MBC). Mientras tanto, 4 grupos (n=8) de ratas *Wistar* fueron inducidas a la Diabetes ($p<0.01$) mediante una inyección de estreptozotocina (65 mg/kg vía IP). La evaluación de la actividad biológica se realizó mediante una prueba de tolerancia a la glucosa oral. Se administró una sola dosis de extracto, MBC y metformina (100 mg/kg, C/U), además de una solución glucosada (2000 mg/kg). Cuantificando la glucosa a los 0, 15, 30, 90, 120 y 180 min después de la administración. Nuestros resultados muestran un efecto hipoglucémico estadísticamente significativo del grupo tratado con metformina ($p<0.05$) 90 min después de la administración. A 120 min se observó un efecto en los grupos MBC, extracto y metformina ($p<0.05$, $p<0.05$ y $p<0.01$ respectivamente). A los 180 min después no existe diferencia significativa ($p<0.01$) entre la actividad de los animales tratados con metformina y aquellos tratados con MBC y el extracto de acetato de etilo.
Palabras Clave: *I. sonorae*; Wereque; diabetes; hypoglycemic.

INTRODUCCIÓN
La diabetes mellitus (DM) es un grupo de alteraciones metabólicas que tienen como principal síntoma la hiperglucemia. Resultado de la incapacidad del organismo para poder mantener la glucosa dentro de las concentraciones adecuadas [1]. La hiperglucemia crónica favorece la reacción no enzimática de moléculas de glucosa con especies reactivas de oxígeno, proteínas y lípidos. Que resultan en la alteración o inhibición de sus funciones biológicas a la vez que aumenta el riesgo de diversas patologías, principalmente enfermedades cardiovasculares, neuropatías, retinopatías, nefropatías así como, alteraciones en el sistema inmune [2].

En la actualidad se dispone de una amplia gama de medicamentos para el tratamiento de la diabetes. Sin embargo, pocos son aquellos fármacos capaces de contrarrestar los signos derivados de la diabetes sin que sus efectos secundarios o colaterales no supongan un peligro para la salud. Aunado a esto, la DM requiere de tratamientos que precisan de un gasto permanente paciente-gobierno [3,4]. Es por ello que, numerosos remedios herbolarios no comprobados son ampliamente utilizados por la población mexicana [5,6]. De ahí que, la raíz de Ibervillea sonorae (S. Watson) Grenne (I. sonorae), perteneciente a

la familia Curcubitaceae y conocida popularmente como “Wereque” tiene importantes usos etnobotánicos como hipoglucemiante al ingerirse como infusión de acuerdo con la medicina tradicional [7,8].

El objetivo de este proyecto fue evaluar la actividad hipoglucémica de los compuestos presentes en un extracto orgánico de la raíz de *I. sonorae* en el modelo de rata *Wistar* macho diabeticos. La diabetes en estos animales fue inducida con estreptozotocina (STZ). El extracto de AcOEt se sometió a un proceso cromatográfico obteniéndose una mezcla binaria de glicósidos de cucurbiacinas (MBC).

Se evaluó el efecto hipoglucémico tanto del extracto AcOEt como de la MBC en una curva de tolerancia a la glucosa. El extracto AcOEt mostró actividad inferior al fármaco control (metformina) cuyo efecto se mantuvo hasta 2 h posteriores a la administración. La MBC mostró un efecto tardío que, sin embargo, se extendió hasta 3 h posteriores a la administración.

En conclusión, los resultados del estudio sugieren algunos glicósidos de curcubitanos presentes en la raíz *I. sonorae* poseen la propiedad antihiperglucemica en el modelo de rata *Wistar* diabetica. No obstante que es bien conocida que este modelo tiene ciertas limitaciones al simular una alteración como la diabetes, no obstante sus resultados marcan la pauta para futuras investigaciones con metabolitos secundarios derivados de la raíz de *I. sonorae* en modelos de diabetes más complejos.

METODOLOGÍA

MATERIAL VEGETAL

La colecta de especímenes de *I. sonorae* se realizó en el estado de Sonora. La clasificación taxonómica la realizaron en el herbario MEXU del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México en donde se depositó el respectivo ejemplar. También se depositaron ejemplares en el herbario de plantas medicinales del Seguro Social y en el herbario de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México.

EXTRACCIÓN

La raíz fue secada, triturada y posteriormente sometida a maceración sucesiva y exhaustiva con disolventes con características polares diferentes (hexano [Hx], acetato de etilo [AcOEt] y metanol [MeOH]). Se retiró el disolvente mediante evaporación a presión reducida y se obtuvieron los extractos calculando su rendimiento en relación al peso neto de la raíz. Se obtuvieron los perfiles cromatográficos que fueron comparados con especímenes de *I. sonorae* colectados en el estado de Sonora.

AISLAMIENTO DE LOS COMPUESTOS PRESENTES EN EL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO DE *I. sonorae*

El aislamiento y purificación de los compuestos se realizó por medio de un sistema de cromatografía abierta en columna (CC) empacada con sílice, (tamaño de partícula, 0.063-0.200 mm). Se colocaron 30 g del extracto AcOEt en una CC. Los análisis cromatográficos en capa fina (TLC, por sus siglas en inglés), tanto analíticos como preparativos se realizaron siguiendo las técnicas convencionales. Los grupos de fracciones obtenidas fueron depuradas y posteriormente analizadas mediante las técnicas espectrométricas convencionales. Caracterizando su naturaleza y propiedades químicas.

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

En este experimento se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar (200-220 g). Mismos que se mantuvieron una temperatura de 22±2 °C, una humedad relativa del 30- 40% y a ciclos de luz/oscuridad

12/12 h. El cuidado de los especímenes se realizó bajo los lineamientos de la "International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals 2012".

Los especímenes fueron asignados al azar en 4 grupos (n=8) de la siguiente manera: grupo diabético sin tratamiento ó Control Negativo (CN), grupo diabético tratado con metformina ó Control Positivo (CP), grupo diabético tratado con el extracto AcOEt (GE) y el grupo diabético tratado con una mezcla binaria de cucurbitacinas (MBC, GM).

INDUCCIÓN A LA DIABETES NO INSULINO DEPENDIENTE

Se modificó la técnica establecida en 1976 por Ganda y colaboradores [9]. Para la inducción a la diabetes se utilizó STZ disuelta en solución salina isotónica como medio vehículo. Preparándose la solución a 6°C previo a la administración. La solución se administró vía intraperitoneal a una sola dosis de 65 mg/kg. Se llevó un seguimiento en el desarrollo de la hiperglucemia mediante la determinación de la concentración de glucosa sanguínea en los días 0, 3, 5 y 10. La hiperglucemia se estabilizó entre los días 5 y 10.

Para la determinación de glucosa en sangre, los especímenes fueron sometidos a un ayuno previo de 10-11 h. La sangre se obtuvo a partir de la punta de la cola del ratón mediante un corte sutil (1mm) en la zona apical, desechándose las primeras gotas (3-5). Esta técnica se manejó bajo condiciones de asepsia. La cuantificación se realizó por medio de un glucómetro "One touch ultra" de Johnson y Johnson® por el método de glucosa oxidasa.

EVALUACIÓN DEL EFECTO HIPOGLUCÉMICO DE UNA MEZCLA BINARIA OBTENIDA DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO EN UN MODELO DE DIABETES INSULINODEPENDIENTE.

Para la evaluación del efecto hipoglucémico se realizó una Curva de Tolerancia a la Glucosa (CTG). Se administró a manera intraperitoneal una solución de glucosa en solución salina a una dosis de 2000 mg/kg. Inmediatamente después, se administró vía oral la metformina (100 mg/kg), el extracto AcOEt (100 mg/kg) y la MBC (100 mg/kg) en los grupos CP, GE y GM respectivamente. Utilizando siempre agua destilada como medio vehículo. Se cuantificó la concentración de glucosa previa a la administración (tiempo 0) y a los 15, 30, 90, 120 y 180 minutos después de la administración.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó la prueba paramétrica de Análisis de Varianza Multifactorial entre Grupos (ANOVA) de una vía seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett utilizando el programa GraphPad Prism versión 6.00. Considerándose el valor de $p<0.05$ como estadísticamente significativo.

RESULTADOS

La colecta de *I. sonorae* se realizó en el ejido de Cumuripa-Porvenir, municipio de Jaqueme, en el estado de Sonora, México. La identificación la realizaron especialistas en la materia. Depositando los ejemplares en las colecciones de los herbarios de la Facultad de Ciencias (registros FCME-104682, FCME-110481), en el Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (registros MEXU-1209152 Y MEXU-1209153) y en el herbario del Instituto Mexicano del Seguro Social (registros IMSSM-15219 y IMSSM-15220).

Inicialmente se pesó 1 Kg de la raíz completa que, después de ser seca y triturada se obtuvo un peso neto de 560 g (56%). La maceración sucesiva con los diferentes disolventes proporciono 19 g del extracto Hx (1.9%), 55.63 g del extracto AcOEt (5.56%) y 138 g del extracto MeOH (13.8%). El rendimiento porcentual se obtuvo en relación al peso inicial de la raíz. La CC del extracto AcOEt proporciono 6 reuniones principales que fueron analizados por medio de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) en fase reversa acoplado a un detector UV con absorbancia a 254 nm (Figura 1) [10]. Para la evaluación de la actividad hipoglucémica se escogió la fracción con mejor relación rendimiento-pureza, utilizando la Reunión 2 (R2) con 3.625 g (0.36%) y una pureza aparente de 92.89%.

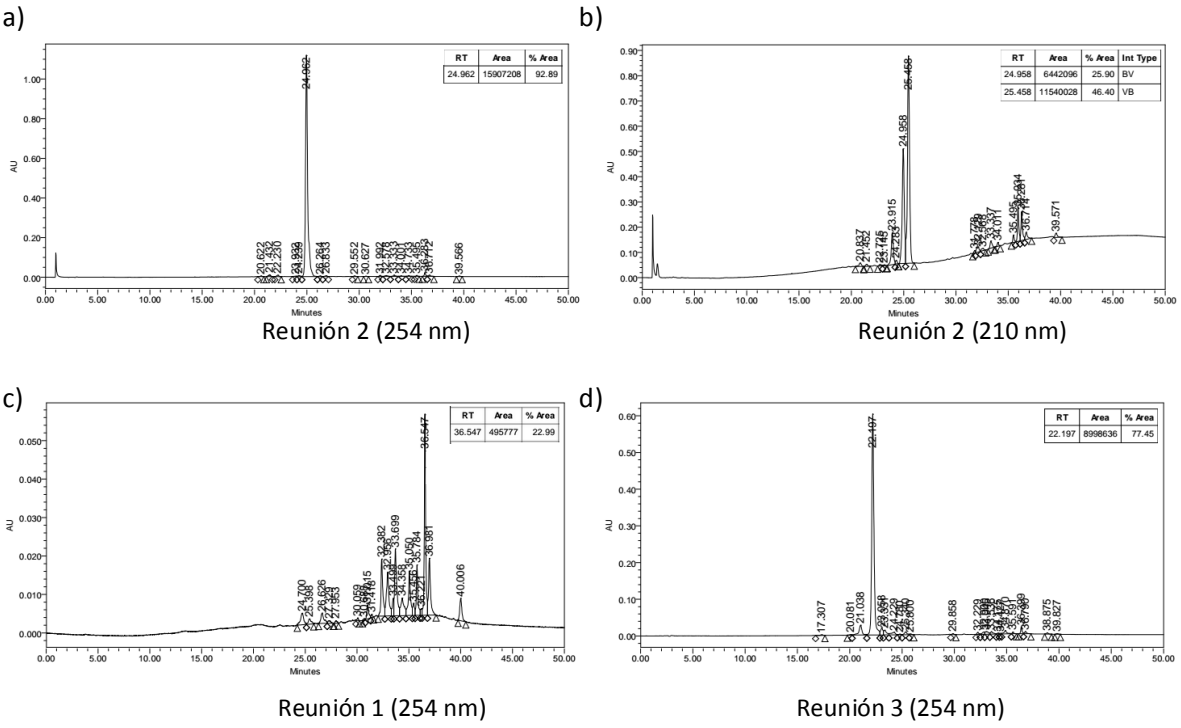


Figura 1. Perfiles cromatográficos de las reuniones derivadas del extracto AcOEt. Reunión 2 a) y b) observadas a 254 y 210 nm respectivamente; y reuniones 1 y 3, correspondientes a c) y d) respectivamente.

En el modelo de inducción a la diabetes. Los especímenes mostraron hiperglucemia desde el tercer día posterior a la administración. No obstante, las pruebas biológicas realizaron a partir del onceavo día. Como se observa en la figura 2, durante la CTG, la glucosa basal fue la media de 270 mg/dL en todos los grupos. Después de la administración de la solución glucosada y los tratamientos respectivos, se observó un incremento en la glucosa que se extendió hasta 90 min después (412 y 375 mg/dL para el extracto y el compuesto binario respectivamente). A los 120 min la glucosa disminuyó en el grupo compuesto a 386 mg/gl pero no para el extracto (429 mg/dL). Solo hasta los 180 min la glucosa sanguínea disminuyó en ambos grupos 375 y 325 mg/dl para el extracto y compuesto respectivamente.

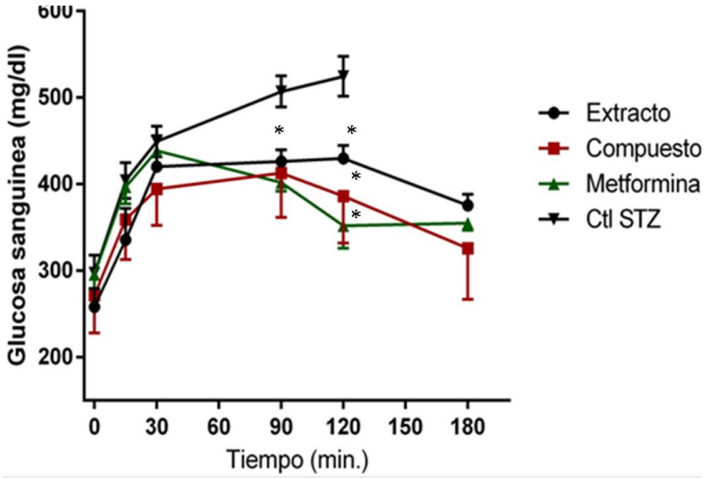


Figura 2. Curva de tolerancia a la glucosa oral

Efecto de la MBC, extracto AcOEt y metformina sobre el perfil glucémico en una prueba de tolerancia a la glucosa oral en rata macho *Wistar* inducida a la diabetes con STZ con 10-12 h de ayuno. Los valores se muestran como la media ± la desviación estándar n=8

DISCUSIONES

Los espectros fueron adquiridos bajo las mismas condiciones de acuerdo con las propiedades de cada extracto. Las múltiples fracciones derivadas de la CC fueron reunidas considerando la polaridad y pureza de cada fracción que finalmente se obtuvieron 6 reuniones. Cada reunión se analizó por separado encontrando la R2 con el mayor grado de pureza y rendimiento (Figura 1).

Si bien el perfil cromatográfico de R2 muestra un pico cuya densidad de absorbancia corresponde al 92.89% de la muestra a 254 nm (ideal para detectar cucurbitacinas) [12]. A una absorbancia de 210 nm (ideal para detectar agliconas) se observaron dos picos con densidades de absorbancia correspondientes al 25.9 y 46.4 % con menos de un minuto de diferencia en el tiempo de retención. A pesar de no poder dilucidar su estructura química, el espectro de RMN H' confirma la presencia de 2 compuestos tipo cucurbitano.

Como la mayoría de las especies de la familia Cucurbitaceae, se sabe que *I. sonorae* produce glicósidos de cucurbitano [11]. Estas moléculas poseen sabor amargo, algunos pueden ser venenosos [12]. A pesar del bajo grado de pureza que se observa en el espectro cromatográfico (Figura 1, a)) el espectro de RMN (no incluido) muestra impurezas que se interpretan como una combinación de dos o más compuestos. Por consiguiente, se analizó nuevamente en HPLC fase reversa a una absorbancia UV de 210 nm (Figura 1 b), en donde se observa una mezcla binaria, de glicósidos de curcubitanos. De esta mezcla binaria se obtuvieron 3,623 mg, obteniendo un rendimiento del 3.62% con respecto al peso total de la raíz.

Investigaciones previas demuestran los efectos de diversos extractos obtenidos de la raíz de *I. sonorae* sobre el perfil glucémico y lipídico [13]. Tal es el caso del extracto evaluado. Sin embargo, existe controversia entre los posibles mecanismos propuestos, mientras algunas investigaciones previas sugieren la presencia necesaria de insulina para obtener un efecto significativo, otros han observado en cultivos celulares dos vías distintas. Mecanismos dependientes e independientes a la activación de la fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K, por sus siglas en inglés) [14, 15].

Como se observa en nuestros resultados (Figura 2), aunque la media de la actividad biológica de la MBC se muestra inferior no resulta significativa al compararlo con los datos de AcOEt o metformina. Sin embargo, su efecto se observa hasta los 180 minutos, en comparación con el grupo de metformina cuyo efecto se mantiene hasta los 120 minutos mismo que decrece a los 180 minutos.

Otras investigaciones han demostrado que algunos metabolitos secundarios (compuestos tipo cucurbitano) presentes en *Momordica charantia* (*Cucurbitacea)* poseen un efecto hipoglucémico al observar la activación de la AMPK favoreciendo, entre otras cosas, el incremento de la translocación del trasportador de glucosa tipo 4 (GLUT4, por sus siglas en inglés) [16]. Lo anterior nos lleva a suponer que, dada las propiedades estructurales de la MBC y su efecto hipoglucémico, que si bien es significativo con respecto al control, es similar a los efectos de AcOEt y metformina. Y además, so se observa la misma actividad que tendría la insulina [17]. La cascada de señalización mediada por la AMPK pudiera estar implicada en la actividad biológica de la MBC.

CONCLUSIONES

Nuestros resultados sugieren que los glicósidos de cucurbitacinos presentes en la mezcla binaria y en el extracto AcOEt de *I. sonorae* poseen actividad hipoglucémica similar al efecto biológica de la metformina. Sin embargo, por limitaciones del modelo empleado en este experimento, es necesario plantear un modelo con el objetivo de evaluar otros parámetros que caracterizan a la DM.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACyT por la beca otorgada David Luna Orea (CVU: 596696), estudiante de Doctorado en Ciencias Biomédicas-UNAM.

REFERENCIAS

[1] American Diabetes Association. (2015). “Standards of medical care in diabetes 2015”. Diabetes Care, 38(1); S5

[2] Varun Parkash S, Anjana B, Nirmal S, and Amteshwar Singh J. (2014). “Advanced Glycation End Products and Diabetic Complications”. Korean *J* Physiol Pharmacol; 18(1): 1–14.

[3] E. Menéndez-Torre E, *et al.* (2011). “Recommendations for the pharmacological treatment of hyperglycaemia in type 2 diabetes”. Consensus document. Nefrologia; 31(1): 17-26.

[4] International Diabetes Federation. (2014). "Diabetes Atlas Sixth edition [idf.org]". Brussels; International Diabetes Foundation (Belgium);[Acceso 10 de Agosto 2015]. [2 p.]. Disponible en: http://www.idf.org/sites/default/files/Atlas-poster-2014_ES

[5] Pérez LDCN, Reyes SA, El Haya C. (2002). "Flora útil del municipio de Astacinga, Veracruz, México". Polibotánica; (14): 67-84.

[6] Andrade-Cetto A, Heinrich M. (2005). "Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. J Ethnopharmacol; 99(3): 325-48.

[7] Banderas-Dorantes T, Román-Ramos R, Zamilpa A, García-Macedo R, Díaz-San Miguel M, Campos – María G, Tortoriello-Garcia J, Alarcón-Aguilar F. (2012). "Influence of two hypoglycemic Cucurbitaceae (Cucurbita ficifolia Bouché and Ibervillea sonorae Greene) on ATP-sensitive potassium channels in rat aortic rings". BLACPMA; 11(6): 510-519.

[8] Alarcon-Aguilar FJ, Calzada-Bermejo F, Hernandez-Galicia E, Ruiz-Angeles C, Roman-Ramos R. (2005). "Acute and chronic hypoglycemic effect of Ibervillea sonorae root extracts-II". J Ethnopharmacol; (3):447-452.

[9] Ganda O, Rossini A, Like A. (1976). "Studies on Streptozotocin Diabetes". Diabetes; 25: 595-603.

[10] Oleszek WA. (2002). "Chromatographic determination of plant saponins". J Chromatogr A; 967(1):147-62.

[11] Achenbach. (1993). "Cucurbitanes and cucurbinate-type glycosides from *Ibervillea sonorae"*. Phytochemistry; 3: 437.

[12] Kaushik U, Aeri V, Mir SR. (2015). "Cucurbitacins - An insight into medicinal leads from nature". Pharmacogn Rev.; 9(17): 12-18.

[13] Rivera-Ramirez F, Escalona-Cardoso G, Garduño-Siciliano L, Galaviz-Hernández C, Paniagua-Castro N. (2011). "Antiobesity and hypoglycaemic effects of aqueous extract of Ibervillea sonorae in mice fed a high-fat diet with Fructose". Biomed Biotechnol; 968984.

[14] Hernández-Galicia1 E, Calzada F, Roman-Ramos R, Alarcón-Aguilar FJ. (2007). "Monoglycerides and Fatty acids from Ibervillea sonorae Root: Isolation and Hypoglycemic Activity". Planta Med; 73(3): 236-240.

[15] Zapata-Bustos R, Alonso-Castro A, Gómez-Sánchez M, Salazar-Olivo L. (2014). "*Ibervillea sonorae* (Cucurbitaceae) induces the glucose uptake in human adipocytes by activating a PI3K-independent pathway". J Ehnopharmacol. 152(3); 546-552.

[16] Tan MJ, Ye JM, Turner N, Hohnen-Behrens C, Ke CQ, Tang CP, Chen T, Weiss HC, Gesing ER, Rowland A, James DE, Ye Y. (2008). "Antidiabetic Activities of Triterpenoids Isolated from Bitter Melon Associated with Activation of the AMPK Pathway". Chemistry and Biology; 15(3): 263–273.

[17] Menéndez Torre E, Lafita Tejedor J, Artola Menéndez S, *et al*. (2011). "Recommendations for the pharmacologic treatment of hyperglycemia in type 2 diabetes. Consensus document". Nefrologia; 31(1): 17-26.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

KCNH2 POTENTIAL NEW BIOMARKER OF PROSTATE CANCER

(*KCNH2* potential nuevo biomarcador de cáncer de próstata)

Irene Mendoza-Lujambio[a*+], Eleazar Lara-Padilla[a], Guadalupe Cleva Villanueva-López[a], Gerardo Abraham Encinas-Almirudis[a], Iván Bazán-De Santillana[a], Rosaura Palma Orozco[b].

[a] Departamento de Posgrado, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional.
[b] Escuela Superior de Cómputo, Instituto Politécnico Nacional.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: ireneml2005@gmail.com

Área del Conocimiento: Biotecnología Clínica.

ABSTRACT

Background and Aims. Prostate cancer (PC) is one of the leading causes of death from cancer in males worldwide. If PC is detected early, it has a high survival rate. Unfortunately, over 90 % of all cases are adenocarcinomas and 70 to 80% originate in the periphery, thus, symptoms usually appear later in the disease. Therefore, the diagnosis of PC is usually made in advanced stages, in which the treatment is only palliative. The present study aims to demonstrate the overexpression of the *KCNH2* gene in human prostate cancer biopsies and its role as a potential novel marker for this type of cancer. **Methods.** We studied *KCNH2* expression by qRTPCR in human prostate cancer samples and normal human prostate tissue. *KCNH2* immunohistochemistry was performed in both prostate cancer and normal tissue. **Results.** *KCNH2* was found overexpressed in 88.5% of all tumor samples, whereas no overexpression could be observed in normal prostate tissue. Furthermore, KCNH2 protein could be observed only in PC cells while normal cells showed no staining. In fact, overexpression of this gene was found related to the degree of malignancy of the tumor (according to Gleason's Score) being highly prevalent and overexpressed in samples from patients with advanced tumor stages. **Conclusions.** It was demonstrated for the first time that KCNH2 can be a high sensitive marker for prostate cancer at the mRNA and protein level.

Keywords: Prostate cancer, *KCNH2* Potassium Channel; Biomarker, overexpression.

RESUMEN

Antecedentes. El cáncer de próstata (CP) es la neoplasia maligna más frecuente en el género masculino a nivel mundial. Si el CP se detecta a tiempo, tiene una alta tasa de sobrevida. Desafortunadamente, más del 90% de todos los casos son adenocarcinomas y el 70 al 80% se origina en la periferia, por lo que los síntomas usualmente aparecen tardíamente e la enfermedad. Por lo tanto, el diagnóstico de CP se hace generalmente en etapas avanzadas, en las que el tratamiento es únicamente paliativo. Este estudio tiene como objetivo demostrar la sobreexpresión del gen *KCNH2* en biopsias de cáncer de próstata de

humano y su papel como un potencial nuevo marcador para este tipo de cáncer. **Metodología.** Estudiamos la expresión de *KCNH2* en muestras de CP de humano por qRTPCR y en tejido prostático normal. La inmunohistoquímica de *KCNH2* se realizó tanto en CP como en tejido prostático normal. **Resultados**. Se encontró la sobreexpresión de KCNH2 en el 88.5% de todas la muestras de CP, mientras que no se pudo observar sobreexpresión en tejido prostático normal. Lo que es más, la proteína de KCNH2 pudo observarse sólo en células de CP mientras que las células normales no mostraron tinción. De hecho, se encontró que la sobreexpresión de este gen se relacionó con el grado de malignidad de los tumores (de acuerdo a la escala de Gleason) encontrándose altamente prevalente y sobreexpresado en muestras de pacientes con etapas tumorales avanzadas. **Conclusiones**. Se demostró por primera vez que KCNH2 puede ser un marcador altamente sensible de cáncer de próstata a nivel de RNAm y de proteína.

Palabras Clave: Cáncer de próstata, Canal de potasio *KCNH2*, Biomarcador,sobreexpresión.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de próstata (CP) es el tipo de cáncer más común en hombres y es la segunda causa más frecuente de muerte entre los hombres en México [1]. Desafortunadamente, en nuestro país, el 70-75% del diagnóstico de CP se realiza en etapas avanzadas, en las cuales el tratamiento sólo es paliativo [2-3]. No existen marcadores tempranos para el CP, ya que el antígeno prostático específico (APE) que es el marcador sérico de tumor más comúnmente usado en el CP no es muy preciso ni absolutamente confiable, ya que se puede encontrar aumentado en procesos diferentes al CP, además, tiene una muy limitada precisión para predecir el desarrollo clínico y patológico del CP [4-5]. Por esta razón, es imperativo encontrar marcadores moleculares capaces de detectar el CP en etapas pre-invasivas o tempranas.

METODOLOGÍA

Se efectuó un estudio transversal, analítico, prospectivo con 26 biopsias de pacientes adenocarcinoma de próstata confirmado por histopatología y el mismo número de muestras control. Se determinó la expresión del gen *KCNH2* con el cDNA obtenido de estas muestras por qRTPCR utilizando Sondas TaqMan, y se realizó inmunohistoquímica en cortes histológicos de CP.

RESULTADOS

Se encontró una sobreexpresión del gen *KCNH2* en el 88.46% de las muestras de CP, mientras que no existió sobreexpresión de este gen en tejido prostático normal. La Figura 1 describe la expresión cualitativa de los genes en muestras de CP sobre la expresión del gen en tejido prostático normal comparando Tumor contra Tejido Normal: T/N.

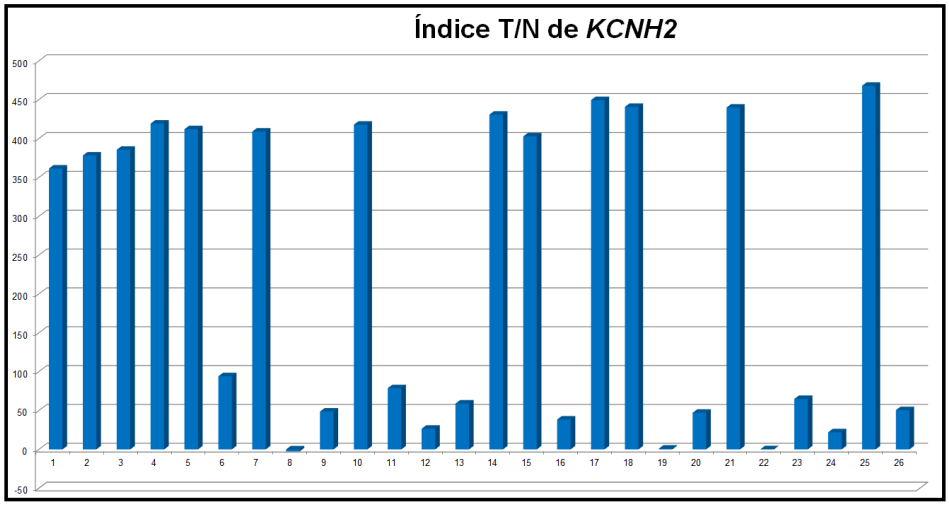


Figura 1. Índice Tumor/Tejido Normal (T/N) de *KCNH2*. Gráfica del nivel de expresión cualitativa (*fold change*) de *KCNH2* en muestras de CP en comparación a la expresión del gen en tejido prostático normal.

Se obtuvieron 23 de las 26 muestras analizadas (88.46%) positivas a la sobreexpresión del gen *KCNH2*. De éstas 23 muestras, 10 (38.46%) presentaron sobreexpresión moderada a baja entre 3-10 (□□C_T) o una sobreexpresión de *KCNH2* de 22 a 79 veces más (Figura 1). 13 (50%) presentaron una sobreexpresión alta del gen entre 43-56 o de 361 a 468 veces más (Figura 1), en comparación con la expresión del gen en próstata normal (Figura 2).

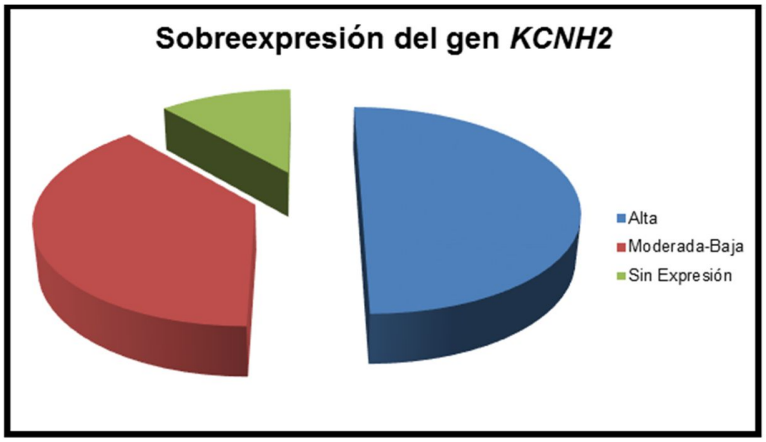


Figura 2. Sobreexpresión del gen *KCNH2* en biopsias de CP. 23 muestras (88.46%) fueron positivas a la sobreexpresión del gen, 10 (38.46%) presentaron sobreexpresión moderada a baja, de entre 3-10 (DDC_T) o una sobreexpresión de *KCNH2* de 22 a 79 veces más (Índice T/N) y 13 (50%) sobreexpresión alta del gen, de entre 43-56 (DDC_T) o de 361 a 468 veces más (Índice T/N).

La sobreexpresión de este gen se encontró relacionada al grado de malignidad de la neoplasia y se observó una alta sobreexpresión predominante en muestras de pacientes con etapas avanzadas del tumor. Asimismo, fue posible ver que la sobreexpresión de *KCNH2* se relacionó con los niveles de APE, aunque en algunas ocasiones los niveles de expresión superaron ampliamente a los de APE (Figura 3 y Tabla 1).

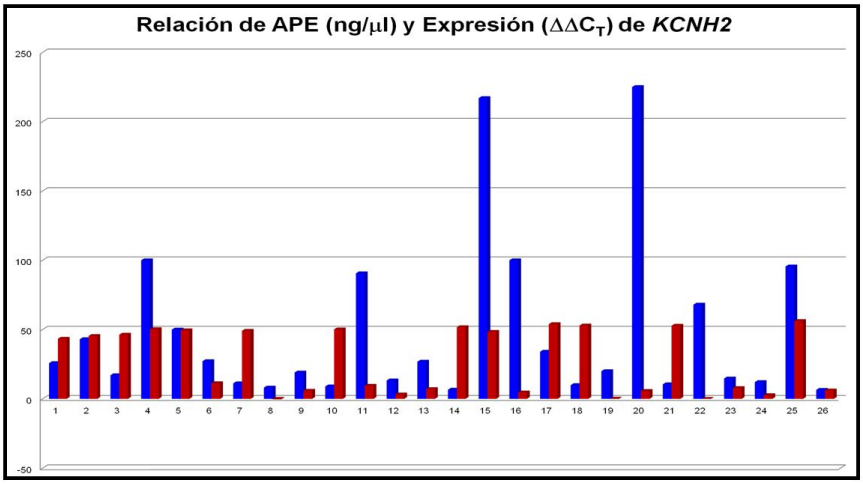


Figura 3. Relación de los niveles de APE (□□CT, columna azul) en ng/□l con los niveles de expresión (columna roja) DDC$_T$ del gen *KCNH2*.

Tabla 1. Distribución de pacientes según pronóstico (escala de Gleason) y relación con el rango de expresión de *KCNH2.*

Escala de Gleason	Número de pacientes	APE (ng/µl)		Expresión de *KCNH2* (Rango)
		Rango	Media	
Buen pronóstico (2-4)	3	13.29 – 34	24.36	3.2 – 53.94
Pronóstico intermedio (5-7)	15	6.5 – 100	32.53	-0.31 – 52.79
Mal pronóstico (8-10)	8	9.9 – 225	87.49	0.12 – 56.16

Con respecto a la inmunohistoquímica, la Figura 4 muestra señales positivas (color café) con el anticuerpo policlonal Anti-KCNH2 en células de adenocarcinoma de próstata.

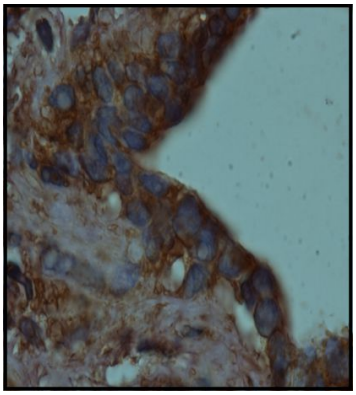


Figura 4. Inmunohistoquímica para la proteína del gen *KCNH2*. Se puede observar la sobreexpresión de la proteína KCNH2(color café) en un corte de tejido tumoral de CP, los núcleos están en color morado. Aumento de 100X.

CONCLUSIONES

Se encontró una sobreexpresión del gen KCNH2 en el 88.46% y de las muestras de CP, mientras que no existió sobreexpresión de los mismos genes en tejido normal.
Los resultados de este estudio nos presentan fuerte evidencia de que la expresión del gen y la proteína de *KCNH2* se encuentra alterada en cáncer de próstata, lo que sugiere que este gen puede ser un nuevo biomarcador en cáncer de próstata. Son necesarios futuros estudios para determinar la potencial utilidad diagnóstica/pronóstica de este gen.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto ha sido financiado por la Secretaría de Investigación y Posgrado (SIP) del Instituto Politécnico Nacional con el registro No. 20150260. El alumno BDSI, es alumno del Programa BEIFI del IPN.

REFERENCIAS

[1] Jiménez-Ríos, M., Solares-Sánchez, M., Martínez-Cervera, P., et al. (2011). “Cáncer de Próstata. Oncoguía”. Cancerología. 6: 13-18.

[2] Dirección General de Información en Salud (DGIS). Base de datos de egresos hospitalarios por morbilidad en Instituciones Públicas, 2004-2009. (2009). Sistema Nacional de Información en Salud (SINAIS). Secretaría de Salud.

[3] Cheng, H., Lin, D., Yu, E. (2012), “Advanced clinical states in prostate cancer”. Urol Clin North Am. 39: 561-71.

[4] Chodak, G. (1994), “The role of watchful waiting in the management of localized prostate cancer”. J Urol. 15: 1766-8.

[5] Schmidt, J., Mettlin, C., Natarajan, N., et al. (1986) “Trends in patterns of care for prostatic cancer. 1974-1983: results in surveys by the American College of Surgeons”. J Urol. 136: 416-21.

DESING AND DEVELOPMENT OF AN IMMUNE-NANOCONJUGATE WITH POTENTIAL UTILITY FOR TREATMENT OF HER2 POSITIVE BREAST CANCER

(Diseño y desarrollo de un Inmune-Nanoconjugado con uso potencial en el tratamiento de cáncer de mama HER2 positivo)

Alma Rosa Oaxaca-Camacho*[a], Alexis Jazmín Preciado Pelayo[a], Vivechana Agarwal[b], Luis Felipe Jave-Suarez[c], Adriana Aguilar-Lemarroy[c], Arturo González Robles[d], Francisco Muñoz-Valle[c], Pedro Mondragon[a], Rodolfo Hernández Gutiérrez[a].

[a] CIATEJ/CONACYT-Unidad de Biotecnología Médica y Farmaceutica. Av. Normalistas No. 800, Col. Colinas de la Normal, Guadalajara, Jalisco, México.
[b]CIICAP/UAEM – Unidad de Materiales . Av. Universidad 1001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos.
[c] CIBO/IMSS,- Unidad de inmunología. Sierra Mojada 800, Col. Independencia, Guadalajara, Jal.
[d] IIB/CUCS-Infectónica y patogénesis. Universidad de Guadalajara. Sierra Mojada 950, Col. Independencia, Guadalajara, Jal.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: almave15@hotmail.com

Área del Conocimiento: Biotecnología Farmacéutica

ABSTRACT
Malignant diseases represent 25% of the cause of death in developed countries. Colorectal, breast, prostate and lung cancer are the most common types of neoplasies. In the actually, for the majority of patients with advanced stage of cancer, the treatment is limited to chemotherapy or radiation, which are very invasive and uncomfortable for the patients. However, these therapies can cause several alteration in the health. Breast cancer is a disease that has increased considerably in recent years in worldwide. Treatments based on chemotherapy are often too aggressive and don't have cell selectivity hence attacks healthy cells, which is reflected as a substantial deterioration in health of patients. The use of porous silicon nanoparticles conjugated with monoclonal antibody "Trastuzumab" (immune-nanoconjugates) specific against the HER2 protein present on the surface of HER2+ breast cancer cells (who constitutive 25-30% of all breast cancers occur in women) promises to be a useful tool for the subsequent development of an effective therapy. The objective of the present work was to develop an inmune-nanoconjugate using EDC method and confirmed by using Infrared Spectroscopy (FTIR) and Dynamic Light Scattering (DLS), and formation by perform Dot-Blot assays and Flow Cytometry. The results obtained allowed us to confirm that it's possible to obtain an immune-nanoconjugate with the capacity for joining HER2+ cells, these results suggest that these compound can be used as drugs immune-nanocarrier with specific affinity for tumor cells expressing a marker on the cellular surface, and could serve as a more effective way of diagnostic and/ or treatment of these disease because drugs may be released only in the near region of the tumor without affecting healthy cells.

Keywords: nanoparticles of porous silicon, monoclonal antibody, immune-nanoconjugate.

RESUMEN
El 25 % de muertes en países desarrollados se debe a las enfermedades malignas, tales como: cáncer de mama, colorrectal, próstata y de pulmón, siendo estos los más comunes en neoplasias. En la actualidad, la mayoría de los pacientes se presentan en etapas avanzadas de cáncer, por lo que el tratamiento es limitado a uso de quimioterapia o radioterapia, que son muy invasivos e incomodos para los pacientes, causado varias alteraciones en su salud. El cáncer de mama es una enfermedad que se ha ido incrementando considerablemente en los últimos años en todo el mundo. Los tratamientos basados en quimioterapia suelen ser demasiado agresivo y no tienen selectividad celular, por lo tanto, ataca las células sanas, lo que se refleja como un deterioro sustancial en la salud de los pacientes. El uso de nanopartículas de silicio poroso conjugados con un anticuerpo monoclonal "Trastuzumab" (inmune-nanoconjugado) específicos contra la proteína HER2+, la cual se encuentra en la superficie de células de cáncer de mama (se encuentra sobre expresada de un 25-30% en cáncer de mama para mujeres), promete ser una herramienta útil como una terapia eficaz. El objetivo del presente trabajo fue desarrollar un inmune-nanoconjugado utilizando el método de carbodiimida (EDC) y confirmado por espectroscopia infrarroja (FTIR) y dispersión dinámica de luz (DLS). Para confirmar la formación del inmune-nanoconjugado se empleó la técnica de Dot-Blot, Citometría de flujo. Los resultados obtenidos nos permitieron confirmar que es posible obtener un inmune-nanoconjugado con la capacidad de unirse a las células HER2+, estos resultados sugieren que los compuestos se puede utilizar como medicamentos inmuno-nanotransportador con afinidad específica para las células tumorales que expresan un marcador en la superficie celular, y que podría servir como una forma más eficaz de diagnóstico y / o tratamiento de estas enfermedades, porque pueden cargar con fármacos los cuales pueden ser liberados sólo en la región cerca del tumor sin afectar a las células sanas.

Palabras Clave: nanopartículas de silicio poroso, anticuerpo monoclonal, inmune-nanoconjugado.

INTRODUCCIÓN
El cáncer de mama es la primera causa de muerte por neoplasia en la mujer en el ámbito mundial con cerca de 500 mil decesos cada año, de las cuales el 70% ocurre en países en desarrollo. En cuanto a la magnitud actual del cáncer de mama en México, a partir de 2006 éste ocupa el primer lugar de mortalidad como tumor maligno en las mujeres mayores de 25 años, desplazando de esa posición al cáncer cervicouterino [1]. Una vez que se ha detectado esta enfermedad, el tratamiento más común es la quimioterapia. Durante la fase inicial de la quimioterapia, un fármaco anticanceroso mata la mayoría de las células cancerosas. Sin embargo, no todas las células mueren y las células cancerosas que sobreviven pueden volverse resistentes no sólo a los fármacos que eran utilizados anteriormente para el tratamiento, sino también a muchos fármacos con mecanismos distintos contra el cáncer [2].
La proteína HER2/neu se encuentra sobre-expresada entre en un 25%-30% del total de los cánceres de mama; y se sabe que el oncogén HER2/neu está directamente asociado con la transformación de las células epiteliales a fenotipos de malignidad. Se estima que las células epiteliales normales tienen entre 20,000 y 50,000 receptores HER2/neu en su membrana plasmática, mientras que las células tumorales en cáncer de mama que sobre-expresan el HER2/neu pueden llegar a tener hasta 2 millones de receptores en su membrana [3]. El cáncer de mama con sobreexpresión de HER2/neu (HER2+) presentan 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 actualmente se utiliza como diana terapéutica, para el tratamiento de esta enfermedad con el uso de

anticuerpos monoclonales específicos que se unen al dominio extracelular del receptor, como el Trastuzumab [4]. Trastuzumab, es el primer anticuerpo aprobado para uso terapéutico y en primer tratamiento anti-oncogénico, dirigido con beneficio de supervivencia aceptable en mujeres con cáncer de mama HER2+ metastásico [5].

La nanotecnología se ha convertido 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, diagnóstico y tratamiento [6]. Los esfuerzos recientes se han centrado en el desarrollo de nanopartículas funcionalizadas para el suministro de agentes terapéuticos contra células cancerosas, el propósito de estos estudios es evitar o reducir los efectos adversos de la quimioterapia, lograr tiempos de circulación más largos, biodisponibilidad y concentraciones adecuadas de los fármacos en dichos tumores. [7 y 8]. El objetivo del presente trabajo consistió en obtener un inmuno-nanoconjugado formado por nanopartículas de Silicio un anticuerpo monoclonal anti-Her2 (trastuzumab) y con ello demostrar su afinidad por células de cáncer de mama (HER2+).

METODOLOGÍA

Preparación de nanopartículas de silicio poroso (NPsSiP)

El silicio poroso fue producido por el método de anodización electroquímica. El silicio empleado tenía una resistividad 0.001-0.005 Ω.cm, con un plano de orientación (100) ± 0.5 deg., del tipo "p", dopadas con boro y con un espesor de 500 ± 25 µm. Las muestras se anodizaron usando una solución al 3:1 (v/v) de HF 48%:etanol mediante la aplicación de una densidad de corriente constante de 200 mA / cm^2 durante 180 s. Una película independiente de la nanoestructura de silicio poroso se retiró del sustrato de silicio cristalino mediante la aplicación de un impulso de corriente de 4 mA / cm^2 durante 120 s en una solución de 3.3% (v/v) de HF 48%/etanol. La película de silicio poroso de hidrógeno fue colocada en agua desionizada y se fracturó en partículas de varios tamaños por sonicación durante 12 hrs. Por último, con el fin de obtener nanopartículas de silicio poroso en un rango de tamaño de 50-200 nm, las nanopartículas se centrifugaron en agua desionizada a 14.000 rpm durante 30 min, se retiró el sobrenadante. La caracterización de las NPsSiP fue realizada por la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS por sus siglas en inglés Dynamic Light Scattering) para determinar el tamaño hidrodinámico y espectroscopía FTIR (por sus siglas en inglés Fourier Transform Infrared) para observar los grupos funcionales.

Modificación superficial de las NPsSiP:

Las partículas se hicieron reaccionar en una solución de HCl al 2% durante 2 h, se realizaron 3 lavados, esto fue seguido por silanización con 3-aminopropiltrietoxisilano (APTES) al 1% en solución de etanol durante 2 h para la funcionalización de la amina, se lavaron 3 veces. Por último, las partículas de SiO_2 porosos se hicieron reaccionar con anhídrido succínico 0.1 M en dimetilformamida (DMF) durante 24 h, se lavaron 3 veces. La funcionalización superficial se caracterizó por espectroscopía FTIR, y DLS.

Conjugación del anticuerpo anti-HER2; Trastuzumab con NPsSiP por el método de EDC (mAb-NPsSiP):

Las nanopartículas de silicio poroso con un tamaño promedio de 110 nm recubiertas en la superficie con grupos carboxilo se utilizaron para la conjugación con un anticuerpo monoclonal humanizado contra HER2/neu (Trastuzumab) como un anticuerpo focalización para cáncer HER2. El inmuno-nanoconjugado (mAb-NPsSiP) se sintetizo por el método de la carbodiimida. La carbodiimida reacciona con los grupos carboxilo de las nanopartículas recubiertas y los grupos amina del anticuerpo para formar una unión covalente. Brevemente: Se agregó 20mM de N-etil-N- (3-aminopropil dimetil) carbodiimida succinimida y 5mM de N-hidroxi en una solución de (N-morfolino) etanosulfónico 0.1M (pH4.6). Se añadió 1ml de la

mezcla a las nanopartículas, se agitó a temperatura ambiente durante 15 min. Las nanopartículas se lavaron dos veces con MES (pH 6,3) y luego se añadió 200µl de 1 mg/ml de trastuzumab/PBS. La solución se mezcló suavemente por 2 h a temperatura ambiente finalmente, el inmuno-nanoconjugado se lavó 3 veces con 1 ml de solución salina amortiguada por fosfatos (PBS), se resuspendió en PBS y se caracterizó por espectroscopía FTIR, y DLS.

Ensayo Dot Blot:

Está técnica se realizó para determinar la formación de los inmuno- nanoconjugados; es una técnica que fija las muestras en pequeñas cantidades en una membrana de nitrocelulosa para su posterior análisis tipo Western-Blot. Las muestras se fijaron por vacío en una membrana de nitrocelulosa en forma de pequeños círculos, después de esto la membrana se bloqueó con PBS-Tween 0.1% y 5% de leche durante 18 h, después la membrana se lavó tres veces con PBS-Tween 0.1% y se incubaron durante 4 h con un anticuerpo anti-IgG de humano acoplado a HRP (Horseradish Peroxidase) y finalmente revelado.

Cultivo celular:

Líneas celulares de carcinoma de mama SK-BR-3 se obtuvieron de ATCC y se cultivaron de acuerdo con las especificaciones de ATCC. Las SK-BR-3 se incubaron en medio McCoy con suero bovino fetal al 10%. Se incubaron a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO_2 humidificado.

Citometría de flujo

Una vez que las células SK-BR-3 alcanzaron una confluencia del 50-60%, se trataron durante 48 h con: nanopartículas y con el inmuno-nanoconjugado, pasado el tiempo se lavaron con PBS para eliminar las nanopartículas o el inmuno-nanoconjugado según sea el caso, que no se unieron a la superficie. Por último, se tomó una alícuota y se resuspendió en PBS para el análisis en el Citómetro de flujo, con la finalidad de observar las diferencias de las células en el presencia de los diversos tratamientos.

RESULTADOS

Caracterización de las nanopartículas de silicio poroso (NPsSiP)

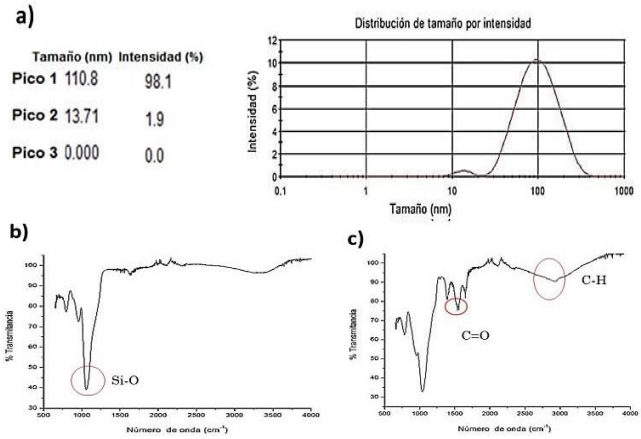


Figura 1. a) tamaño de las nanopartículas analizado por el equipo DLS, b) FTIR de las nanopartículas antes y c) después de la modificación de la superficie, en la cual se puede observar los grupos carboxilo unidos a las nanopartículas.

Verificación de la conjugación del anticuerpo anti-HER2 Trastuzumab (Herceptin) con NPsSiP por el método de EDC (mAb-NPsSiP)

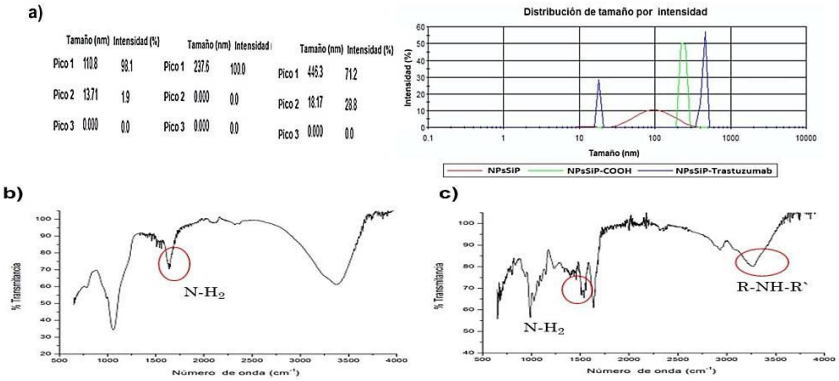


Figura 2. **a**) tamaño de las nanopartículas analizado por el equipo DLS, **b**) FTIR de las nanopartículas conjugadas con él anticuerpo monoclonal trastuzumab y **c**) FTIR del anticuerpo monoclonal comercial trastuzumab.

Ensayos con el Dot Blot

Los resultados obtenidos muestran lo siguiente: La primera mancha de arriba hacia abajo se observa un círculo de color amarillo, el cual corresponde a las nanopartículas de silicio poroso (~ 110nm) resuspendidas en agua desionizada. La segunda posición corresponde a las nanopartículas con la superficie activada por grupos carboxilo. La tercera posición muestra un círculo de color gris, este color corresponde a un revelado por quimioluminiscencia e indica que el (Anti-IgG de humano acoplado a HRP) anticuerpo secundario se unió al anticuerpo trastuzumab, que a su vez está unido a las nanopartículas de silicio poroso. La última posición ó círculo negro es nuestro control positivo, solo se encuentra el anticuerpo trastuzumab (Anti-IgG de humano acoplado a HRP) al indicar un revelado por quimioluminiscencia nos indica que el anticuerpo secundario se encuentra unido el anticuerpo trastuzumab.

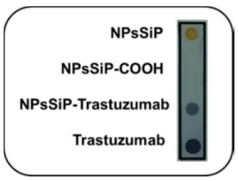


Figura 3. "Dot-blot", muestra la interacción del anticuerpo trastuzumab con las nanopartículas de silicio poroso.

Citometría de flujo

Después de exponer las células SK-BR-3 durante 48 h a diferentes tratamientos (células de control, céluas con nanopartículas y células con el inmuno-nanoconjugado), se analizaron por citometría de flujo. La parte de interés está encerrado en un marco rojo, se observan células de un tamaño más grande, esto puede ser debido a más de una célula que pasa a través de la viga.

El segundo recuadro muestra una población homogénea de células (control). Cuando las células son tratadas con nanopartículas, el tamaño no es mayor pero si la granularidad y las células muestran un comportamiento similar cuando se tratan con inmuno-nanoconjugados.

Se esperaba que hubiera una mayor granularidad en el recuadro correspondiente al inmuno-nanoconjugado y no en las nanopartículas individuales; sin embargo, se cree que el tiempo en que las células estuvieron en contacto con los inmuno-nanoconjugados no fue suficientemente largo para reconocen el receptor HER2 y por lo tanto las nanopartículas fueron endocitadas individuales, lo que indica que ingresaron al citoplasma de las células por un mecanismo no específico, es decir, endocitosis

no mediada por receptor. El incremento observado en la granularidad en los dos recuadros puede indicar que las nanopartículas se están depositando dentro de las células.

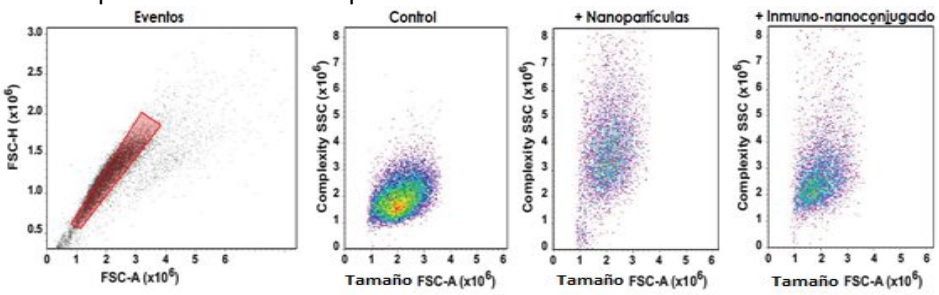


Figura 4. Citometría de flujo de los cambios de tamaño y granularidad de las células.

DISCUSIONES

Una de las principales características del silicio poroso como nanomaterial empleado para el direccionamiento y tratamiento de cáncer de mama, es la capacidad de ser biodegradable, demostrado en experimentos in vivo por Ji-Ho Park et al. en 2009 [9].

Para generar el inmuno-nanoconjugado es necesario la activación de la superficie, es decir, que tenga grupos funcionales carboxilos los cuales pueden formar un enlace covalente (estable) con los grupos funcionales amino libres presentes en la fracción Fc del anticuerpo, porque se requiere dejar la fracción Fab libre para el inmuno-nano-conjugado pueda unirse a las células HER2+. La caracterización del tamaño de silicio poroso fue realizada con la técnica de DLS, obteniendo como resultado un tamaño de 110.8 nm (figura 1a). Las nanopartículas se analizaron posteriormente usando FTIR donde el espectro obtenido muestra la aparición de picos (característica) de los grupos carboxilo unidos a las nanopartículas, que se observaron aproximadamente entre 2928 y 2856 cm^{-1} y pico característico de los enlaces Si-O (óxido de silicio) observada a aproximadamente 1100 cm^{-1} (figura 1b y 1c).

Nuestro inmuno-nanoconjugado primero se caracterizó por medio de la técnica de DLS (figura 2a), donde observamos el cambio de tamaño de las nanopartículas, presentando un tamaño inicial de 110.8 nm, cuando activamos la superficie su tamaño cambia a 237.6 nm y por último el inmuno-nanoconjugado tiene un tamaño de 446.3 nm.

Por otra parte, el espectro FTIR, muestra la presencia de nuevos picos (característicos) entre 1655 cm^{-1} y 1588 cm^{-1} (figura 3b), asociados NH_2, lo que nos hace inferir la unión del anticuerpo a la nanopartícula. El espectro FTIR del anticuerpo monoclonal trastuzumab, en el cual se observan picos característicos de NH_2 y R-NH-R´ en 1655 cm^{-1} y 3250 cm^{-1}, respectivamente. El ensayo realizado con el Dot Blo revelo que el anticuerpo se encuentra unido a las nanopartículas, esto de acuerdo a lo observado en la figura 3.

CONCLUSIONES

En los últimos años la nanomedicina está teniendo un gran auge en cuanto la terapia dirigida a tumores canceroso. El empleo de nanopartículas que cuenten con un sistema de direccionamiento tiene la finalidad de reducir los efectos secundarios, y tener una mayor especificidad al atacar a las células diana. Las nanopartículas de silicio poroso unidas covalentemente a un anticuerpo contra HER2, son capaces de dirigirse de manera eficiente hacia las células de cáncer de mama que sobre-expresan HER2. En contraste, las nanopartículas no dirigidas muestran la captación celular en estas líneas celulares pero la absorción fue aparentemente diferente, implicaría que las nanopartículas solas o desnudas podrían unirse de forma inespecífica a células no tumorales.

El Inmuno-nanoconjugado tiene la capacidad de unirse selectivamente a HER2 en la superficie celular, lo cual puede ser una alternativa para el tratamiento de cáncer de mama y otros cánceres.
El método empleado para funcionalizar a la superficie de las nanopartículas un anticuerpo monoclonal puede también ser empleado para otros anticuerpos, y por supuesto para tratamiento de otros tipos de cáncer.

AGRADECIMIENTOS. Al CONACYT por las becas otorgadas a las estudiantes Preciado-Pelayo y Oaxaca-Camacho.

REFERENCIAS

[1] Jesús C., Juan B., Aura E., (2015). Consenso Mexicano sobre diagnóstico y tratamiento del cáncer mamario. (6 revisión), México, Colima, Elsiver, 10-13.

[2] Tamara M., Lorna R., Vitaly P., (2013). "Nanotechnology approaches for personalized treatment of multidrug resistant cancers", Advanced Drug Delivery Reviews, 65, 1880–1895.

[3]. Horton J., (2001). "Her2 and trastuzumab in breast cancer", Cancer Control, 8(1):103-10.

[4]. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, (2001). "Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2" N Engl J Med, 344(11):783-92.

[5] Baselga J. and Albanell J., (2001). "Mechanism of action of anti-H ER2 monoclonal antibodies", Annals of Oncology, 12 S35-S41.

[6] Shuming N., Yun Xing, Gloria J., and Jonathan S., (2007). "Nanotechnology Applications in Cancer", Annual Review of Biomedical Engineering, 9:257–88.

[7] Yi Z., Daria A., Alexander K., (2013). "Can nanomedicines kill cancer stem cells?", Advanced Drug Delivery Reviews, 65 1763–1783.

[8] Vanna S., Nicolino P., Mario S., (2014). "Targeted therapy using nanotechnology: focus on cancer", International Journal of Nanomedicine, 9 467–483.

[9] Ji-Ho P., Luo G., Geoffrey von M., ErKki R., Sangeeta B., and Michael J. S., (2009). "Biodegradable luminescent porous silicon nanoparticles for in vivo applications", Nat Mater. 8(4):331–336.

HEXAHISTIDINE-TAGGED TOBACCO ETCH VIRUS VIRUS-LIKE PARTICLES ELICIT ANTIBODY RESPONSE AGAINST A CHIMERIC PROTEIN

(Las partículas pseudovirales del virus del jaspeado del tabaco etiquetadas con seis histidinas inducen la respuesta de anticuerpos contra una proteína quimérica)

Carlos Alberto Manuel-Cabrera [a]*, Eduardo Padilla-Camberos [a], Rodolfo Hernández-Gutiérrez [a], Carla Sánchez-Hernández [b], Sara Elisa Herrera-Rodríguez [a], Abel Gutiérrez-Ortega [a+].

[a] Unidad de Biotecnología Médica y Farmacéutica, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C., Normalistas 800, Colinas de la Normal, 44270, Guadalajara, Jalisco, México
[b] Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara, Carretera Guadalajara-Nogales km 15.5, 45110 Zapopan, Jalisco, México
* caalmaca_07@hotmail.com

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: aortega@ciatej.mx

Área del Conocimiento: Biotecnología Farmacéutica.

ABSTRACT
Assembly of recombinant capsid proteins into virus-like particles (VLPs) represents a major drawback in virus-based nanotechnologies. Here we present the expression of tobacco etch virus (TEV) capsid protein (CP) and its assembly into VLPs. We hypothesize that recombinant expressed capsid protein of tobacco etch virus will assembly into virus-like particles, and the resulting virus like particles will elicit antibody response against a chimeric protein when tested in mice. Six versions of the TEV CP, named TEV-CP (wild-type version), TEV-CP_{17} (K17R TEV CP mutant) and TEV-$CP_{17/20}$ (K17R K20R TEVCP double mutant), with or without a C-terminal hexahistidine (His) tag, were generated through genetic engineering. High-level expression of soluble TEV CP was observed for all the six versions in *Escherichia coli* system, however, His-TEV-CP_{17} mutant expressed at highest level and was easily purified by Ni^{2+} affinity chromatography. Notably, only His-tagged versions self-assembled into 'elongated' flexuous filamentous VLPs, as evidenced by transmission electron microscopy. Furthermore, we investigated the use of TEV CP VLPs as an adjuvant for a novel chimeric porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) protein, named $PRRSV_{chim}$. $PRRSV_{chim}$ protein and His-TEV-CP_{17} mutant VLPs were mixed in two dosage ratios, 1:1 and 1:2.5 of protein weight, respectively. Enzyme-linked immunosorbent assay showed that the higher dose of TEV CP VLPs elicited higher antibody response against the chimeric protein in sera of mice immunized with the mixture of proteins.

Keywords: Tobacco etch virus capsid protein, Virus-like particle, Hexahistidine tag, Adjuvant.

RESUMEN
El ensamblaje de proteínas de la cápside recombinantes en partículas pseudovirales (VLP, por sus siglas en inglés) representa un obstáculo mayor para las nanotecnologías basadas en virus. En este trabajo se

presenta la expresión de la proteína de la cápside (CP, por sus siglas en inglés) del virus del jaspeado del tabaco (TEV, por sus siglas en inglés), y su ensamblaje en partículas peudovirales. La hipótesis plantea que la proteína de la cápside del virus del jaspeado del tabaco expresada de manera recombinante se ensamblará en partículas pseudovirales, y las partículas pseudovirales resultantes inducirán una respuesta de anticuerpos contra una proteína quimérica cuando sean probadas en ratones. Mediante ingeniería genética, se generaron seis versiones de la CP del TEV, denominadas TEV-CP (versión nativa), TEV-CP_{17} (mutante de la CP del TEV K17R), y TEV-$CP_{17/20}$ (doble mutante de la CP del TEV K17R K20R), con o sin fusión a una etiqueta de seis histidinas (His) en el extremo C- terminal. Para las seis versiones de la CP del TEV se observó un alto nivel de expresión de proteína soluble en el sistema *Escherichia coli*, sin embargo, la mutante denominada His-TEV-CP_{17} mostró el nivel más alto de expresión, y se purificó de manera más fácil mediante cromatografía de afinidad a iones metálicos de Ni^{2+} inmovilizados. En particular, mediante microscopía electrónica se evidenció que solo las versiones con la etiqueta His se autoensamblaron en partículas pseudovirales filamentosas, flexibles y alargadas. Además, se investigó el uso de las partículas pseudovirles generadas a partir de la CP del TEV como un adyuvante para nueva proteína quimérica generada a partir del virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV, por sus siglas en ingles), denominado $PRRSV_{chim}$. La proteína $PRRSV_{chim}$ y las partículas pseudovirales de la mutante His-TEV-CP_{17} fueron mezcladas en dos proporciones de dosis, 1:1 y 1:2.5 de cantidad de proteína, respectivamente. El ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima mostró que en el suero de ratones inmunizados con la mezcla de proteínas, la respuesta de anticuerpos contra la proteína quimérica fue más alta con la dosis mayor de VLPs de la CP del TEV.

Palabras Clave: Proteína de la cápside, virus del jaspeado del tabaco, partículas pseudovirales, etiqueta de seis histidinas, adyuvante.

INTRODUCTION

Virus-like particles (VLP) have evolved to become an acceptable technology in a wide range of fields from nanomaterials to vaccinology. The structural proteins of some viruses occasionally mimic the three-dimensional nature of an actual virus while lacking the virus genome packaged inside its capsid, so, they are safe and secure for biomedical applications [1]. The features of VLPs include self-assembly properties, highly ordered structure and surface repetitiveness, making them good candidates for the development of vaccines and epitope presenting platforms [2].The upsurge of this biotechnological applications has driven the cloning, expression and purification of virus structural components in a wide range of host systems (reviewed by Zeltins [3]). However, the study of self-assembly properties of viral components into a VLP and their structure remains a challenge. Plant viral particles provide an ideal platform for vaccine development because they cannot infect animals and the production of VLPs can be easily achieved [4]. The *Tobacco etch virus* (TEV) is a flexuous filamentous RNA virus that infects plants. The 12-13 nm width and 730 nm length viral particle is made up of around 2000 copies of capsid protein (CP) surrounding the genome [5]. By 1990s, research on Johnson grass mosaic virus (JGMV) CP led to propose the use of chimeric potyvirus-like particles for epitope carrying or display based on virus features, as reviewed by Jagadish and others [6], serving as vaccine adjuvant. For the first time, Jagadish and others [7] successfully expressed in a recombinant system (*E. coli*) the JGMV CP that assembled into virus-like particle structures. The list of VLP assembly from *E. coli*-expressed potyviral CPs has been extended to Potato virus Y [8], Plum pox virus [9], Pepper vein banding virus [10] and TEV [11], and their application as vaccine carriers or adjuvants is continuously growing. The aim of this study was to explore the assembly of *E. coli*-expressed TEV CP into VLPs and evaluate their use as an adjuvant of a novel

antigen. Six versions of TEV CP were generated. They were called TEV-CP, TEV-CP_{17}, TEV-$CP_{17/20}$, His-TEV-CP, His-TEV-CP_{17}, and His-TEV-$CP_{17/20}$. Major findings showed high-level expression of soluble TEV CP for the six versions, however, His-TEV-CP_{17} mutant was expressed and purified at highest level. Notably, only His-tagged versions self-assembled into 'elongated' flexuous filamentous VLPs. Furthermore, immunization of mice with a novel chimeric porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) protein, named $PRRSV_{chim}$, mixed with two dosage ratios of His-TEV-CP_{17} VLPs showed that the increase of TEV CP VLPs elicited a higher serum antibody response against the chimeric protein.

METHODOLOGY

For generation of the TEV CP constructs, a *tev cp* gene (GenBank: JX512813.1), modified to content a glycine codon at 5´- end, was synthetically obtained and delivered in pUC57-TEV-CP (GenScript, USA). The pUC57-TEV-CP was used as template to generate TEV CP mutant versions using the QuickChange II site-directed mutagenesis kit (Agilent Technologies, USA) following the instructions of the supplier. Point mutations were introduced at positions 50 and 59 of the nucleotide sequence of native capsid protein coding gene to substitute lysine by arginine (Lys17Arg and Lys20Arg). Nucleotide changes were confirmed by sequencing. Recognition sites for NcoI and XhoI enzymes were introduced at 5'- and 3'-ends of *tev cp* gene, respectively, by PCR, followed by restriction enzyme-ligation into pET28a+ expression vector (Merck-Millipore, Germany), generating the TEV CP versions with or without His-tag. The versions without His-tag content a stop codon between the *tev cp* ORF and XhoI recognition site. Six constructs named pET28-TEV-CP, pET28-TEV-CP_{17}, pET28-TEV-$CP_{17/20}$, pET28-His-TEV-CP, pET28-His-TEV-CP_{17}, and pET28His-TEV-$CP_{17/20}$ were generated. In all cases, sub-cloning steps were performed in *E. coli* TOP10 host. All generated plasmids were maintained in LB plates or broth. *E. coli* BL21Star (DE3) cells were used as expression strain.

For evaluating the expression of the TEV CP proteins, LB medium was inoculated from stock bacterial culture and cells were grown at 37°C overnight. The bacterial culture was then transferred to Terrific Broth medium (Sigma-Aldrich, USA) and grown at 30°C, until OD_{600} reached 1.0. IPTG was added to a final concentration of 1 mM and the cells were induced overnight at 20°C. The cells were lysed by sonication in 20 mM Tris, pH 8.0 (matrix buffer, herein MB) and 500 mM NaCl for recovery of total soluble protein (TSP). The presence of TEV CP was confirmed by Western Blot (WB) using anti 6xHisTag (Roche, Switzerland) and anti TEV (Agdia, USA) antibodies.

For obtaining the TEV CP proteins, soluble non-tagged versions of TEV CP were partially purified by precipitation using PEG 8000 3% and 500 mM NaCl. His-tagged versions of TEV CP were purified by Ni^{2+} affinity chromatography, using His Trap HP IMAC 1 mL columns (GE-Healthcare, USA). Briefly, soluble extracts in MB with 500 mM NaCl were adjusted to 10 mM imidazole and loaded into the column collecting the flow-through (FT) for further analysis. Washing steps were performed in MB with 40 mM imidazol, and NaCl gradient (adjusted every 5 mL at 200, 400, 600 and 800 mM). The wash FT (WFT) was collected in 4 fractions, respectively. The retained proteins were eluted using MB with 100mM NaCl and 500 mM imidazol. The elution FT (EFT) was collected in 6 fractions of 1 mL each. The purification process was monitored by SDS-PAGE and Coomasie blue staining. Finals preparations were diafiltrated several times against MB with 500mM NaCl, using 3kDa Amicon Ultra centrifugal filter devices (Merck-Millipore, Germany). Protein concentration was estimated against a BSA curve using Bradford reagent.

For determination of size and structure of the VLPs assembled from purified His-tagged versions of TEV CP and TEV-CP version, transmission electron microscopy (TEM) was used. Protein solution (0.4 mg/mL) in MB with 500mM NaCl was adsorbed on formvar-coated copper grids and negatively stained with 2 %

uranyl acetate aqueous solution. The grids were examined using a JEM-100C (JEOL, Japan) at an accelerating voltage of 80 kV.

For preparation of the $PRRSV_{chim}$ protein, the gene coding for $PRRSV_{chim}$ was cloned into pET32a+ expression vector (Merck-Millipore, Germany). Protein expression was performed in LB medium at 30°C with 1 mM IPTG. Protein purification was performed by Ni^{2+} affinity chromatography following the provider's instructions. Soluble purified $PRRSV_{chim}$ protein was prepared in MB with 500mM NaCl.

For immunological evaluation of the purified proteins, 6-week-old female BALB/c mice (Harlan Laboratories, USA) were divided into 4 groups of 5 animals. Each group was immunized with 20mM Tris-HCl pH 8.0, 500mM NaCl (vehicle), 25 µg of His-TEV-CP_{17} (TEV VLP 25µg), 10 µg of His-TEV-CP_{17} plus 10 µg of $PRRSV_{chim}$ (TEV VLP 10µg/PRRSV 10µg), or 25 µg of His-TEV-CP_{17} plus10 µg of $PRRSV_{chim}$ (TEV VLP 25 µg/PRRSV 10µg). Immunization procedure was described previously by Guerrero-Rodríguez and others [12]. Collected serum samples were tested for total IgG and IgG1, IgG2a and IgG2b isotype response against $PRRSV_{chim}$ by ELISA. Serum samples from each group were pooled and diluted 1:20 followed by serial 1:5 dilution. ELISA procedure was performed as described previously [12] with slight modifications. HRP-donkey anti mouse IgG (Bio-Techne, USA) or HRP-goat anti mouse IgG subclass 1, 2a or 2b (JIR Laboratories, USA) were used as secondary antibodies. Excel and Statgraphics were used for data processing and statistical analysis, respectively. ANOVA analysis with Bonferroni multiple comparisons test was used for comparing the antibody response in tested groups.

RESULTS

Six coat protein versions, named TEV-CP, TEV-CP_{17}, TEV-$CP_{17/20}$, His-TEV-CP, His-TEV-CP_{17}, His-TEV-$CP_{17/20}$, were produced in soluble fraction of *E. coli* lysates. The expression was confirmed by WB (Figure 1a-b). Immunodetection revealed a band corresponding to ~ 31kDa TEV CP for each version of the TEV CP. His-TEV-CP_{17} version expressed at highest level as estimated by ELISA using anti TEV antibody (data not shown). After confirmation of expression, non-tagged TEV CP versions were partially purified by PEG precipitation. All the His-tagged TEV CP versions were successfully recovered in pure form using affinity chromatography (Figure 1c). Dimers and shorter forms were observed in purified preparations of His-tagged TEV CP version. Purified TEV CP versions were analyzed by TEM to assess VLP assembly (Figure 1e). The micrographs revealed that all the His-tagged TEV CP versions assembled into VLPs, in contrast to non-tagged TEV CP versions. Also, introduced mutations, Lys17Arg and Lys20Arg did not affect particle assembly in His-tagged TEV CP versions. The observed particles were larger than 1µm. After confirmation of VLP formation, due to the level of expression and recovery in pure form of VLP from His-TEV-CP_{17}, this version was used to evaluate the adjuvant effect of TEV CP VLPs when they are administered along with $PRRSV_{chim}$ protein. Pure $PRRSV_{chim}$ protein was used for immunization of mice (Figure 1d). Determination of total IgG and IgG isotyping (IgG1, IgG2a, IgG2b) against $PRRSV_{chim}$ protein by ELISA (Figure 2a-d) showed that TEV CP VLPs elicit a high antibody response against the chimeric protein in a dose-dependent manner, showing a difference in total IgG between treatments where 10 and 25µg of VLP were used, even at 1:312,500 dilution (P-value < 0.03). IgG2a and IgG2b are particularly induced with the increase of VLP dose, showing a difference even at 1:12,500 dilution (P-value < 0.02).

DISCUSSION

Most of the research in VLP production and assembly has been focused in plant viruses with isodiametric symmetry, like Cowpea mosaic virus and Cowpea chlorotic mottle virus, the rigid rods of Tobacco mosaic virus (TMV) and the filamentous particles of Papaya mosaic virus (PapMV) [4]. The production of TEV CP VLPs has been previously accomplished; however, purification and level of

expression had not been reported previously. Furthermore, previous work showed that His-tagged versions of TEV CP did not assemble into VLPs [11]. Regarding introduced mutations, analysis of TEV CP sequences show that Lys17Arg substitution is quite frequent; on the contrary, amino acid Lys20 of native TEV CP has been reported as highly conserved among potyvirus coat protein [13]. Interestingly, it has been proposed that surface lysine mutagenesis to arginine can be considered as one of the parameters in protein stability engineering [14]. To our knowledge, there is no report on the expression of His-tagged potyviral CP that assembles into VLPs. TMV studies have demonstrated a pivotal role of His-tag on directing assembly of virus-like structures from monomers, rings, discs, rods, and filamentous

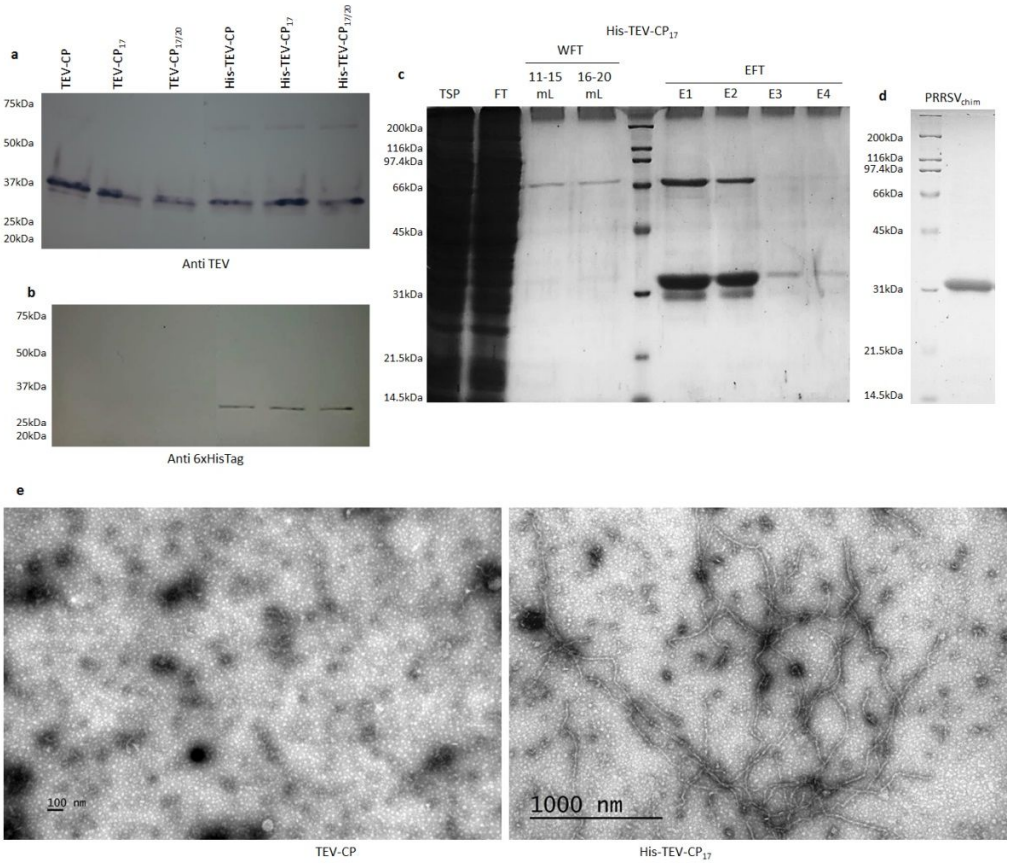


Figure 1. a-b) Analysis of expression of the six TEV CP versions in soluble fraction of *E. coli* lysates by Western blot, loading 10µg of TSP per lane, c) Analysis of the purification process of His-TEV-CP_{17} in SDS-PAGE 12% loading 10µL of sample per lane, d) Analysis of the purified $PRRSV_{chim}$ protein in SDS-PAGE 12% loading 10µL of sample per lane, and e) TEM analysis of VLP assembly of non-tagged (left panel) and His-tagged TEV CP versions (right panel).

structures [15]. The mixture of TEV CP VLP with $PRRSV_{chim}$ protein elicited the production of IgG1, IgG2a and IgG2b isotypes. This IgG profile indicates a balanced Th1/Th2 immune response. In mice, it is well understood that IgG1 is related to Th2 immunity, while IgG2a reflects Th1 immunity. Besides, soluble proteins are generally restricted to the IgG1 isotype, while most antiviral response belongs to IgG2a [16]. PapMV CP nanoparticles administered with trivalent flu vaccine and PRSV CP filamentous particles

administered with GFP showed an increase in the production of IgG2a and IgG1, and IgG1, respectively [17, 12]. These findings support the potential use of VLP nanoparticles as adjuvants and carriers of foreign epitopes without the need of antigen's attachment.

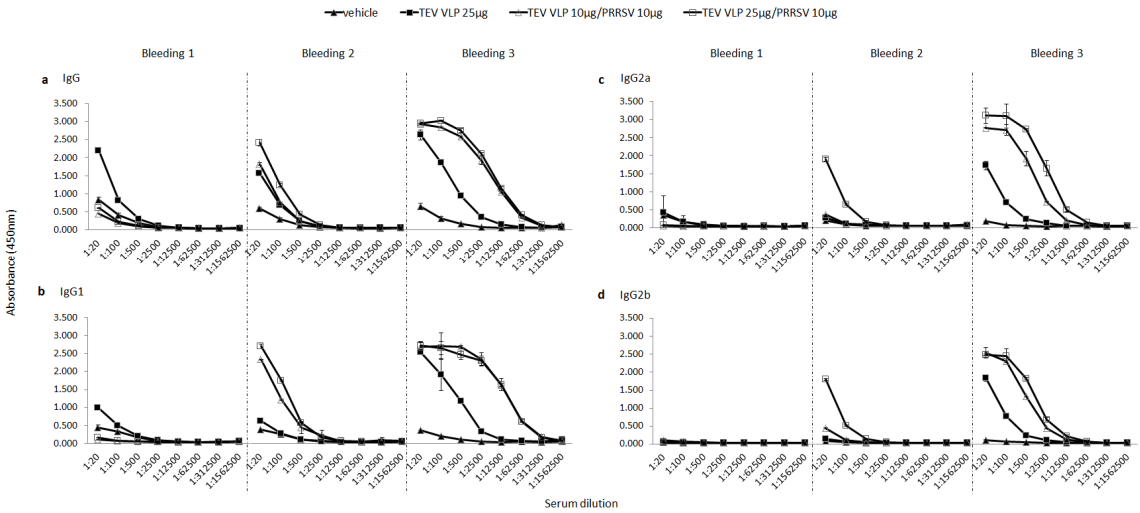


Figure 2. Antibody titers produced in sera of immunized mice recognizing $PRRSV_{chim}$ protein. The results are expressed as the mean ± standard deviation of two measurements.

CONCLUSIONS

The results presented here demonstrate that His tag sequence favors TEV CP assembly into VLPs and substitution mutations in TEV CP do not affect particle assembly in His-tagged TEV CP versions. Also, His-tagged TEV CP VLPs elicit high antibody response against PRRSV chimeric protein. These findings expose the potential value of TEV CP VLPs as immunogenic carriers or adjuvants with added physicochemical properties due to introduced mutations.

REFERENCES

[1] Vicente, T., Roldão, A., Peixoto, C., Carrondo, M. J. T., Alves, P. M. (2011), "Large-scale production and purification of VLP-based vaccines", Journal of Invertebrate Pathology, 107: S42-S48.

[2] Jennings, G. T., Bachmann, M. F. (2008), "The coming of age of virus-like particle vaccines", Journal of Biological Chemistry, 389(5): 521-536.

[3] Zeltins, A. (2013), "Construction and Characterization of Virus-Like Particles: A Review", Molecular Biotechnology, 53: 92-107.

[4] Plummer, E. M., Manchester, M. (2011), "Viral nanoparticles and virus-like particles: Platforms for contemporary vaccine design", Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology, 3(2): 174-196.

[5] Shukla, D. D., Strike, P. M., Tracy, S. L., Gough, K. H., Ward, C. W. (1988), "The N and C termini of the coat proteins of potyviruses are surface-located and the N terminus contains the major virus-specific epitopes", Journal of General Virology, 69(7): 1497-1508.

[6] Jagadish, M. N., Edwards, S. J., Hayden, M. B., Grusovin, J.,Vandenberg, K., Schoofs, P., Hamilton, R. C., Shukla, D. D., Kalnins, H., McNamara, M., Haynes, J., Nisbet, I. T., Ward, C. W., Pye, D. (1996), "Chimeric potyvirus-like particles as vaccine carriers", Intervirology, 39(1-2): 85-92.

[7] Jagadish, M. N., Ward, C. W., Gough, K. H., Tulloch, P. A., Whittaker, L. A., Shukla, D. D. (1991), "Expression of potyvirus coat protein in Escherichia coli and yeast and its assembly into virus-like particles", Journal of General Virology, 72: 1543-1550.

[8] Stram, Y., Sela, I., Edelbaum, O., Tanne, E., Karchi, M., Karchi, H. (1993), "Expression and assembly of the potato virus Y (PVY) coat protein (CP) in Escherichia coli cells", Virus Research, 28: 29-35.

[9] Jacquet, C., Delecolle, B., Raccah, B., Lecoq, H., Dunez, J., Ravelonandro, M. (1998), "Use of modified plum pox virus coat protein genes developed to limit heteroencapsidation-associated risks in transgenic plants", Journal of General Virology, 79(Pt 6): 1509-1517.

[10] Joseph, J., Savithri, H. S. (1999), "Determination of 3'-terminal nucleotide sequence of pepper vein banding virus RNA and expression of its coat protein in Escherichia coli", Archives of Virology, 144(9): 1679-1687.

[11] Voloudakis, E., Malpica, C. A., Aleman-Verdaguer, M. E., Stark, D. M., Fauquet, C. M., Beachy, R. N. (2004), "Structural characterization of Tobacco etch virus coat protein mutants", Archives of Virology, 149: 699-712.

[12] Guerrero-Rodríguez, J., Manuel-Cabrera, C. A., Palomino-Hermosillo, Y. A., Delgado-Guzmán, P. G., Escoto-Delgadillo, M., Silva-Rosales, L., Herrera-Rodríguez, S. E., Sánchez-Hernández, C., Gutiérrez-Ortega, A. (2014), " Virus-Like Particles from Escherichia coli-Derived Untagged Papaya Ringspot Virus Capsid Protein Purified by Immobilized Metal Affinity Chromatography Enhance the Antibody Response Against a Soluble Antigen", Molecular Biotechnology, 56(12): 1110-1120.

[13] Ullah, Z., Chai, B., Hammar, S., Raccah, B., Gal-On, A., Grumet, R., 2003. Effect of substitution of the amino termini of coat proteins of distinct potyvirus species on viral infectivity and host specificity. Physiological and Molecular Plant Pathology 63, 129-139

[14] Sokalingam, S., Raghunathan, G., Soundrarajan, N., Lee, S.-G., 2012. A Study on the Effect of Surface Lysine to Arginine Mutagenesis on Protein Stability and Structure Using Green Fluorescent Protein. PLoS ONE 7(7): e40410

[15] Bruckman, M. A., Soto, C. M., McDowell, H., Liu, J. L., Ratna, B. R., Korpany, K. V., Zahr, O. K., Blum, A. S., 2011. Role of Hexahistidine in Directed Nanoassemblies of Tobacco Mosaic Virus Coat Protein. ACSNano 5(3), 1606-1616

[16] Markine-Goriaynoff, D., van der Logt, J. T., Truyens, C., Nguyen, T. D., Heessen, F. W., Bigaignon, G., Carlier, Y., Coutelier, J. P., 2000. IFN-gamma-independent IgG2a production in mice infected with viruses and parasites. International Immunology 12(2), 223-230

[17] Savard, C., Guérin, A., Drouin, K., Bolduc, M., Laliberté Gagné, M.-E., Dumas, M. C., Majeau, N., Leclerc, D., 2011. Improvement of the trivalent inactivated Flu vaccine using PapMV nanoparticles. PLoS One 6(6), e21522

EVALUATION OF THE ANTIGENIC POTENTIAL OF A CHIMERIC PROTEIN CONTAINING EPITOPES OF PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME VIRUS GP3, GP4, GP5 AND M PROTEINS.

(Evaluación del potencial antigénico de una proteína quimérica que contiene epítopes de los antígenos GP3, GP4, GP5 Y M del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino)

José Alberto Uribe Flores [a]*, Daniela Padilla Novelo [a], Jesús Hernández Barrera [a], Enrique Jaime Herrera López [a], Atalo Candido Martínez Lara [b], Fernando Diosdado Vargas [b], José Francisco Rivera Benítez [b], Luis Gómez Núñez [b], Abel Gutiérrez Ortega [a+]

[a] Unidad de Biotecnología Médica y Farmacéutica, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C., Normalistas 800, Colinas de la Normal, 44270, Guadalajara, Jalisco, México
[b] Centro de Investigación Disciplinaria en Microbiología Animal, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, km 15.5 Carretera México-Toluca, 05110, Cuajimalpa, Distrito Federal, México

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: aortega@ciatej.mx

Área del Conocimiento: Biotecnología Farmacéutica.

ABSTRACT
Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) is one of the main problems in pork industry, worldwide, and is caused by a virus (PRRSV), affecting pigs of all ages. There are commercially available vaccines, both inactivated and attenuated, however, their efficacy varies depending on the geographic region they are used. Therefore, the development of new vaccines against PRRSV, particularly, epitope-based vaccines that induce a fast antibody response against the virus, is necessary. In this work, a hexahistidine-tagged chimeric protein containing epitopes of PRRSV GP3, GP4, GP5 and M proteins, as well as a fusion partner, was designed and successfully expressed in *Escherichia coli*. The chimeric protein was purified through two rounds of immobilized metal ion affinity chromatography, with yields reaching 15 mg protein/L culture medium. The purified chimeric protein was recognized by 36 randomly selected sera that had been previously confirmed as PRRSV-positive by antibody ELISA. In addition, 10 µg of chimeric protein adjuvated with Freund´s adjuvant and administered subcutaneously in a two dose scheme to female BALB/c mice elicited IgG titers of 1:1,562,500. Finally, a clinical trial in piglets to assess the efficacy of the chimeric protein is in progress.

Keywords: Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus, Chimeric Protein, Antigenicity, Antibody Response.

RESUMEN
El Síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) es uno de los principales problemas en la industria porcina en todo el mundo, y es causada por un virus (PRRSV), que afecta a los cerdos de todas las edades. Hay vacunas comercialmente disponibles, tanto inactivadas y atenuadas, sin embargo, su eficacia varía según la región geográfica donde se utilizan. Por tanto, el desarrollo de nuevas vacunas

contra PRRSV, en particular, las vacunas basadas en epítopos que inducen una respuesta rápida de anticuerpos contra el virus es necesario. En este trabajo, una proteína quimérica etiquetada con hexahistidina que contiene epítopos de proteínas de PRRSV GP3, GP4, GP5 y M, así como una pareja de fusión que se diseñó y se expresó con éxito en *Escherichia coli*. La proteína quimérica se purificó a través de dos rondas de cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados, con rendimientos que alcanzan en medio de cultivo de 15 mg de proteína / L. La proteína quimérica purificada fue reconocida por 36 sueros seleccionados al azar, que se habían confirmado previamente a anticuerpos PRRSV-positivos usando la técnica de ELISA. Adicionalmente, 10 gr de proteína quimérica fue adyuvantada con Freund y administrada por vía subcutánea en un esquema de dos dosis a ratones hembra BALB/c la cual mostró títulos de IgG de 1:1,562,500. Finalmente, el ensayo clínico en los lechones para evaluar la eficacia de la proteína quimérica está en curso.

Palabras Clave: Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino, Proteína Quimérica, Antigenicidad, Respuesta de Anticuerpos

INTRODUCTION

The porcine respiratory and reproductive syndrome (PRRS) is a virus-caused disease characterized by reproductive failure in sows and respiratory disease in pigs [1] and is distributed in most pork producing countries, causing important economic losses [2]. In 1987, porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) appeared in the United States, identified in The Netherlands in 1991 and right now it can be found worldwide [3]. PRRSV belongs to the family Arteriviridae and its RNA genome has ten open reading frames (ORF), called ORF1a, ORF1b, ORF2a, ORF2b, ORF3, ORF4, ORF5, ORF5a, ORF6 and ORF7 [4, 5]. ORF 6, also called matrix (M) protein is highly conserved among PRRSV strains belonging to the same genotype (European or American) and amino acid identity between the genotypes is 63% [6]. The PRRSV outer envelope is composed of several glicoproteins. GP3 (ORF3) has been detected on the virion of some European strains [7]. Meanwhile, GP4 (ORF4) generates neutralizing antibodies. Additionally, GP5 (ORF5) is a glycosylated transmembrane protein that can be divided into several domains: a signal peptide, an ectodomain, a transmembrane region and an endodomain [7,8]. Two epitopes located in GP5 ectodomain that induce the production of antibodies in infected pigs have been reported [9]. It has been determined that the humoral response of PRRS virus-infected pigs is complex and neutralizing antibodies are directed to GP3,GP4 , M) and mainly GP5 [10]. In other studies, it has been shown that GP5 form heterodimers with M protein in PRRSV virions which have been associated with cell infection by binding to heparan sulfate and sialoadhesin, present mainly in macrophages [11, 12, 13].

Recent studies conducted in China suggest that the high degree of genetic diversity among PRRSV isolates is a consequence of the extensive use of vaccine strains, favoring recombination events between these strains. For this reason, the development and use of PRRSV live vaccines must be reconsidered [14]. Currently, there are two types of commercial vaccines against PRRSV: attenuated and inactivated virus. Although these vaccines reduce the symptoms of the disease and viremia, do not prevent infection and cross-protection is variable against heterologous strains. For this reason, many studies have focused on the development of new recombinant vaccines, like viral-based, DNA and subunit vaccines. However, the development of an effective vaccine against PRRSV remains a major challenge [15]. Previously, a chimeric protein consisting of GP5 and M ectodomains was designed and expressed in *E. coli* and represents a promising subunit vaccine against PRRSV [16].

In this work, a hexahistidine-tagged chimeric protein containing epitopes of PRRSV GP3, GP4, GP5 and M proteins, as well as a fusion partner, was designed and successfully expressed in *E. coli*. Antigenicity and immunogenicity of the purified chimeric protein were also evaluated.

METODOLOGY

A DNA sequence encoding a chimeric protein containing two epitopes of GP3, one epitope of GP4, and GP5 and M ectodomains separated by a Val_4 linker, was artificially synthesized (Genscript, USA) and cloned into pET32a+ plasmid (Merck-Millipore, Germany) between NcoI and XhoI restriction sites. The resultant plasmid was then mobilized to *E. coli* BL21 Star (DE3) expression strain. Chimeric protein expression was induced with 1 mM IPTG for 4 h, 30°C and 250rpm shaking in LB Lennox (Sigma-Aldrich, USA). Cells were recovered by centrifugation, lysed by sonication and analyzed by SDS-PAGE and Coomassie blue staining. For chimeric protein purification, a nickel HisTrap HP 1ml column (GE HealthCare, USA) was used according to the manufacturer´s instructions in Tris–HCl buffer. Two sequential purification rounds were carried out. Finally, the eluates were pooled and dialyzed against phosphate buffer saline (PBS).

In order to assess antigenicity of the chimeric protein, an ELISA assay was performed with 36 PRRSV-positive pig serum samples. Also, PRRSV-negative sera were employed as control. Briefly, a 96-well plate (Nunc, USA) was coated with 10 µg of chimeric protein overnight at 4°C. Pig serum samples were diluted 1:100, added to the wells and incubated for 1 hour at 37°C. Anti-pig IgG-HRP (Sigma-Aldrich, USA) was used as conjugate. TMB (Sigma-Aldrich, USA) was used for color development and reaction stopped with 3N sulfuric acid. Reads were taken at 450 nm. Measurements were conducted in triplicate.

To demonstrate the immunogenicity of the PRRSV chimeric protein, 2 groups of 5-6 weeks old female BALB/c mice, of 5 individuals each, were immunized subcutaneously with vehicle (PBS) or 10 µg of PRRSV chimeric protein and Freund's adjuvant in a two-shot scheme. Sera were collected and analyzed by ELISA. IgG titers against PRRSV chimeric protein were determined by ELISA. Anti-mouse IgG conjugated to peroxidase (Biorad, USA) was employed as detection antibody and TMB (Sigma-Aldrich, USA) as substrate.

RESULTS

A histidine-tagged PRRSV chimeric protein was designed and successfully expressed in *E. coli* only when it was fused to thioredoxin protein (data not shown). Also, the protein accumulated in both soluble and insoluble fraction. Expression was confirmed by western blot and protein size corresponded to the estimated one (data not shown). PRRSV chimeric protein purification was carried out by two rounds of immobilized metal affinity chromatography (IMAC) and results are shown in Figure 1. After this purification protocol, the yield was 15 mg/L of culture medium, as estimated by Bradford.

In order to determine the antigenicity of PRRSV chimeric protein, an antibody ELISA was performed, using PRRSV-positive pig serum samples previously tested with a commercial kit (IDEXX Laboratories, USA). Figure 2 shows that the PRRSV chimeric protein reacted with PRRSV-positive sera, indicating that antibodies generated in PRRSV-infected pigs 5 bind to one or several sequences present in the chimeric protein. In this way, the antigenicity of chimeric protein was preserved. It is noteworthy that the commercial kit recommends a 1:40 dilution of the sample, while the chimeric protein ELISA was performed with 1:100 sample dilutions. This can explain the higher absorbance readings that were obtained with commercial kit.

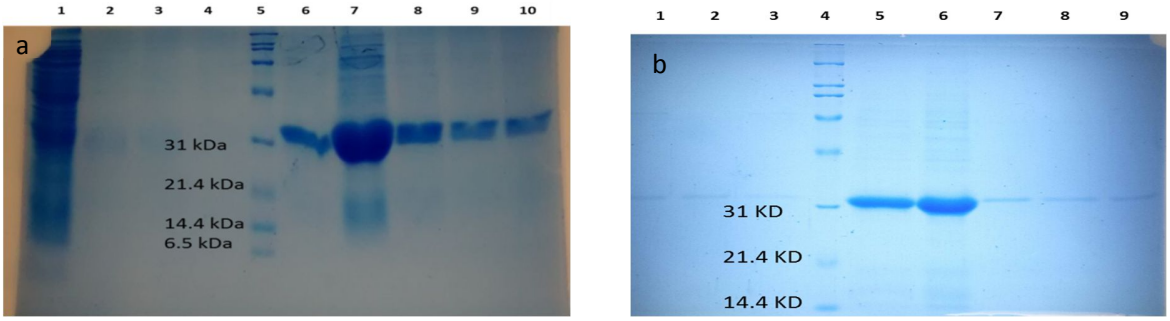


Figure 1. SDS-PAGE analysis of PRRSV chimeric protein purification. a) First round of IMAC purification. Lane 1: starting protein lysate, lanes 2-4: washing flowthrough, lane 5: molecular weight standards, lanes 6-10: elution fractions. b) Second round of IMAC purification. Lane 1: starting protein lysate, lanes 2-3: washing flowthrough, lane 4: molecular weight standards, lanes 5-9: elution fractions.

IgG response in mice immunized with the PRRSV chimeric protein is shown in Figure 3. When the protein is administered subcutaneously in a prime-single boost immunization scheme and adjuvated with Freund´s adjuvant, the IgG titers can reach values of 1:1,562,500 two weeks after the last immunization.

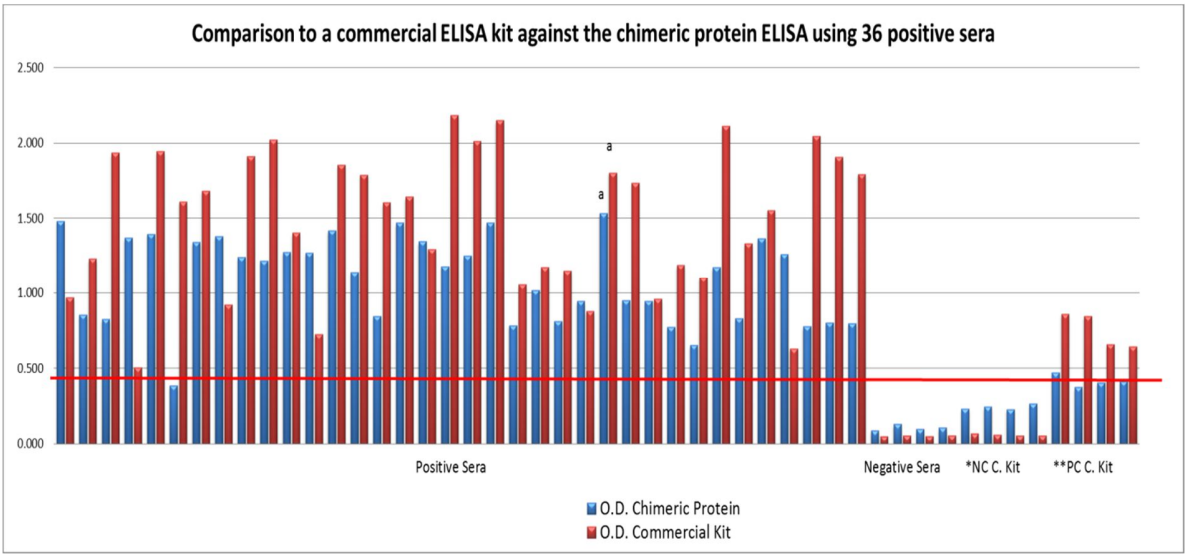


Figure 2. Comparison of PRRSV chimeric protein ELISA and PRRSV commercial kit. 36 PRRSV-positive swine sera and 4 PRRSV-negative sera were used for the assay. The horizontal red line indicates the cutoff for the commercial kit. Blue bars correspond to absorbance readings using chimeric PRRSV ELISA, while red bars correspond to the commercial ELISA kit. The letter "a" indicates no statistically significant difference between the compared readings, as determined by ANOVA.*NC C. Kit: negative control of Commercial Kit, **PC C. Kit: Positive Control of Commercial Kit.

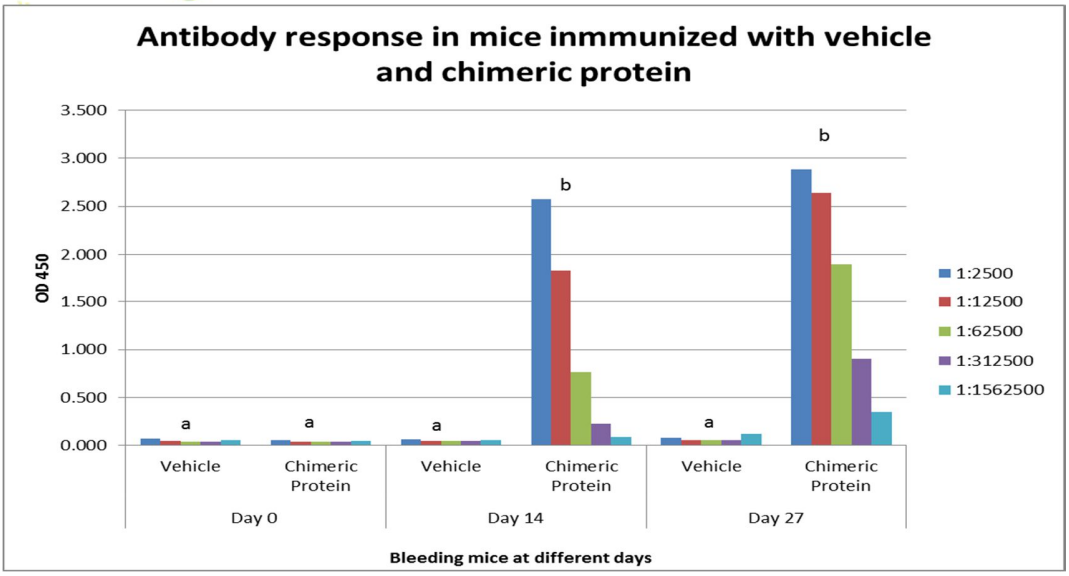


Figure 3. IgG titer against PRRSV chimeric protein in immunized mice. Sera from three bleedings (days 0, 14 and 27) were diluted and analyzed by ELISA. Letter "a" indicates no statistically significant difference between the immunizations, while letter “b” indicates statistically significant difference between them using ANOVA.

DISCUSSION

In this study, the design, expression, purification and immunogenicity of a novel chimeric protein containing immunorelevant sequences from PRRSV GP3, GP4, GP5 and M proteins have been successfully accomplished. Since the chimeric protein lacks a complex secondary structure, the use of a fusion partner, such as thioredoxin, was necessary. This approach allowed the significant accumulation of recombinant protein in IPTG-induced *E. coli* cells in both soluble and insoluble fractions. The high expression levels (up to 15 mg/L of culture medium) facilitated the downstream steps. The antigenicity assay, performed by ELISA, demonstrated that the PRRSV chimeric protein preserved the original structure of one or several of the sequences that are relevant for mounting a protective antibody response against PRRSV. Additionally, the fact that 35 of 36 PRRSV-positive serum samples also resulted positive in ELISA plates coated with PRRSV chimeric, suggest that this novel protein could serve for the development of a PRRSV antibody ELISA kit. Last, immunogenicity against the PRRSV chimeric protein in immunized mice was high, as a potent antibody-inducing adjuvant (Freund´s adjuvant) was used. However, the use of this adjuvant in pigs is prohibited. Therefore, a proper adjuvant must be employed in a vaccine formulated with the PRRSV chimeric protein in order to evaluate its protective efficacy in pigs.

CONCLUSION

A novel PRRSV chimeric protein was expressed in *E. coli* and purified through two rounds of immobilized metal ion affinity chromatography, with yields reaching 15 mg protein/L culture medium. The purified chimeric protein was recognized by 36 randomly selected sera that had been previously confirmed as PRRSV-positive by antibody ELISA. In addition, 10 µg of chimeric protein adjuvated with Freund´s

adjuvant and administered subcutaneously in a two-dose scheme to female BALB/c mice elicited IgG titers of 1:1,562,500. A clinical trial to assess the efficacy of the chimeric protein in piglets is in progress.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by the Project (238667) approved by Fondo Sectorial de Innovación Secretaría de Economía-CONACYT (FINNOVA).

REFERENCES

[1] Zhou, L., Ni, Y-Y., Piñeyro, P., Cossaboom, C.M., Subramaniam, S., et al. (2013), "Broadening the Heterologous Cross-Neutralizing Antibody Inducing Ability of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus by Breeding the GP4 or M genes", PLoS ONE 8(6): e66645. doi:10.1371/journal.pone.0066645.

[2] Wensvoort, G., Terpstra, C., Pol, JM., Laak, E.A., Bloemraad, M., Kluyver, E.P., et al. (1991), "Mystery swine disease in the Netherlands: the isolation of Lelystad virus", Vet Q. 1991;13:121–30.

[3] Liu, C., Liu, C. J., Yuan, X. G., Zhang, C. (2013), "Purification and characterization of recombinant envelope protein GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus from E. coli", Journal of Chromatography A, 1304 (2013) 133– 137.

[4] Moormann, R.J. (1993) "Subgenomic RNAs of Lelystad virus contain a conserved leader-body junction sequence", J Gen Virol 1993;74:1697-1701.

[5] Wu, W.H., Fang, Y., Farwell, R., Steffen-Bien, M., Rowland R.R., HENNINGS C.J. et al. (2001), "A 10-kDa structural protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus encoded by ORF2b", Virology 2001;287:183-191.

[6] Murtaugh, M.P., Elam, M.R., Kakach, L.T. (1995), "Comparison of the structural protein coding sequences of the VR- 2332 and Lelystad virus strains of the PRRS virus", Arch Virol 1995;140:1451-1460 [7] Meulenberg, J.J., Petersen-Den, B. A., DE Kluyver, E.P., Moormann, R.J., Schaaper, W.M., Wensvoort, G. (1995) "Characterization of proteins encoded by ORFs 2 to 7 of Lelystad virus", Virology 1995;206:155-163.

[8] Balasuriya, U.B., Maclachlan, N.J. (2004), "The immune response to equine arteritis virus: potential lessons for other arteriviruses", Vet Immunol Immunopathol 2004;102:107-129.

[9] Ostrowski, M., Galeota, J.A., Jar, A.M., Platt, K.B., Osorio, F.A., Lopez, O.J. (2002), "Identification of neutralizing and nonneutralizing epitopes in the porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 ectodomain", J Virol 2002;76:4241-4250.

[10] Meulenberg, J.J.M. (2000), "PRRSV the virus", Vet. Res, 2000 31: 11-21.

[11] Delputte, P.L., Vanderheijden, N., Nauwynck, H.J., Pensaert, M.B. (2002), "Involvement of the matrix protein in attachment of porcine reproductive and respiratory syndrome virus to a heparinlike receptor on porcine alveolar macrophages", J Virol 2002;76:4312-4320.

[12] Mardassi, H., Massie, B., Dea, S. (1996), "Intracellular synthesis, processing, and transport of proteins encoded by ORFs 5 to 7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus", Virology 1996;221:98-112.

[13] Vanderheijden, N., Delputte, PL., Favoreel, HW., Vandekerckhove, J., Van Damme J., Van Woensel P.A., *et al.* (2003), "Involvement of sialoadhesin in entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages", J Virol 2003;77:8207-8215.

[14] Cao, Y., Ouyang, H., Zhang, M., Chen, F., Yang, X., Pang, D., Ren, L. (2014), "Analysis of molecular variation in porcine reproductive and respiratory syndrome virus in China between 2007 and 2012", VIROLOGICA SINICA 2014, 29 (3): 183-188.

[15] Rogan, D., Babiuk, L.A. (2005), "Novel vaccines from biotechnology", Rev Sci Tech2005.; 24:159-174.

[16] Hu, J., Ni, Y., Dryman, B. A., Meng, X.J., Zhang, C. (2012), "Expression and purification of a chimeric protein consisting of the ectodomains of M and GP5 proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)", Journal of Chromatography B, 911 (2012) 43– 48.

NANOTOXICOLOGY IN HeLa cells: GOLD NANOPARTICLES COATED WITH ORGANIC MOLECULES

(Nanotoxicología en células HeLa: Nanoparticulas de oro recubiertas con moléculas orgánicas)

Lérida Liss Flores-Villavicencio[a*], Pablo Cardoso-Ávila[b], Juan Luis Pichardo- Molina[b], José Pedro Castruita-Domínguez[c], Gloria Barbosa-Sabanero[d], Myrna Sabanero-López[a+].

[a] Departamento de Biología, DCNE, Universidad de Guanajuato.
[b] Centro de Investigaciones en Ópticas A.C.
[c] Departamento de Ecología, CUCBA, Universidad de Guadalajara.
[d] Departamento de Ciencias Médicas, DCS, Universidad de Guanajuato.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: myrna.sabanero@gmail.com

Área del Conocimiento: Biotecnología Farmacéutica.

ABSTRACT
Gold nanoparticles (GNPs) are materials with unique optical, physical and chemical properties that have demonstrated the versatility of these systems in biological applications. It is then of first importance to provide a cytotoxicity study of GNPs – host cells interaction. In regard, we investigated on the human cervix cancer cell line (HeLa), the biocompatibility of GNPs coated with three different organic molecules, cystemine, 4-aminothiophenol (4ATP) and serum bovine albumin (BSA) designed as II, III and IV respectively. The synthesis of gold nanorods was done using the method reported by Nikoobakht and El-Sayed (2003). The TEM images shown: Rods-silica of 22±4 nm long, 9±1 nm and spherical GNPs with a mean sizes of 34±5, 32±7 and 25±5 nm for samples II, III and IV, respectively. Cytoxicity of GNPs has been assessed by assays targeting enzymatic activity such as mitochondrial dehydrogenase (XTT assay), structural study of organelles, i.e. cytoskeleton (Phalloidin-FITC), nuclei (DAPI stain) and plasmatic membrane (Trypan blue assay). The analysis of Genomic DNA integrity was performed according to AxiPrep™ Multisource Genomic DNA Miniprep kit. The result shown: *i)* that intracellular GNPs presence, *ii*) unalterated actin stress fibers, *iii)* DNA integrity and packaging into heterochromatin, *iv)* metabolic activity (73-100%) and cell viability (90-100%). Moreover, properties such as cell spreading and adhesion, cell growth were similar to control cells. Together, results indicated the biocompatibility of GNPs. Currently, the GNPs applications *in vitro* as therapeutic vehicles and photothermal therapy are analyzed.

Keywords: Gold nanoparticles, organelles, cytotoxicity, photothermal therapy.

RESUMEN
Las nanopartículas de oro (NPO) son materiales con propiedades ópticas, físicas y químicas únicas que han demostrado la versatilidad de estos sistemas en aplicaciones biológicas. Es entonces de primera importancia proporcionar un estudio de citotoxicidad de la interacción NPO - células huésped. En este sentido, nosotros investigamos en la línea celular de cáncer de cervix humano (HeLa), la biocompatibilidad de las NPOs recubiertas con tres moléculas orgánicas diferentes, cisteamina, 4-aminotiofenol (4ATP) y albúmina de suero bovino (BSA) designadas como II, III y IV, respectivamente. La

síntesis de “nanorods” de oro se realizó utilizando el método descrito por Nikoobakht y El-Sayed (2003). Las imágenes de TEM mostraron: “rod-silica” de 22 ± 4 nm de largo, 9 ± 1 nm y NPOs esféricas con un tamaño promedio de 34 ± 5, 32 ± 7 y 25 ± 5 nm para las muestras II, III y IV, respectivamente. La citotoxicidad de las NPOs fue evaluada por ensayos de la actividad enzimática tales como la deshidrogenasa mitocondrial (ensayo XTT), estudios estructurales de organelos, i.e. citoesqueleto (Faloidina-FITC), núcleo (tinción DAPI) y la membrana plasmática (ensayo de azul de Tripano). El análisis de la integridad del ADN genómico fue realizado de acuerdo al kit AxiPrepTM Multisource Genomic DNA Miniprep. Los resultados muestran: i) la presencia intracelular de las NPO, ii) las fibras de estres de actina no alteradas, iii) la integridad del ADN y el empaquetamiento en heterocromatina, iv) la actividad metabólica (73-100%) y la viabilidad celular (90-100%). Además, las propiedades tales como la extensión celular y adhesión, el crecimiento celular fueron similares a las células control. En conjunto, los resultados indican la biocompatibilidad de las NPOs. Actualmente, se analizan las aplicaciones de las NPOs *in vitro* como vehículos terapéuticos y en la terapia fototérmica.

Palabras Clave: Nanoparticulas de oro, organelos, citotoxicidad, terapia fototérmica.

INTRODUCTION

Metallic nanoparticles are of great interest for several applications in nanomedicine, especially in imaging and sensing, drug delivery and photothermal therapy. Gold nanoparticles (GNPs) are materials with unique optical, physical and chemical properties that have demonstrated the versatility of these systems in biological applications [1].

Since these GNPs to interact with living cells it is essential to design of biocompatible GNPs [2], for nanoparticles, the major biological effects involve interactions with cellular components such as the plasma membrane, organelles, or macromolecules. As different nanoparticles can trigger distinctive biological responses, it is important that cytotoxicity studies are conducted for each nanoparticle type [1]. In this context, the present studies analyze on the human cervix cancer cell line (HeLa), the biocompatibility of GNPs coated with three different organic molecules, cystemine, 4-aminothiophenol (4ATP) and serum bovine albumin (BSA).

METODOLOGY

Synthesis of gold NP and functionalization. The synthesis of gold nanorods (GNRs) was done using the method reported by Nikoobakht and El-Sayed (2003). The synthesis of coated gold nanoparticles were realized added 4-aminothiophenol (4ATP), cysteamine, cysteamine-BSA to $HAuCl_4$ in 50mL of miliQ water, designed as II, III and IV respectively. The samples were dialyzed (Spectra/Por 4, Spectrum Labs) and washed in miliQ water with vigorous stirring for 48 hours. Finally, the optical absorbance in the peak of maximum absorption was adjusted to 1 OD with the addition of miliQ water for the four gold NPs. Chemicals and reagents were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis Mo USA).

Characterization of gold NP. UV-Vis absorption spectroscopy was carried out for the plasmon characterization using a miniature Stellarnet spectrometer EPP2000 in the wavelength range from 300 to 850 nm. The particle size and morphology were evaluated using transmission electron microscopy (TEM; Jeol, Jem 1230). Statistical analysis was performed on the TEM images by using the Image J 1.49i (Wayne Rasband, National Institute of health USA) to assess the size of the particles.

Cell culture. The human cervix cancer cell line HeLa ATCC® CCL-2™ was selected for this study. The cells were cultivated in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, GIBCO, USA) supplemented with fetal bovine serum 10% (GIBCO, USA) and incubated at 37 °C, 5% CO_2.

Exposure of HeLa cells to gold nanoparticles and cellular viability assay. HeLa cells cultures ($4x10^5$ cell/100µL) were prepared in 96-well plates (Costar, Corning, USA), which were exposed to gold nanoparticles for 24h. The gold nanoparticles were placed at the time of subcultivation (0h) and monolayer cells with 70% confluent. Cells no exposed was used as control. After exposure, the cell viability and metabolic activity were determined by Trypan Blue and XTT assay [3] respectively.

Structural analysis of organelles. In HeLa cells exposure to gold nanoparticles as indicated above, was analyzed the cytoskeleton and nuclei, for these experiments, the cells were fixed with 4% formaldehyde, and the actin fibrils were stained by FITC- Phalloidin [4] while the nuclei were stained with Vecta Shield-DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) and observed under a standard epifluorescence microscope (Leica, DMLS) using a 450-490nm B filter. The images acquisition was with camera AxioCam ICc1 (Carl Zeiss). In addition, the analysis of Genomic DNA integrity was performed according to AxiPrep™ Multisource Genomic DNA Miniprep kit (AXIGEN Biosciences). The bands were visualized in ChemiDoc MP System (UV light at 260-280nm, BIORAD) and image acquisition with Image Lab™ software (BIORAD).

RESULTS

Gold Nanoparticles. Figure 1 shows the TEM images of Rods-silica (I) of 22±4 nm long, 9±1 nm and spherical GNPs with a mean sizes of 34±5, 32±7 and 25±5 nm for samples II, III and IV, respectively.

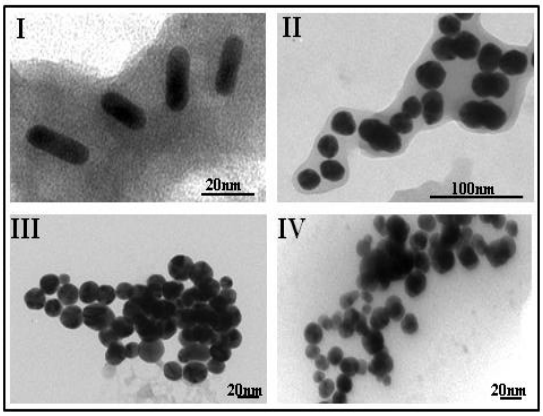
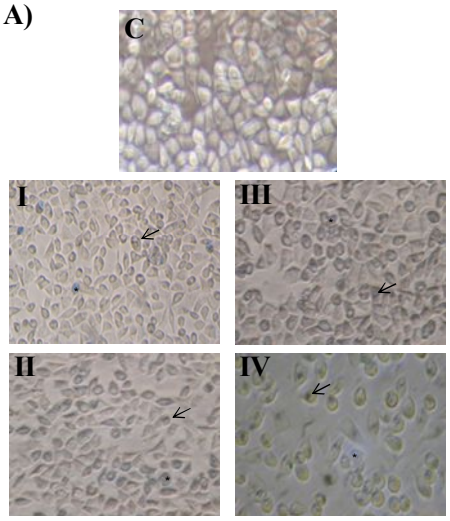


Figure 1. TEM images for: GNP I - the Rods-silica (22±4 nm long, 9±1 nm wide and 10±5 nm silica shell), GNP II - 4ATP (34±5 nm), GNP III - Cysteamine (32±7 nm) and GNP IV - Cysteamine-BSA–capped gold NPs (25±5 nm)

Determination of cellular viability and metabolic activity. One first cytotoxicity test involves the observation of the cells with bright-field microscopy for analized cellular morphology and the permeability to Trypan Blue solution. Figure 2A shows that cells could uptake the GNPs forming aggregates that are visualized as black clusters. In these assay the decreased cell viability was 9, 0.5, 17 and 0% for I-IV GNPs respectively, and the mitochondrial activity was 73-97% (Fig. 2B).

A)



B)

Cellular viability/Metabolic activity		
GNPs	At the time of subcultivation (0h)	Monolayer cells
I	99 /100	90/73
II	90/95	99/86
II	99 /100	93/85
IV	99/100	100/97

Figure 2. Cellular viability and Metabolic activity of HeLa cells exposed to gold nanoparticles I-IV. Panel A). The non-viable cell shows blue stained (asterix), the gold nanoparticles are inside HeLa cells (arrow) and cell morphology is similar to control (C). Panel B). The gold nanoparticles (I-IV) were placed at the time of subcultivation and monolayer cells with 70% confluent, after exposed to GNPs. The experiments were performed in triplicate and the data are expressed as percentage cell viability and metabolic activity.

Cytoskeleton and Nuclei analysis. Interactions between GNPs and biomacromolecules as proteins and nucleic acids are important since they be essential for vital process in the cells. The interaction of GNPs (I-IV) with the cytoskeleton (actin microfilaments) shows that the exposition to GNPs unmodificated the actin structure and is similar to control cell where the actin is well-defined with clear stress fibers (Fig. 3A vs 3B-GNP IV). Furthermore, the GNPs appear dark on the images indicate that penetrated the cells and form aggregate in the cytoplasm (Fig. 3B and C). The analysis of nuclei morphological structure showed that DNA packaging into heterochromatin was homogeneous (Fig. 3B' and C').

Genomic DNA integrity. The genomic DNA integrity was observed after treatment with either gold nanoparticles, moreover the rRNA 28S and 18S are evidenced (Figure 4).

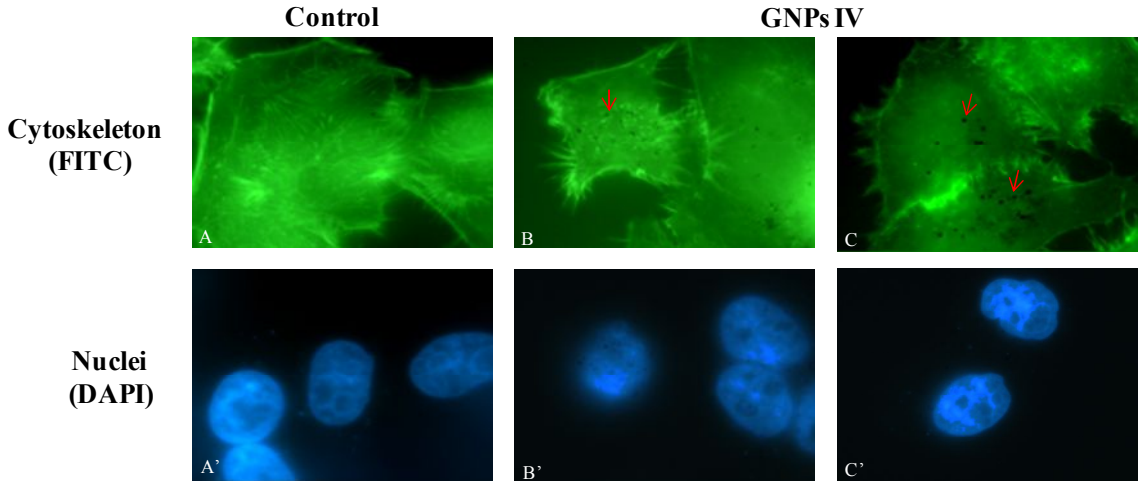


Figure 3. Effect of gold nanoparticles IV on the cytoskeleton distribution of HeLa cells. The actin-microfilaments was stained with Phalloidin-FITC and the nuclei with DAPI. The control cells unexposed to gold nanoparticle (A, A'). The arrow indicate the Cysteamine-BSA–capped gold NPs.

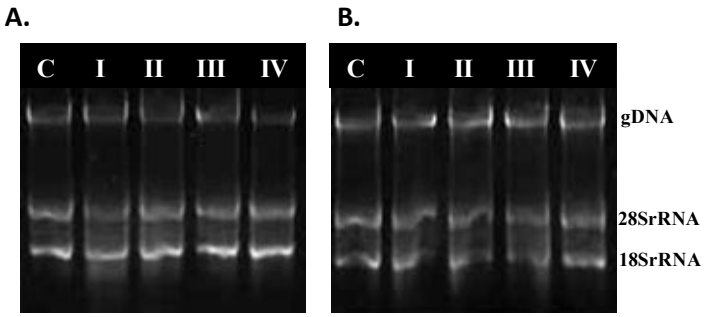


Figure 4. Genomic DNA of cells exposed to gold nanoparticles (I-IV) at the time of subcultivation (A) and monolayer cells (B). C. Control, without GNPs.

DISCUSSION

Nanotoxicology as a new discipline should make an important contribution to the development of a sustainable and safe nanotechnology. Toxicology studies are the basis for protection of human health and the environment relating to nanotechnology [1]. In this regard, our study supports that gold nanoparticle coated with three different organic molecules no shown cellular toxicity, additional studies about exposure GNPs in other cells, shown differential cytotoxicity depending of the concentration, coating, size and roughness [1, 2, 5]. Structural analysis of organelles as the nuclei (genomic DNA) shown integrity and the cytoskeleton indicated no altered the actin microfilaments, despite the cellular uptake of gold nanoparticles and cytoplasmic localization. In contrast, human dermal fibroblasts treated with citrate-gold nanoparticles was observed actin disruption, therefore the adhesion, cell proliferation and motility were decrease [6]. The *in vitro* toxicological studies become extremely relevant and important to characterize the GNPs effects after exposure due useful for a wide array of biological application. Currently, the GNPs applications as therapeutic vehicles and photothermal therapy are analyzed.

CONCLUSION

The data indicate that gold nanoparticles coated with different organic molecules (4-aminothiophenol (4ATP), cysteamine, cysteamine-BSA) are biocompatibility to human cells, despite being taken up into cells.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by a CIO-UG (004/2015) grant to MSL and JLPM.

REFERENCES

[1] Sumit, A., Jyutika, M. R., Kishore, M. P. (2012) "Nanotoxicology and in vitro studies: The need of the hour", Toxicology and Applied Pharmacology, 258(2):151–165

[2] Khlebtsov, N. and Lev, Dykman. (2011), "Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles: a review of in vitro and in vivo studies", Chem. Soc. Rev., 40(3):1647–1671

[3] Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D.W., Azeredo, J.(2011) "Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans Candida* species", Trends Microbiol., 19(5):241–247

[4] Soto, Arredondo, K.J., Flores-Villavicencio, L.L., Serrano-Luna, J.J., Shibayama, M., Sabanero-López, M. (2014), **"**Biochemical and cellular mechanisms regulating *Acanthamoeba castellanii* adherence to host cells", J. Parasitology, 141(4): 531–541

[5] Lewinski, N., Vicki, C., Drezek R. (2008), "Cytotoxicity of Nanoparticles", Small, 4(1):26-49

[6] Pernodet, N., Xiaohua, F., Yuan S., Asya B., Aditi R., Sokolov J., Ulman A., Rafailovich M. (2006), "Adverse Effects of Citrate/Gold Nanoparticles on Human Dermal Fibroblasts", Small, 2(6):766 – 773.

EVALUATION OF THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF SYNTHETIC PEPTIDES OVER MULTIDRUG RESISTANT BACTERIA ISOLATED FROM DIABETIC FOOT ULCERS

(Evaluación de la actividad antimicrobiana de péptidos sintéticos sobre bacterias multirresistentes aisladas de úlceras de pie diabético)

Alexis Joavany Rodríguez Solís[a]*, Yareli Morales Guzmán[b], Elba Cristina Villegas Villarreal[a], Gerardo Alfonso Corzo Burguete[c+].

[a]Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
[b]Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
[c]Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: corzo@ibt.unam.mx

Área del Conocimiento: Biotecnología Farmacéutica.

ABSTRACT
In the world around 382 million people suffer Diabetes, foot ulcers is one of the most important complications of this disease, because cause a high rate of amputations or inclusively the dead. The infection is polibacterial, including both Gram-positive and Gram-negative bacteria. Among the bacterial species reported in the foot ulcers *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* are the most important. The treatment of the diabetic foot ulcers is complicated requires the use of several antibiotic combinations, and the success in not guaranteed when multidrug resistant bacterial strains are implicated. For this reason is required the use of new type of antibiotics for the treatment, antimicrobial peptides could be a possible solution for this problematic. In this report the antimicrobial activities of six synthetic peptides derivate from the antimicrobial peptide Pandinin 2, characterized from the venom of the African scorpion *Pandinus imperator*, were evaluated over a *S. aureus* and two *P. aeruginosa* strains, these bacteria display up to 10 different antibiotic resistance. Peptides were chemically synthetized and purified by HPLC, the antimicrobial activities of these peptides were evaluated in Muller-Hinton broth according to the specifications of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), serial concentration from 1.6 to 25 µM of each peptides were evaluated over the bacterial strains, observing the inhibition of the bacterial growth by optical density at 595 nm. All six synthetic variants as well the parental peptide, inhibited the growth of *S. aureus* strain at concentration between 1.56-6.12 µM, however the effect of the peptides over the two *P. aeruginosa* strains was bacteriostatic at the maximum concentration of 25 µM. These peptides could represent an alternative to control multidrug resistant *S. aureus* infections, as those occurred in diabetic foot ulcers.

Keywords: antimicrobial peptides, multidrug resistant bacteria, diabetic foot ulcers.

RESUMEN
En el mundo se estima que alrededor de 382 millones de personas padecen Diabetes, una de las complicaciones más importantes de esta enfermedad son las úlceras del pie diabético (UPD), debido a que causa una alta tasa de amputaciones o inclusive la muerte por complicaciones ocasionadas por las infecciones a los pacientes que la padecen. La infección presente en las UPD es polibacteriana, incluyendo tanto bacterias Gram positivas como Gram negativas. Entre las especies bacterias reportadas en UPD, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* destacan como las más importantes. El tratamiento de la UPD es complicado debido a que requiere de la combinación diferentes antibióticos, y su efectividad no está garantizada cuando en las infecciones se presentan bacterias multirresistentes a los antibióticos. Por esta razón es necesario el desarrollo de nuevos tipos de antibióticos para su tratamiento, los péptidos antimicrobianos se plantean como una posible solución a este problema. En este trabajo las actividades antimicrobianas de seis péptidos sintéticos, derivados del péptido antimicrobiano Pandinina 2 (Pin2) caracterizado del veneno del escorpión africano *Pandinus imperator*, fueron evaluadas sobre cepas de *S. aureus* y *P. aeruginosa* aisladas de UPD, con hasta 10 resistencias a los antibióticos. Todas las variantes evaluadas, así como el péptido parental Pin2, lograron inhibir por completo el crecimiento de *S. aureus*, a concentraciones entre 1.56-6.13 µM. Sin embargo, el efecto de estos péptidos sobre las cepas de *P. aeruginosa* evaluadas, solo fue bacteriostático a las máximas concentración evaluada 25 µM. Estos péptidos podrían presentarse en el futuro como una alternativa para el control de cepas de *S. aureus* mutirresistentes a los antibióticos, como las que se presentan en UPD.

Palabras Clave: Péptidos antimicrobianos, bacterias multirresistentes, úlceras de pie diabético.

INTRODUCTION

Diabetes is a metabolic disorder characterized by elevated blood glucose concentration related to resistance to the action of insulin, insufficient insulin secretion, or both. This disease is classify in three main categories, type 1 diabetes caused by pancreatic β-cells destruction leading to absolute insulin deficiency, type 2 diabetes predominantly caused by insulin resistance with relative insulin deficiency and gestational diabetes [1]. In the year 2013 the International Federation of Diabetes estimated that the 8.3% of the world's population suffer diabetes, around 382 million people, but only the 46% are diagnosed, while is estimated that by the year 2035 this number rise to 592 million. China is the country with the largest number of population with diabetes, followed by India and the United States of America, while Mexico is the sixth country around the world in population with diabetes [2]. According to the national data, diabetes is the second death cause in the Mexican population. In the year 2013 the incidence of type 2 diabetes was estimated in 9.2% and 27,987 new cases were diagnosed [3,4].

The main complications of the patients with diabetes include retinopathy, nephropathy and neuropathy. Vascular and feet ulcers are the more common diabetic neuropathies, often related to polymicrobial infections [5]. The treatment of diabetic foot ulcer infections is difficult, requires the use of great dose of antibiotics alone or in combinations, however their effectiveness is diminished when multidrug resistant bacteria are presents in the infection, leading the development of gas gangrene and finally to

amputation in many cases [6]. Among the bacterial strains implicated in diabetic foot ulcers, *Escherichia*, *Staphylococcus* and *Pseudomonas* highlight as the main genres [7,8].

Cationic antimicrobial peptides (CAMPs) have proposed as a possible solution for the control of multidrug resistant bacteria [9], these molecules are ubiquitous in nature, are components of the biological defense system of microorganisms, plants, animals and humans [10,11]. CAMPs with alpha-helical conformation share some common characteristics such as antimicrobial activities at low micromolar concentrations and alpha-helix conformation in hydrophobic environments [12]. They have potent antibacterial activities that made them promissory candidates to develop novel antibiotics because of their broad-spectrum activity towards multi-resistant pathogenic Gram-positive and Gram-negative bacteria, as well as towards clinically important yeasts such as *Candida albicans* [13,14]. In this work, the antimicrobial activities of six synthetic variants of the antimicrobial peptide Pandinin 2 (Pin 2), identified from the venom of the African scorpion *Pandinus imperator* [15], were evaluated against multidrug resistant bacterial strains isolated from diabetic foot ulcers.

METHODS

Microorganisms

For the evaluation of the antimicrobial activity of the different peptides, four bacterial strains were employed, *E. coli* ATCC 25922 used as control [16], a *S. aureus* and two *P. aeruginosa* strains previously isolated from diabetic foot ulcers (Table 1). All bacterial strains were activated from stocks cryopreserved in glycerol, and maintained in Petri dishes with Mueller-Hinton medium for subsequent experiments.

Table 1. Characteristics of the bacterial strains evaluated.

Name	Gram staining	Strain	Antibiotic resistance
Escherichia coli	negative	ATCC 25922	None*
Staphylococcus aureus	positive	UPD13	10[†]
Pseudomonas aeruginosa	negative	UPD3	8[†]
Pseudomonas aeruginosa	negative	UPD12	8[†]

*CLSI [16]
[†]Number of antibiotic resistance according to the Bio-Rad multidisc II test.

Solid phase peptide synthesis

The peptides Pin2 and their variants were chemically synthesized by a solid-phase method using the Fmoc methodology. Fmoc-Asp(otBu) was used to provide a free carboxyl at the C-terminus of the Pin2 and its variants. Cleavage and deprotection of peptides, from resins and from protecting side chain groups, were performed using a chemical mixture composed of 1 g crystalline phenol, 0.2 g imidazole, 1 mL thioanisol, 0.5 mL 1,2-ethanedithiol in 20 mL trifluoroacetic acid (TFA). The resin was removed by filtration, and the peptides in solution were precipitated using cold ethyl ether. The precipitated peptides were washed twice with cold diethyl ether to remove remaining scavengers and protecting groups. Each crude synthetic peptide was then dissolved in a 10% aqueous acetonitrile solution and separated by reverse phase HPLC (RP-HPLC) on a semipreparative C_{18} column (10×250 mm, Vydac, USA).

Cationic exchange and C_{18} analytical RP-HPLC chromatography were further used to purify the synthetic peptides. The properties and sequences of the different peptides evaluated in this work are presented in table 2.
The concentration of the peptides was calculated by UV spectrometry (280 nm) using a molar extinction coefficient (ε) of 5,500 $M^{-1}cm^{-1}$ according to the Lambert-Beer Law.

Table 2. Properties and sequences of the peptides evaluated.

Peptide	Sequence	Residues	MW (Da)	Charge	ε ($M^{-1}cm^{-1}$)
Pin2	FWGALAKGALKLI**P**SLFSSFSKKD	24	2612.1	+3	5,500
Pin2 [V]	FWGALAKGALKLI**V**SLFSSFSKKD	24	2614.1	+3	5,500
Pin2 [G]	FWGALAKGALKLI**G**SLFSSFSKKD	24	2572.0	+3	5,500
Pin2 [GV]	FWGALAKGALKLI**GV**SLFSSFSKKD	25	2671.1	+3	5,500
Pin2 [VG]	FWGALAKGALKLI**VG**SLFSSFSKKD	25	2671.1	+3	5,500
Pin2 [GVG]	FWGALAKGALKLI**GVG**SLFSSFSKKD	26	2728.2	+3	5,500
Pin2 [GPG]	FWGALAKGALKLI**GPG**SLFSSFSKKD	26	2726.2	+3	5,500

Antimicrobial assays

Minimal inhibitory concentrations (MIC) and growth inhibition curves were obtained using pure peptides in the presence of bacteria using the broth microdilution assays in accordance to the procedures from the Clinical and Laboratory Standards Institute.

Broth microdilution assays were performed using stock solutions of the different antimicrobial peptide diluted serially from 25 to 1.6 µM to a final volume of 200 µL, placed in polypropylene microtubes and vacuum dried. Next, a volume of 200 µL of the bacterial suspension (1×10^5 CFU/mL) in Mueller Hinton broth was dispensed into each of the polypropylene microtubes and mixed with the diluted antimicrobial peptide. Then each mixture was transferred into a well of a 96-well microtiter plate and bacterial growth was evaluated by measuring absorbance every 2 h until 12 h of incubation time at 37°C. The optical density (OD) of each well was measured at 595 nm in an ELISA plate reader (BioRad, model 450, Hercules, CA, USA). The positive control contained only the bacterial suspension, and the negative control contained only sterile culture medium. The resulting MICs values were defined as the lowest peptide concentration that showed zero visible growth or absence of growth, that is growth inhibition (100%). The minimal inhibitory concentrations (MIC) values were the mean result of three independent experiments.

RESULTS

Antimicrobial activity

The antimicrobial activities of the different peptides over the growth of the bacterial strains were evaluated in liquid medium. The growth kinetics were followed by OD (595 nm) measurements, to determine the effect of the peptides (bactericidal or bacteriostatic) in relation to the control without peptide. When the effect of the peptide was bactericidal, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) value was reported, while when the effect was bacteriostatic the percentage of inhibition was calculated. The experiments were performed by triplicate and their reproducibility was evaluated by the

standard deviation calculation. A total of 28 growth kinetics were evaluated, result of the evaluation of the seven peptides towards four bacterial strains, in table 2 the effect of the peptides over the growth of the bacteria are showed.

All peptides showed a bactericidal effect over *E. coli* ATCC 25922 and *S. aureus* UPD13 at concentrations between 1.6 to 12.5 µM. However, *S. aureus* UPD13 was the most susceptible bacterial strain among all evaluated. In the table 3 the values of MIC calculated are showed.

Table 3. Effect of the peptides over the growth of the bacterial strains.

	Bacterial strain			
Peptide	***E. coli* ATCC 25922***	***S. aureus* UPD13***	***P. aeruginosa* UPD3**	***P. aeruginosa* UPD12**
Pin 2	6.3	1.6	*	*
Pin 2 [G]	3.2	1.6	*	*
Pin 2 [V]	25	3.2	*	*
Pin 2 [GV]	12.5	6.3	*	*
Pin 2 [VG]	6.3	3.2	*	*
Pin 2 [GVG]	3.2	3.2	*	*
Pin 2 [GPG]	6.3	1.6	*	*

[§]Bactericidal effect/minimum inhibitory concentration [µM]
*Bacteriostatic effect at 25 µM
NE: Non effect detected

The peptides with the better activity against *S. aureus* UPD13 were Pin2, Pin2 [G] and Pin2 [GPG], all these peptides inhibited completely the bacterial growth at concentrations of 1.6 µM, the peptides Pin2 [V], Pin2 [VG] and Pin2 [GVG] inhibited the bacterial growth at 3.2 µM, while the peptide Pin2 [GV] displayed the highest MIC value 6.2 µM. Respect to the effect of the Pin2 variants over *P. aeruginosa* UPD3 and *P. aeruginosa* UPD12, none of the peptides showed a bactericidal effect at the maximum peptide concentration (25 µM).

Most of the peptides showed a bacteriostatic effect over both strains. As is observed in figure 1, the strains *P. aeruginosa* UPD3 is more susceptible to the action of the peptides respect to the *P. aeruginosa* UPD12 strain. When compared the calculated inhibition percentages, the better peptide against both *Pseudomonas* strains was the parental peptide Pin2, followed by Pin2 [G] and Pin2 [V]. The peptide that showed the lower inhibition of the bacterial strain was Pin2 [GV]. The peptides will evaluated at higher concentrations to determine the MIC values towards these strains.

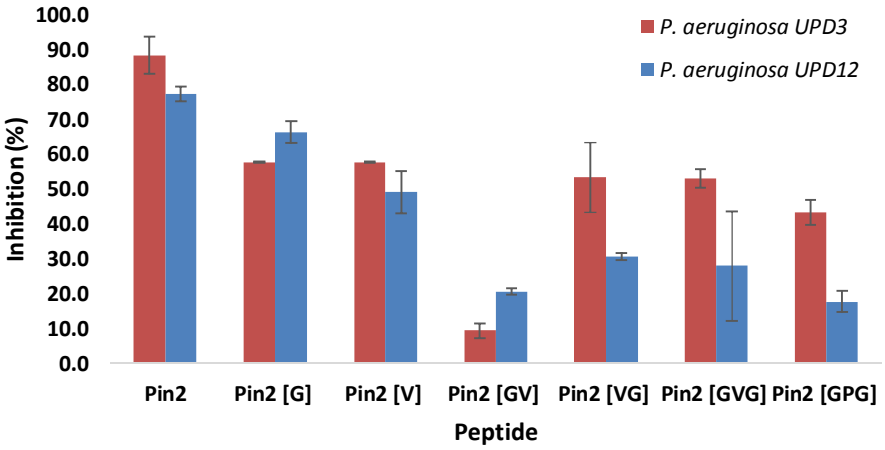


Figure 1: Inhibition effect of the peptides over the growth of the *P. aeruginosa* strains.

DISCUSION

The Gram-positive bacteria *S. aureus* is a great concern in several skin and diabetic foot ulcer infections, in this work the peptides evaluated showed MIC values between 1.6-6.3 µM against a multidrug resistant *S. aureus* strain. In previous studies, the antimicrobial activity of all these peptides was evaluated in the reference strain *S. aureus* ATCC 25923, the observed MIC values were 12.5 µM [17,18]. Here the MIC values were lower, indicating the potential of these peptides to inhibit the growth of clinical isolated Gram-positive multidrug resistant bacteria as *S. aureus*.

None of the peptides displays a bactericidal effect over the *P. aeruginosa* strains, the parental peptide Pin2 and the variant Pin2 [G] showed the higher bacteriostatic effects. The Gram-negative bacterium *P. aeruginosa* is an important opportunistic pathogen. Chronic infections due to this organism are prevalent in cystic fibrosis patients and are frequently recalcitrant to treatment. In addition to displaying high levels of intrinsic antibiotic resistance, *P. aeruginosa* frequently converts to a mucoid state resulting in a rapid adaptive resistance that accounts for the high failure rate of antibiotic therapy in eradicating these infections [19]. *P. aeruginosa* is resistant to many antibiotics, such as penicillin, most of the first, second and third generation cephalosporins, tetracyclines and rifampicin. Resistance is due to the low permeability of its membrane, the presence of efflux pumps and the production of AmpC, a chromosomal β-lactamase [20]. The ability of *P. aeruginosa* cells to form biofilms during infection greatly facilitates its persistence inside the host and contributes to antibiotic resistance [21,22]. The biofilm formation could inhibit the activity of the antimicrobial peptides. In 2013, Carmona and coworkers evaluated the activity of Pin 2 over the *P. aeruginosa* ATCC 9027 strain, reporting MIC values of 50 µM [23], according to these it is probably determine de MIC values of the peptides evaluated here, at concentration between 25-50 µM.

CONCLUTIONS

In this work, the antimicrobial activity of six variants of the antimicrobial peptide Pin2 was evaluated over pathogenic bacterial strains with multidrug resistance. The *S. aureus* UPD13 strain was susceptible to the antimicrobial action of all peptides evaluated, with MIC values between 1.6 a 6.3 µM, however the variants that showed better effect were Pin2[G] and Pin2[GPG]. These peptides could be propose for control of *S. aureus* strains with multidrug resistance. Contrary to the observed over *S. aureus*, the peptides evaluated only displayed a bacteriostatic effect over the *P. aeruginosa* strains, the variants Pin2 [G] and Pin2 [V] showed the major percentages of inhibition at the maximum concentration used (25 µM), it is possible that these peptides display a bactericide effect over *P. aeruginosa* at higher concentrations (25-50 µM). According to the data reported in this work the variants Pin2 [G] and Pin2 [GPG] were selected for the development of future experiments.

AKNOWLEDGEMENTS

The Financial support by SEP-PRODED (DSA/103.5/15/6986) to Alexis J. Rodríguez Solís is greatly acknowledged.

REFERENCES

[1] Triplitt, C., Solis-Herrera, C., Reasner, C., DeFronzo, R.A., Cersosimo, E. (2015), "Classification of Diabetes Mellitus", http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279119/?report=printable.

[2] Federación Internacional de Diabetes (2013), "Atlas de la Diabetes de la FID", 6ta Edición. [Recuperado el 16 de julio de 2015]. http://www.idf.org/diabetesatlas.

[3] Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (2013), "Boletín de Estadísticas vitales 2011", [Recuperado el 16 de julio de 2015]. http://www3.inegi.org.mx/sistemas/biblioteca/ficha.aspx?upc=702825047429.

[4] Secretaría de Salud (2013), "Boletín del Sistema de Vigilancia Epidemiológica Hospitalaria de Diabetes Tipo 2", [Recuperado el 16 de julio de 2015]. http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/bol_diabetes/dm2_bol1_2013.pdf.

[5] Donnelly, R., Emslie-Smith, A.M., Gardner, I.D., Morris, A.D. (2000), "ABC of arterial and venous disease: vascular complications of diabetes", BMJ: British Medical Journal, 320 (7241), 1062-1066.

[6] Pednekar, S.N., Pol, S.S., Kamble, S.S., Deshpande, S.K. (2015), "Drug resistant anaerobic infections: Are they complicating diabetic foot ulcer?", International J. of Healthcare and Biomedical Research, 3 (3): 142-148.

[7] Ruiz-Mercado, H., Miranda-Sosa, S.A., González-Higuera, A., Ochoa-González, F.J. (2007), "Microorganismos bacteriológicos más frecuentes y resistencia en las infecciones de pie del diabético en el Hospital Regional "Dr. Valentín Gómez Farías" del ISSSTE, Zapopan, Jalisco", Revista Mexicana de Angiología, 35 (4): 177-184.

[8] Yerat, R. C., Rangasamy, V. R. (2015), "A clinicomicrobial study of diabetic foot ulcer infections in South India" International Journal of Medicine and Public Health, 5 (3): 236-241.

[9] Kamysz, W. (2005), "Are antimicrobial peptides an alternative for conventional antibiotics", Nuclear Medicine Review. Central and Eastern Europe, 8 (1): 78-86.

[10] Bulet, P., Stöcklin, R., Menin, L. (2004), "Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates", Immunological Reviews, 198 (1): 169-184.

[11] Andreu, D., Rivas, L. (1998), "Animal antimicrobial peptides: an overview", Biopolymers, 47 (6): 415-433.

[12] Huang, Y., Huang, J., Chen, Y. (2010), "Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: relationships of structure and function", Protein and Cell, 1 (2): 143-152.

[13] Park, S.C., Park, Y., Hahm, K.S. (2011), "The role of antimicrobial peptides in preventing multidrug-resistant bacterial infections and biofilm formation", International Journal of Molecular Sciences, 12 (9): 5971-5992.

[14] Yeung, A.T., Gellatly, S.L., & Hancock, R.E. (2011), "Multifunctional cationic host defence peptides and their clinical applications", Cellular and Molecular Life Sciences, 68 (13): 2161-2176.

[15] Corzo, G., Escoubas, P., Villegas, E., Barnham, K., He, W., Norton, R., Nakajima, T. (2001), "Characterization of unique amphipathic antimicrobial peptides from venom of the scorpion Pandinus imperator", The Biochemical Journal, 359 (1): 35-45.

[16] CLSI. (2012), "Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests", Approved standard M2-A12, 12th ed. CLSI, Wayne, PA.

[17] Rodríguez, A., Villegas, E., Satake, H., Possani, L. D., Corzo, G. (2011), "Amino acid substitutions in an alpha-helical antimicrobial arachnid peptide affect its chemical properties and biological activity towards pathogenic bacteria but improves its therapeutic index", Amino Acids, 40 (1): 61-68.

[18] Rodríguez, A., Villegas, E., Montoya-Rosales, A., Rivas-Santiago, B., Corzo, G. (2014), "Characterization of Antibacterial and Hemolytic Activity of Synthetic Pandinin 2 Variants and Their Inhibition against *Mycobacterium tuberculosis*", PLoS ONE, 9 (7): e101742.

[19] Macfarlane, E.L., Kwasnicka, A., Hancock, R.E. (2000), "Role of Pseudomonas aeruginosa PhoP-PhoQ in resistance to antimicrobial cationic peptides and aminoglycosides", Microbiology, 146 (10): 2543-2554.

[20] Lodise, T.P., Patel, N., Kwa, A., Graves, J., Furuno, J.P., Graffunder, E., McGregor, J.C. (2007), "Predictors of 30-day mortality among patients with Pseudomonas aeruginosa bloodstream infections: impact of delayed appropriate antibiotic selection", Antimicrobial agents and chemotherapy, 51 (10): 3510-3515.

[21] Lewis, K. (2001), "Riddle of biofilm resistance", Antimicrobial agents and chemotherapy, 45 (4): 999-1007.

[22] Tam, V.H., Rogers, C.A., Chang, K.T., Weston, J.S., Caeiro, J.P., Garey, K.W. (2010), "Impact of multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa bacteremia on patient outcomes", Antimicrobial agents and chemotherapy, 54 (9): 3717-3722.

IMPROVING COMMERCIAL ANTIBIOTICS FOR THE TREATMENT OF DIABETIC FOOT ULCER USING ANTIMICROBIAL PEPTIDES

(Potenciación de antibióticos comerciales para el tratamiento de úlcera del pie diabético usando péptidos antimicrobianos)

Katia Esmeralda Jiménez Sánchez[1a], Gerardo Corzo Burguete[b], Alexis Joavany Rodríguez Solís[2a], Elba Cristina Villegas Villarreal[2a*+]

[1] Estudiante de Maestría en Biotecnología, [2]Laboratorio de estructura-Función e Ingeniería de Proteínas, [a]Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad #1001 Col. Chamilpa, C.P. 62209 Cuernavaca, Morelos.
[b]Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad No.2001 Col. Chamilpa, C.P. 62210 Cuernavaca, Morelos.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: elbav@uaem.mx

Área del Conocimiento: Biotecnología Farmacéutica.

ABSTRACT
Patients having type 2 diabetes could eventually develop complications such as a diabetic foot ulcer (DFU), if they are not treated effectively. Besides, if DFU is not controlled efficiently, patients will end with lower limb amputations in most of the cases. One of DFU causes is bacterial infection, where antibiotic resistant bacteria are difficult to eradicate. Therefore, the search for new antibiotics or a mixture of them could be a strategy to control microorganism resistance against commercial antibiotics. In this work, the synergism between commercial antibiotics and antimicrobial peptides against antibiotic resistant microorganism was explored. Two different *P. aeruginosa*, strains DFU3 and DFU12, and one *S. aureus* strain DFU13, were isolated and identified from patients with type 2 diabetes having DFU. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of various commercial antibiotics and four antimicrobial peptides on Muller-Hilton Agar (MHA) was performed according to the CLSI (2008) specifications. *P. aeruginosa* DFU3 and DFU12 were multi-resistant to the commercial antibiotics trimetroprim-sulfamethoxazole, ceftriaxone, gentamicin, vancomycin, cephalotine, cephotaxima, chloramphenicol and ampicillin. Likewise, *S. aureus* DFU13 was classified as resistant to 16 different commercial antibiotics. Interestingly, the antimicrobial peptides, L-Pin2 and D-Pin2 inhibited the growth of *P. aeruginosa* DFU3 and DFU12 at 25 μM and at 100 μM, respectively. The other two antimicrobial peptides named Pin2 [17aa] and Css54 did not show any effect towards any of those bacteria. In addition, ceftriaxone combined with L- or D-Pin2 showed a synergistic effect against *S. aureus* DFU13 which is very important since this strain behaves as a *Methicillin-resistan* (MR). Similarly, vancomycin combined with L- or D-Pin2 was effective towards both *Pseudomona* strains DFU3 and DFU12. Synergistic effects among commercial antibiotics and antimicrobial peptides may help to improve the antibiotic capacity towards multi-resistant bacteria present in DFU patients.

Keywords: Antibiotic susceptibility test, MIC, Synergistic effect.

BCG VACCINATION SCHEME-CONTAINING PRIME AND PERIODIC SUBUNIT BOOST SELECTS AND ACTIVATES TEM AND Th17CD4+ SUBSETS IN NATURALLY PREINFECTED DAIRY CATTLE

(La vacunación con BCG al nacimiento y refuerzos subunitarios anuales seleccionan y activan subpoblaciones Tem y Th17CD4+ en ganado lechero)

Elsa Leticia Ramírez Cerda[*a], David Ulises Miranda Hernández [b], Ciro Estrada Chávez[b+]

[a]Unidad de Servicios Analíticos, CIATEJ AC.
[b] CRO Hatolibre en tiempo real SAPI de CV.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: c.estrada@hatolibre.com

Área del Conocimiento: Biotecnología Farmacéutica.

ABSTRACT
Mycobacterium bovis (*M.bovis*) is the causative agent of bovine tuberculosis (bTB), an important public health hazard and zoonotic disease that causes significant financial loss. The control of bTB is based on test and slaughter of reactor cattle. However, in developing countries with high prevalence, this policy is a non-viable option due the high cost that it represents. Therefore, diagnostic improvements and a vaccination strategy are essential for bTB control. Currently it is unknown whether a booster vaccination scheme confers protection against bTB in exposed cattle under real life settings in enzootic areas. In this work was evaluated the level of protection and immunologic profile of cattle which were immunized with a primary vaccination with *M. bovis* BCG and a protein subunit vaccine as well as annual periodic boosters. To quantify the level of protection, immunological, pathological and bacteriological parameters were determined through the time in cattle from dairy farms with high bTB prevalence (20.14 ± 2.32%). Protective efficacy, evaluated at slaughter when animals were 64-67 months of age, indicated that *M. bovis* was cultured from the tissues of 38.5% (25/65)unvaccinated; in contrast, 20% (13/65) of the vaccinated animals were culture positive ($p< 0.05$). In a second stage, we took a representative sample of unvaccinated (n=25) and vaccinated cattle (n=25) of these herds and were assessed the immunological profile in cattle vaccinated at birth. These data indicate that booster-BCG vaccination scheme could play a role in the control of bTB in the field and all together results suggest the induction of a memory specific immune response based in the selection and activation of effector memory $CD4^{+}CD44^{+}CD45RO^{+}CD197^{low}$ cell and Th17 subsets. The vaccination strategy promotes the proliferation of interferon gamma producing memory cells in bovines.

Keywords: BCG vaccination; subunit boosters; bovine tuberculosis; immunological profile.

RESUMEN
Mycobacterium bovis (*M.bovis*) es el agente causante de la tuberculosis bovina (bTB), una enfermedad zoonotica que constituye un problema de salud pública y causa importantes pérdidas económicas a los productores. El control de la bTB está basado en la prueba y sacrificio de los animales reactores. Sin embargo en los países en desarrollo con alta prevalencia, esta política no es una opción viable debido al alto costo que representaría. Por lo tanto mejorar el diagnóstico y disponer de una estrategia de vacunación es esencial para el control de la enfermedad. Actualmente se desconoce si los esquemas de

vacunación con refuerzos, confieren protección contra la bTB en ganado expuesto a condiciones reales de vida en áreas de zoonosis. Este trabajo evaluó el nivel de protección y el perfil inmunológico de ganado inmunizado con dosis simple de vacuna *M.bovis* BCG combinada con refuerzos anuales de vacuna subunitaria de proteínas. Para cuantificar el nivel de protección, se midieron parámetros bacteriológicos, patológicos e inmunológicos a través del tiempo en bovinos lecheros con alta prevalencia (20.14 ± 2.32%). La eficacia protectora fue estimada al sacrificio en animales de 64-67 meses de edad, donde *M. bovis* fue cultivado en el 63% de animales no vacunados, en contraste el 20% (13/65) de los vacunados fueron cultivo positivo ($p< 0.05$). En una segunda etapa se tomó una muestra representativa de ganado vacunado al nacimiento (n=25) y no vacunado (n=25) para medir el perfil inmunológico, observando la inducción de una respuesta inmune de memoria específica, basada en la selección y activación de células de memoria efectora $CD4^{+}CD44^{+}CD45RO^{+}CD197^{low}$ y células cooperadoras tipo 17, así como la proliferación de células de memoria productoras de interferón gamma en bovinos. En su conjunto los resultados sugieren que el esquema de vacunación podría jugar un papel en el control de la bTB en campo.

Palabras Clave: vacunación BCG; refuerzo subunitario; tuberculosis bovina; perfil inmunológico.

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis bovina (TBb) es una enfermedad infecciosa crónica causada por el bacilo *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), la cual tiene un impacto importante en el ganado vacuno, animales domésticos y en algunas poblaciones de animales salvajes [1]. La transmisión de la TBb al hombre representa un problema de salud pública ya que el humano es susceptible a la infección con *M. bovis* por lo que se le considera una zoonosis [2]. Se han definido cuatro eventos en la patogénesis de la tuberculosis: I) la infección con el bacilo, II) el reclutamiento de células inflamatorias, III) el control de la proliferación bacteriana y IV) la tuberculosis post primaria. La eficacia de la respuesta inmune depende de la capacidad microbicida intrínseca de los macrófagos alveolares, las características patogénicas de la cepa infectante y el microambiente inflamatorio en el sitio de la infección latente con focos granulomatosos consolidados; resultando en el control o la manifestación de la enfermedad activa con necrosis caseosa [3]. Numerosos estudios han demostrado la contribución de las células CD4+, CD8+ y Tγδ en la respuesta inmune protectora en la infección experimental de la tuberculosis, pero pocos estudios han documentado el perfil inmunológico de animales naturalmente infectados [4]. Recientemente se han descrito la participación de células T de memoria efectora (TEM) y Th17 en el control de la respuesta inmune en esquemas de vacunación con BCG, evidenciando que estas subpoblaciones celulares contribuyen al control de la infección con cepas patógenas en estudios experimentales en bovinos.

La vacunación con BCG en ganado se ha evaluado en la Unión Europea, Australia, Nueva Zelanda y en particular en el Reino Unido bajo diferentes modelos en condiciones controladas [5] y dando seguimiento a diferentes parámetros inmunológicos como la respuesta a la prueba de la tuberculina, la liberación de interferón gama (IFN-γ) *in vitro* y ensayos de proliferación de linfocitos en células estimuladas con derivado proteico purificado (PPD) bovino. Además se han considerado parámetros de eficacia de la vacunación como el desarrollo de lesiones en tejidos y linfonodos, aislamiento bacteriológico y carga bacteriana [6-9]. Fuera de la Unión Europea se han realizado evaluaciones en campo con bovinos que han sido vacunados con BCG en ausencia total de TBb y son introducidos a establos con casos positivos de tuberculosis [10]. En estos estudios se ha observado que los individuos que están pre-infectados en el momento de la vacunación, la eficacia de la vacunación puede ser

reducida por la presencia de micobacterias ambientales en comparación con individuos pre-expuestos; que la vacunación al nacimiento ofrece mayor protección que cuando se vacunan animales mayores; que la duración de la inmunidad conferida por BCG es de por lo menos 12 meses y que el refuerzo con vacunas subunitarias puede mejorar la respuesta inmune conferida por de BCG. Con la finalidad de validar una estrategia de inmunización en campo que contribuya a disminuir la prevalencia de TBb en establos lecheros, el presente trabajo propone la vacunación con BCG y refuerzos subunitarios así como la aplicación de técnicas de diagnósticos que permitan establecer los diferentes patrones de respuesta en ganado vacuno expuesto en condiciones naturales a la infección, relacionándolos con la respuesta inmune.

METODOLOGÍA

El estudio se llevó a cabo en un área endémica de tuberculosis bovina ubicado en una zona lechera de la región de los altos de Jalisco México, con prevalencia promedio en una población de 3000 bovinos de 20.14 EEM ± 2.32 %. El seguimiento epidemiológico del esquema de vacunación se evaluó en 4 establos comerciales con ganado de la raza Holstein-Friesian, así como un rancho control ubicado en la misma área. La prueba de tuberculina caudal simple (TST) se aplicó en todos los ranchos inoculando vía intradérmica en el pliegue caudal 0.1 mL de derivado proteico purificado (PPD-B) (1 mg/mL; PRONABIVE®) según la norma NOM-031-ZOO-1995 vigente. Los resultados del TST antes de vacunar confirmados mediante 2 pruebas consecutivas con un intervalo de 4 meses fueron utilizados para establecer 2 cohortes: TST+ (reactores) y TST-. A los bovinos negativos se les aplicó la vacuna BCG y la vacuna subunitaria y a los positivos sólo la vacuna subunitaria. Y a partir de ese momento, a todos los bovinos recién nacidos se vacunaron con el esquema completo dentro de los primeros 8 días después de nacimiento, el cual consistió en la aplicación vía subcutánea de 1 mL de BCG (Pronabive^{R}) a una concentración de 10^{6} UFC/mL, en el tercio medio del cuello en el lado izquierdo. Además se aplicó vía subcutánea 1 mL de la vacuna subunitaria (EPP Pronabive^{R}) a una concentración de 400 µg, en el tercio medio del cuello en el lado derecho. Los refuerzos periódicos se realizaron con la vacuna subunitaria, utilizando la misma dosis, vía y lugar de aplicación después de la primovacunación a los 2 meses (60 días de vida), posteriormente a los 12 (433 días de vida) y 24 meses (798 días de vida). Para medir los niveles de IFN-γ se utilizó el Kit Bovigam™ de marca Prionics siguiendo las indicaciones del fabricante. La concentración final de IFN-γ, expresada en pg/mL, se calculó mediante una curva elaborada con interferón recombinante bovino (Serotec, UK).La inspección post mortem se realizó en los animales enviados al rastro por decisión de los dueños y causas ajenas al proyecto o de manera rutinaria. Las muestras para histopatología y bacteriología, se colectaron independientemente de la presencia o no de lesiones. Se realizó una valoración macroscópica de lesiones en nódulos linfáticos (NL) de cabeza y tórax, retromamarios, de hígado y pulmón, clasificándolas de acuerdo a un score patológico adaptado [5]. La eficacia de la vacunación se midió con la estimación del riesgo relativo (RR) [7], utilizando 2 parámetros de la enfermedad: animales con lesiones sugestivas de TBb y aislamiento de *M. bovis* en tejidos.

Así mismo se tomó una muestra representativa de esta población para determinar el perfil inmunológico en 50 hembras Holstein- Friesian de entre 24 a 36 meses de edad, las cuales se dividieron en dos grupos de 25 bovinos cada uno, con un promedio en días de vida de 969 ±129.5 para los bovinos no vacunados y de 1125 ±25.58 para bovinos vacunados. Se analizó por citometría de flujo la expresión de marcadores de superficie específicos para las diferentes subpoblaciones de Lϕ, utilizando anticuerpos específicos para moléculas de superficie: Th1: CD3, CD4, CD25 y CD183 (CXCR3); Th17: CD4, CD25, CD161 y CD197 (CCR7); TEM: CD4, CD44, CD183 y CD45RO y Treg: CD3, CD4, CD25, FoxP3. Realizando tinciones de superficie e intracelulares. Se evaluó el nivel de expresión de factores de

transcripción fosforilados utilizando un kit Array Protein/DNA (Affymetrix®), utilizando 10 µg del extracto de proteína nuclear de PBMC's de bovinos estimulados 8 horas con PPD bovino (Prionics®) (10µg/mL). Para determinar la concentración de citosinas IL-10, IL-12, IL-17, IL-27, IFN-γ, TNF-α en sobrenadante de cultivo de PBMC´s, se utilizaron pruebas comerciales con las recomendaciones de cada fabricante. La evaluación de las células de memoria antígeno-específicas se realizó con la técnica de ELISpot utilizando el kit comercial ELISpotPLUS para IFN-γ bovino (MABTECHTM).

RESULTADOS

La evaluación general de la respuesta inmunológica al esquema de vacunación utilizando IFN-γ como marcador se realizó en cuatro ranchos con una prevalencia de TBb a la prueba de tuberculina entre 14.7 y 38.7% sin diferencias significativas entre establos ($p<0.05$). La frecuencia de nuevos reactores a la TST incrementó en relación a la aplicación del esquema de vacunación dentro de cada rancho y con el tiempo. Se ha reportado la reactividad a la prueba como consecuencia de la aplicación del esquema de vacunación y no por la presencia de bovinos enfermos [7]. Un comportamiento similar se observa con los niveles sistémicos de INF-γ donde se incrementa su concentración en los bovinos vacunados después de la inmunización masiva y tiende a reducirse gradualmente en función del tiempo, pero sin alcanzar el nivel de las fases iniciales de la evaluación. Sin embargo cuando se administraron los refuerzos, las concentraciones de interferón incrementaron inmediatamente. A nivel sistémico el ganado vacunado produjo 10 veces más IFN-γ en comparación del ganado sin vacunar. En los animales vacunados la concentración de IFN-γ entre los diferentes antígenos no tuvo diferencias ($p>0.05$), pero el IFN-γ liberado en respuesta a ESAT-6/CFP10 y a la vacuna subunitaria fue menor comparado con la respuesta del PPD-B ($p>0.05$)

La eficacia protectora de la vacunación contra TBb fue evaluada por el diagnóstico post-mortem y el cultivo de *M. bovis* de nódulos linfáticos y de pulmón. La evaluación de los parámetros de patología mostró una reducción de lesiones en los bovinos vacunados durante el estudio y a través del tiempo ($p< 0.0402$) ($R^2=0.9161$). Finalmente, la evaluación del aislamiento bacteriológico mostró que en bovinos vacunados hubo una disminución del número de casos positivos ($p= 0.0182$) con una correlación negativa en relación al tiempo de vacunación y el número de refuerzos aplicados ($R^2=0.8804$ (Fig. 1)). En base a este parámetro la eficacia del esquema de inmunización en animales no vacunados al nacimiento fue del 47% ($p=0.03$).

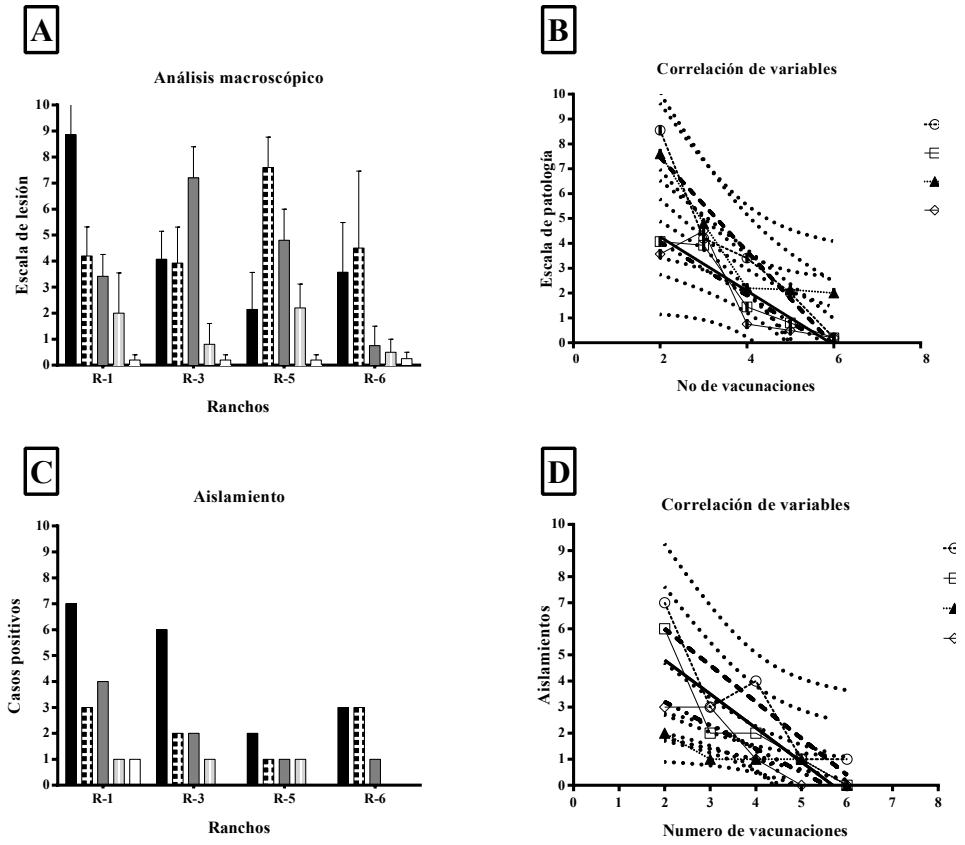


Figura 1. Correlación del número de vacunaciones contra la escala patológica y aislamiento microbiológico. A. La escala de patología se redujo gradualmente al paso del tiempo hasta alcanzar calificaciones mínimas. B. Correlación simple entre la escala patológica y el número de vacunaciones en el periodo de investigación R^2= 0.8417 (p> 0.05). C. El número de aislamientos positivos se redujo con el paso del tiempo; con ausencia del microorganismo en las etapas finales de la investigación en algunos ranchos. D. Correlación entre número de casos positivos por año, contra número de refuerzos aplicados R^2= 0.8208 (p>0.05).

La fenotipificación de las subpoblaciones de linfocitos en bovinos vacunados y no vacunados, no presentó diferencias significativas (p> 0.05) para la subpoblación Th1 (Fig. 2A), las células cooperadoras tipo 17 (Th17) y las de memoria efectora TEM fueron mayores en bovinos vacunados, a diferencia de la subpoblación de células T reguladoras que se observaron principalmente en bovinos no vacunados. Con el objetivo de evaluar el nivel de activación de factores de transcripción en células T CD4+ (FTs) de las subpoblaciones de linfocitos, se estimó la concentración de las proteínas fosforiladas en los extractos nucleares de PBMC´s en bovinos vacunados y no vacunados (Fig. 2B). La funcionalidad de la subpoblación Th1 se evaluó con el nivel de expresión de los FTs Tbet, STAT-1 y STAT-4. Los tres factores se encontraron en mayor proporción en bovinos vacunados (p< 0.05). La activación de la subpoblación Th17 se evaluó en base a los factores de transcripción STAT-3 y RORγt encontrando a este último en mayor proporción en bovinos no vacunados (p< 0.05) mientras que STAT-3 se encontró a la alza en bovinos vacunados (p= 0.05). El IFN-γ y el TNF−α consideradas citocinas del perfil Th1 no mostraron

diferencias entre bovinos no vacunados y vacunados (p> 0.05), asimismo las concentraciones de IL-10 y de IL-17 fueron similares entre los dos grupos de estudio (Fig. 2C). Para determinar la presencia de células de memoria antígeno-específicas productoras de IFN-γ se analizaron muestras de bovinos vacunados y no vacunados por citometría (Fig. 2D). En el ensayo de un día en presencia del antígeno, hubo mayor proporción de células productoras de IFN-γ en bovinos no vacunados, lo que se invierte a los 12 días de cultivo.

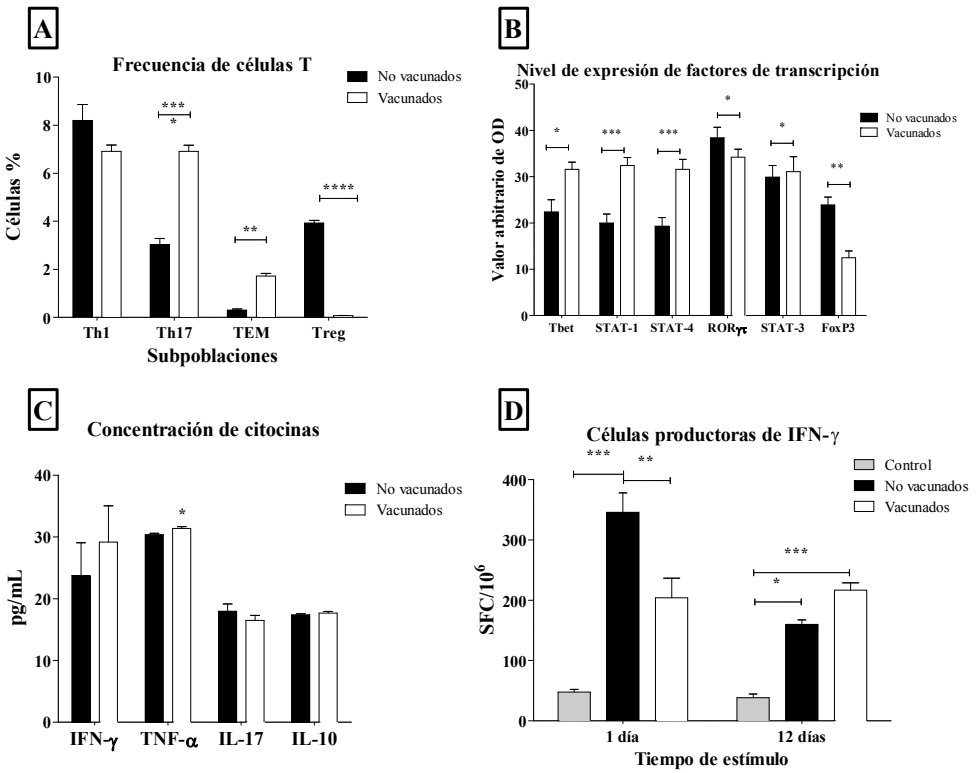


Figura 2. Perfil inmunológico de bovinos vacunados al nacimiento. **A)** número de células de las subpoblaciones de linfocitos T en bovinos vacunados y no vacunados. Conteo de subpoblaciones de células T CD4+: Th1, Th17, TEM y Treg por citometría de flujo en PBMC's de bovinos estimuladas por 24 h con PPD-B en cultivo a 37°C y 5% de CO_2. Determinado por análisis de varianza de dos vías con comparaciones múltiples entre medias de Sidak. **B)** nivel de expresión de factores de transcripción en PBMC's de bovinos (n=20). Se analizó el nivel de expresión de factores de transcripción característicos de las subpoblaciones de células T CD4+: Th1 (Tbet, STAT-1 y STAT-4); Th17 (RORγt y STAT-3); Treg (FoxP3). Estimado por valor arbitrario de densidad óptica (OD) con el software QuantityOne®-BIO-RADTM. Determinado por análisis de varianza de dos vías con comparaciones múltiples de Sidak. **C)** concentración de citocinas en sobrenadante de PBMC´s de bovinos. La medición de las citocinas se realizó por ELISA (n = 50). Determinado por Mann-Whitney test. p= 0.05**. D)** células de memoria antígeno-específicas productoras de IFN-γ en bovinos no vacunados y vacunados. Evaluación en PBMC's incubados 1 y 12 días con y sin PPD-B. (n=12). Determinado por ANOVA de dos vías con comparaciones múltiples de Sidak. Significancia * p< 0.05, ** p< 0.01, *** p< 0.001, **** p< 0.0001.

DISCUSIÓN

La TBb continua siendo un problema económico y de salud pública, las medidas para su control basadas en la política de prueba y sacrificio siguen siendo insuficientes, caras e imprácticas en los países donde esta enfermedad aún no ha sido erradicada. Numerosos experimentos han demostrado que la vacunación con BCG en neonatos puede ser una estrategia valiosa para su control [12]. El uso de la vacuna BCG confiere protección de forma variable contra la TBb de un rango de cero a 80% [5], pero en la actualidad no existe una vacuna que confiera una protección eficaz y duradera contra la infección por *M. bovis* en bovinos ni en humanos [13]. De manera óptima se considera que una estrategia de vacunación efectiva debe promover la proliferación de células de memoria que producen IFN-γ, citocina que activa a los macrófagos para el control de *M. tuberculosis* pero al mismo tiempo evitar el agotamiento de las células efectoras y daño al tejido [14].

El mecanismo inmunológico más reconocido contra la tuberculosis es la liberación de IFN-γ por parte de células de la estirpe linfocitaria que activa la función fagocítica de células presentadoras de antígeno (CPA's), particularmente de los macrófagos infectados [15]. En este trabajo se observó que en los bovinos vacunados las concentraciones de IFN-γ en sangre fueron 10 veces mayores que en los bovinos no vacunados.

CONCLUSIONES

El esquema de vacunación implementado indujo una producción superior de IFN-γ y una mayor frecuencia de células IFN-γ+ en bovinos vacunados a nivel sistémico, sugiriendo una mayor actividad de la respuesta inmune efectora frente al antígeno.

El esquema de vacunación indujo la activación de una respuesta específica de memoria efectora de largo plazo, basada en la selección y activación de Lϕ Th17 y TEM.

La aplicación de refuerzos periódicos dentro de un esquema de vacunación donde se utiliza BCG podría ser útil para activar y mantener a las células T_{EM}

La respuesta inmune celular inducida está controlada y sin incrementos aparentes en las concentraciones de las citocinas IFN-γ, IL-17 e IL-10, lo que sugiere que el esquema de vacunación es inocuo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer a José Alfredo Gutiérrez Reyes y Luis Bojórquez Narváez por su colaboración para el desarrollo del trabajo.

REFERENCIAS

[1] Miller, R.S., Farnsworth, M.L. and Malmberg, J.L. (2013), "Diseases at the livestock-wildlife interface: status, challenges, and opportunities in the United States", Prev Vet Med, 110(2):119-132.

[2] Muller, B., et al. (2013), "Zoonotic Mycobacterium bovis-induced tuberculosis in humans", Emerg Infect Dis, 19(6):899-908.

[3] Kaufmann, S.H., Hussey, G. and Lambert, P.H. (2010), "New vaccines for tuberculosis". Lancet 375(9731): 2110-2109.

[4] Blanco, F.C., et al. (2009), "Study of the immunological profile towards Mycobacterium bovis antigens in naturally infected cattle", Microbiol Immunol, 53(8): 460-467.

[5] Vordermeier, H.M., et al. (2002), "Correlation of ESAT-6-specific gamma interferon production with pathology in cattle following Mycobacterium bovis BCG vaccination against experimental bovine tuberculosis", Infect Immun, 70(6): 3026-3032.

[6] Buddle, B.M., et al., (1995), "Immunological responses and protection against Mycobacterium bovis in calves vaccinated with a low dose of BCG", Vaccine, 13(12):1123-1130.

[7] Buddle, B.M., et al., (1999), "Differentiation between Mycobacterium bovis BCG-vaccinated and M. bovis-infected cattle by using recombinant mycobacterial antigens". Clin Diagn Lab Immunol, 6(1): 1-5.

[8] Pollock, J.M., et al. (1996), "Dynamic changes in circulating and antigen-responsive T-cell subpopulations post-Mycobacterium bovis infection in cattle", Immunology 87(2): 236-241.

[9] Welsh, M.D., et al. (2005), "Influence of pathological progression on the balance between cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis", Immunology, 114(1): 101-111.

[10] Ameni, G., et al. (2010), "Field evaluation of the efficacy of Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin against bovine tuberculosis in neonatal calves in Ethiopia". Clin Vaccine Immunol, 17(10): 1533-1538.

[11] de Lisle, G.W., et al. (2015), "The efficacy of live tuberculosis vaccines after presensitization with Mycobacterium avium". Tuberculosis, 85(1-2):73-79.

[12] Conlan, A.J., et al., (2015), "Potential benefits of cattle vaccination as a supplementary control for bovine tuberculosis". PLoS Comput Biol, 11(2): p. e1004038.

[13] Andersen, P. and Kaufmann S.H., (2014) "Novel Vaccination Strategies against Tuberculosis". Cold Spring Harb Perspect Med, 4(6).

[14] Behar, S.M., et al. (2014), "Orchestration of pulmonary T cell immunity during Mycobacterium tuberculosis infection: Immunity interruptus". Semin Immunol, 26(6):559-577.

[15] Robinson, C.M., Jung J.Y., and Nau G.J., (2012), "Interferon-gamma, tumor necrosis factor, and interleukin-18 cooperate to control growth of Mycobacterium tuberculosis in human macrophages". Cytokine, 60(1):233-41.

PHYTOCHEMICAL ANALYSIS OF NUTRITIVE MEDIUM FROM SOMATIC EMBRYOS OF *Ceratozamia hildae*, AN ENDANGERED SPECIES.

(Estudio fitoquímico del medio nutritivo de embriones somáticos de *Ceratozamia hildae*, especie en peligro de extinción)

Isabel C. Velásquez de la Cruz*[a], Josefina Herrera Santoyo[b], Enrique Roberto Llanos Romero[b], Octavio González Caballero[a], Victor Manuel Chávez Avila[a+].

[a] Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, Jardín Botánico, UNAM
[b] Laboratorio de Fitoquímica, Facultad de Ciencias, UNAM

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: victorm.chavez@ib.unam.mx

Área del Conocimiento: Biotecnología Farmacéutica.

ABSTRACT
In cycads, secondary metabolism provides protection against predators. The compounds of this metabolism are neurotoxic and carcinogenic azoxyglycosides such as cycasin, macrozamin and neocycasin plus phenolic compounds. This is known only from *in vivo* specimens from wild populations. There is only a single work that found those compounds studying callus tissue in *in vitro* conditions. We predicted that *in vitro* conditions, somatic embryos would produce the same compounds found *in vivo* conditions. Our main objective was to elucidate the presence of azoxyglycosides compounds in nutritive medium of somatic embryos of *Ceratozamia hildae* using thin layer chromatography (TLC). Somatic embryos were subcultivated in Litz medium. The medium was lyophilized and extracellular compounds were extracted by maceration with three types of solvents (hexane, ethyl acetate AcOEt and methanol MeOH). TLC of organic extracts (100µg) on silica gel were developed with 4 butanol BuOH: 1 Acetic acid AcOH: 1 H_2O. Finally a densitometry analysis was conducted. The extract yields exhibited large variations depending of dissolvent: 0.02 % (w/w) hexane, 0.44% AcOEt and 13.51%. MeOH. Only for the case of ethyl acetate extract, we obtained an Rf value of 0.366 which is closed to the reference value reported for the cycasin (0.36). Through densitometry analysis we searched for the presence of cycasin from organic extract obtained of medium. Detection under UV 370 nm. These results are the first step to indirectly measure if somatic embryos of *C. hildae* produce azoxyglycosides compounds.

Keywords: somatic embryos, azoxyglycosides compounds, nutritive medium, *Ceratozamia hildae.*

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

HUMAN ALPHA 1-ANTITRYPSIN HOMOLOGY IN HIGHER MAMMALS

(Homología de alfa 1-antitripsina en mamíferos superiores)

Tonatiuh Abimael Baltazar Díaz[a]*, Alejandro Brena Becerril[a+], Luz Adriana Vizcaíno Rodríguez[a]

[a] Universidad Politécnica de la Zona Metropolitana de Guadalajara, Academia de Ingeniería en Biotecnología

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: abrena.upzmg.ibt@gmail.com

Área del Conocimiento: Biotecnología Farmacéutica.

ABSTRACT
Alpha 1-antitrypsin (A1AT) is a 52-kDa glycoprotein produced by hepatocytes, phagocytes and epithelial liver cells, which mainly inhibits proteolytic enzyme neutrophil elastase. Maybe it is the most widespread member of the serine protease inhibitors family, a superfamily of 330 to 500 aminoacids, which have a conserved structure; they also include metazoa, plantae and archae kingdoms, and certain viruses. Natural history of this superfamily suggests that they emerged before plant-animal divergence, even before eukaryotes development. A1AT deficiency and its synthesis defects are related with COPD (chronic obstructive pulmonary disease), hepatocellular carcinoma, hepatic damage, and accumulation of defective proteins in the liver, disorders in iron homeostasis and a greater risk cirrhosis. Alleles for this protein play an essential role: while the M alleles lead to normal proteins, the S and QO alleles result in intracellular accumulation and no expression of this protein. Frequency of polymorphisms in Caucasian populations is already reported, however it has not been reported in Latin-American populations yet. In this paper, bioinformatics search, alignment and phylogeny algorithms have been used using a characterized human A1AT sequence to find homologies in different species, in order to relate on a protein tree different proteins and obtain a filial relationship that can help guide us in the natural history of this protein. This could have important implications in the comprehension of glycoproteins history in different species, as well as understanding the evolution of post-translational modifications. Also, it give us functional prediction capabilities using sequences, and the possibility of improving the production strategy of this protein by recombination.

Keywords: alpha-1 antitrypsin; protease inhibitor; molecular evolution, Bioinformatics.

RESUMEN
La alfa 1-antitripsina (A1AT) es una glicoproteína de 52-kDa producida por los hepatocitos, fagocitos y las células epiteliales del hígado, cuya función principal es inhibir la enzima proteolítica neutrófilo elastasa. Quizá es el miembro más expandido de la superfamilia de las serpinas. Esta familia también abarca los reinos *metazoa*, *plantae* y *archae*. La deficiencia de A1AT y los defectos en su síntesis están relacionados con la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), acumulación de proteínas defectuosas en el hígado y otros padecimientos. Los alelos para ésta proteína juegan un papel esencial: mientras los alelos M dan lugar a proteínas normales, los alelos S y QO resultan en acumulación intracelular e inexpresión de esta proteína. En este trabajo, los algoritmos BLASTP, PSI-BLAST y DELTA-

BLAST fueron ejecutados utilizando una secuencia caracterizada de A1AT humana (AAH15642) para encontrar homologías en diferentes especies, con el fin de relacionar en un árbol diferentes proteínas y generar relaciones filiales que pudiesen guiarnos en la historia natural de esta proteína. Presentamos homologías filoproteicas del análisis de 42 secuencias distintas reunidas de la base de datos del NCBI. Los alineamientos múltiples, y los árboles diferentes fueron construidos mediante ClustalX, BioEdit y Mega6. Los datos inferidos del árbol indican la amplitud de la familia de la A1AT. La rama conformada por secuencias de *H. sapiens*, incluye una secuencia bacteriana (*M. barkeri*), cuya función debe ser caracterizada bioquímicamente. Alineamientos subsecuentes revelaron que los sitios de glicosilación también son conservados, incluso en secuencias procariotas, no obstante son menos conservadas que aquellas pertenecientes a eucariotas. Además de la información evolutiva, este trabajo nos dará herramientas de predicción funcional utilizando secuencias, y la posibilidad de mejorar estrategias de producción de esta proteína mediante recombinación.

Palabras Clave: alfa 1-antitripsina, inhibidor de proteasa, evolución molecular, Bioinformática.

INTRODUCCIÓN

La alfa 1-antitripsina (A1AT) humana es una de las glicoproteínas inhibidoras de proteasas que se encuentran en la sangre. Consta de 394 aminoácidos, 52 kDa de peso molecular y posee tres residuos glicosilados. La relevancia biológica de esta proteína está evidenciada debido a que la deficiencia de esta o la expresión de sus variantes defectuosas están fuertemente relacionadas con la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfermedades del hígado y desórdenes inflamatorios. [7, 18] Quizá es el miembro más generalizado de la familia de los inhibidores de serpín proteasas, que son una superfamilia de proteínas de un tamaño de 330 a 500 aminoácidos y con una estructura conservada. Se encuentra en los grupos taxonómicos *metazoa*, *plantae*, *archeae* y ciertos poxvirus. [7] De las casi 70 estructuras proteicas de esta familia, todas utilizan el mismo mecanismo *suicida* de sustrato único para la inhibición de las proteasas. [15] La A1AT es liberada a la circulación sanguínea por el hígado en una concentración de 120-220 $mg \cdot dL^{-1}$; el 40% del total de la proteína está presente en el suero, mientras que el 60% restante se encuentra en el espacio extracelular. La función principal tiene lugar en los pulmones, donde protege los alveolos del daño causado por la enzima neutrófilo elastasa. También neutraliza las α-defensinas del neutrófilo, el leucotrieno B4 y la interleucina-8. Además, se sugiere que juega un papel importante en la resolución de la inflamación y en la apoptosis. [7]

El gen codificante para esta proteína consta de 7 exones de 12.2 kb en q31-31.2 del cromosoma 14. Este gen se caracteriza por su gran polimorfismo, pues mediante técnicas proteómicas de isoelectroenfoque y los avances en caracterización de proteínas, se han identificado hasta 100 polimorfismos. [4] Sin embargo, la mayoría de estos carecen de significado clínico, pues se sabe que solo 30 de estos pueden presentar repercusiones patológicas. [7] Las mutaciones puntuales son las más frecuentes y dan origen a los distintos alelos, entre ellos los deficientes (S, M_{Malton}, por ejemplo), los nulos, tales como los QO y los disfuncionales, como los F y Pittsburgh, y cuyas consecuencias son degradación y acumulación intracelular de la proteína, carencia de mRNA, inhibición defectuosa de la enzima neutrófilo elastasa y actividad inhibitoria de trombina, que deriva en diátesis hemorrágica. [16, 12] La A1AT también adopta distintas isoformas conforme a su punto isoeléctrico, que son función principal del número de ácidos siálicos cargados negativamente adheridos a los tres residuos de asparagina que posee la A1AT. [9, 11]

Las serpinas poseen una estructura terciaria muy conservada y además comparten un mecanismo inhibidor de sustrato único [15], sin embargo, la funcionalidad de cada una de ellas es distinta, pudiendo

tener funciones regulatorias que abarcan desde transportadoras de hormonas, reguladoras de la presión arterial hasta chaperonas. [14] La literatura señala la amplitud de esta familia, sin embargo, debido a la gran variedad funcional que presentan estas proteínas, es necesario analizar y relacionar cada proteína en específico con sus homólogas. Así, el análisis de secuencias completas y sus relaciones proporcionan valiosas evidencias de su posible evolución. Las interrelaciones que los árboles generados muestran ayudan a predecir cuáles secuencias tendrán una función equivalente, y en algunos casos una estructura secundaria o terciaria similar. Estas predicciones realizadas pueden ser comprobadas mediante ensayos de biología molecular o pruebas bioquímicas.

En este trabajo mostramos los resultados de análisis filoproteicos de 42 secuencias homólogas distintas de A1AT pertenecientes a eucariotas (*Homo sapiens*, *Pongo abelii* y otros primates) y a procariotas (*Amycolatopsis spp., Dictyoglomus spp.,* etc.). La evidencia generada muestra la ancestría de las distintas secuencias de A1AT humanas y sus homólogas en miembros del mismo orden, así como en especies taxonómicamente lejanas.

METODOLOGÍA

Una colección de 42 secuencias pertenecientes a primates y bacterias fue generada a partir de la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov), utilizando la secuencia de A1AT perteneciente a *Homo sapiens* (AAH15642.1). La búsqueda fue efectuada mediante BLASTP (Protein Basic Local Alignment Search Tool), PSI-BLAST (Position-Specific Iterated BLAST) y DELTA-BLAST (Domain Enhanced Lookup Time Accelerated BLAST). [1, 2, 3] Los criterios empleados para la selección de las secuencias fueron el porcentaje de identidad y el *query cover.* La utilización de estos tres algoritmos de manera conjunta permitió encontrar secuencias en especies más alejadas de la sonda y que simultáneamente mantuviesen altos porcentajes de homología. Los alineamientos múltiples se llevaron a cabo mediante ClustalX [17] y el refinamiento de los alineamientos se realizó mediante BioEdit. Se probaron los árboles generados por el método de máxima verosimilitud y mínima evolución por el programa COBALT [13]. Finalmente se eligió el árbol obtenido por el método de mínima evolución por la consistencia evolutiva que este algoritmo presenta. La búsqueda de sitios conservados en las regiones de *N*-glicosilación fueron realizadas utilizando tres secuencias peptídicas reportadas por Carrell [5] como secuencias patrón. Cada secuencia se alineó con la colección ya dada mediante ClustalX y los alineamientos resultantes fueron depurados por BioEdit.

RESULTADOS

Se obtuvo una colección de 42 secuencias homólogas que representan especies del mismo orden (*H. sapiens*, *Gorilla gorilla*, *Macaca fasicularis*, *Pongo abelii*, *Hylobates* spp.), bacterias del género *Amycolatopsis* (*A. orientallis*, *A. azurea*, etc.), bacterias extremófilas (*Dictyoglomus termophilum*, *D. turgidum*, *Calditerrivibrio nitroreducens*), una bacteria halófila (*Beggiatoa* sp. PS), cianobacteria (*Arthrospira* spp.), anoxifotobacteria (*Chlorobium limicola* DSM 245) y *Microbacterium barkeri*, bacteria perteneciente al filo *Actinobacteria*. Los resultados obtenidos mediante la búsqueda fueron verificados realizando un remuestreo inverso mediante las mismas sondas utilizadas con los algoritmos BLASTP, PSI-BLAST, y DELTA-BLAST, confirmando la consistencia de la selección.

El árbol filoproteico obtenido clasifica las secuencias en tres ramas principales, en donde el orden de los primates aparece notablemente separado de la rama formado por *Amycolatopsis* spp. y otras bacterias. Las especies *H. sapiens*, *Pan paniscus* y *Gorilla gorilla* se muestran derivadas de la misma rama, mientras que las especies *Macaca fascicularis*, *Pongo abelii* e *Hylobates* aparecen formando un clado distinto. En la esta primera rama, se observa que la distancia evolutiva entre las secuencias de A1AT es muy pequeña, sin embargo la divergencia es amplia. Esto puede deberse al gran polimorfismo que el gen de esta proteína presenta, sobre todo en *H. sapiens*. Pocas secuencias en el NCBI describen el polimorfismo secuenciado, y entre ellas aquellas correspondientes a los alelos *S* y al alelo *Pittsburgh*, alelos reportados como causantes de proteínas deficientes o disfuncionales [16]. Las serpín proteasas de otras especies del mismo orden (como *Hylobates* o *Macaca*) conforman la base de esta rama, lo cual es taxonómicamente consistente. Dentro del grupo conformado por las secuencias propias de *H. sapiens* se incluyó una de *M. barkeri*, resultado inesperado debido a la taxonomía de esta especie. Con los algoritmos de búsqueda empleados se encontraron similitudes del 99% de la secuencia de *M. barkeri* respecto a la sonda de A1AT humana, por lo que una vez comprobada la homología secuencial era correcto que el algoritmo colocase esta secuencia dentro del grupo de *H. sapiens* (ver Fig. 1).

El segundo grupo lo conforman inhibidores de serpín proteasas del género *Amycolatopsis*, que se enlazan con la rama perteneciente a las secuencias de primates. La distancia evolutiva entre las cinco secuencias de este género es muy pequeña. El tercer grupo está conformado por especies mayormente termófilas y halófilas. Esto evidencia la amplitud de la familia de las A1AT y su adaptación a través del tiempo en distintas especies, hasta llegar a proteínas glicosiladas y que muestra la evolución y la adaptación proteínica a la maquinaria celular (ver Figura 1).

También se generaron tres alineamientos múltiples tomando los glicopéptidos de A1AT cercanas a los sitios de *N*-glicosilación secuenciados por Carrell [5], esto con el fin de evaluar la conservación de los sitios de glicosilación en las 42 secuencias compiladas. El análisis reveló sitios conservados en forma de columnas parsimoniosas en la totalidad de las secuencias; sin embargo, el porcentaje de similitud difiere de acuerdo a la especie cuya proteína fue secuenciada y a la región de *N*-glicosilación correspondiente. En el primer glicopéptido secuenciado, la asparagina en la posición 15 juega un papel clave, pues es el sitio a donde se une la cadena correspondiente de carbohidratos. Cuando el alineamiento correspondiente al primer glicopéptido se lleva cabo tomando en cuenta las 42 secuencias, el porcentaje de columnas parsimoniosas llega hasta un 56%. Sin embargo, cuando este alineamiento se restringe a las secuencias de la rama más grande del árbol filoproteico (que incluye a la totalidad del orden primate y a *M. barkeri*), el consenso se eleva hasta un 96%. En este último alineamiento, la Asn 15 se conserva en un 100%. El segundo glicopéptido observó una tendencia similar, con un porcentaje de columnas parsimoniosas en la totalidad de las secuencias de hasta un 46%; este porcentaje se eleva hasta 84-100% cuando se toma en cuenta únicamente la rama más grande del árbol. El tercer glicopéptido exhibe una conservación mayor, pues el conjunto de las secuencias muestran hasta un 47% de similitud, conservando la Asn 5; cuando se toman en cuenta a las secuencias de primates y *M. barkeri*, este porcentaje es del 100%. Estas observaciones que refieren conservaciones en la Asn clave para la glicosilación son consistentes en tanto se conoce que las células procariotas son incapaces de realizar esta clase de modificaciones postraduccionales (ver Figuras 2 y 3).

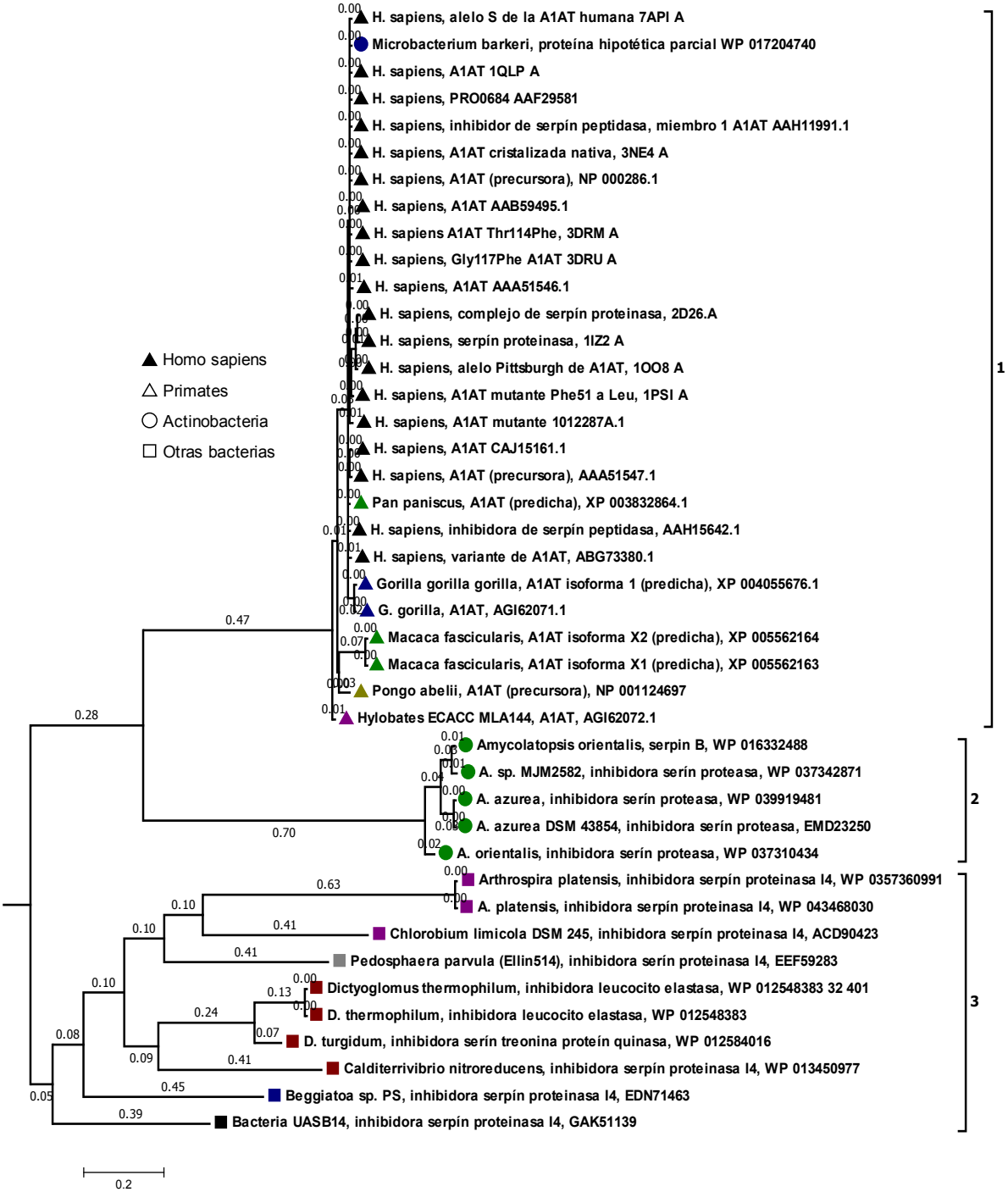

▲ Homo sapiens
△ Primates
○ Actinobacteria
☐ Otras bacterias
H. sapiens, alelo S de la A1AT humana 7API A
Microbacterium barkeri, proteína hipotética parcial WP 017204740
H. sapiens, A1AT 1QLP A
H. sapiens, PRO0684 AAF29581
H. sapiens, inhibidor de serpín peptidasa, miembro 1 A1AT AAH11991.1
H. sapiens, A1AT cristalizada nativa, 3NE4 A
H. sapiens, A1AT (precursora), NP 000286.1
H. sapiens, A1AT AAB59495.1
H. sapiens A1AT Thr114Phe, 3DRM A
H. sapiens, Gly117Phe A1AT 3DRU A
H. sapiens, A1AT AAA51546.1
H. sapiens, complejo de serpín proteinasa, 2D26.A
H. sapiens, serpín proteinasa, 1IZ2 A
H. sapiens, alelo Pittsburgh de A1AT, 1OO8 A
H. sapiens, A1AT mutante Phe51 a Leu, 1PSI A
H. sapiens, A1AT mutante 1012287A.1
H. sapiens, A1AT CAJ15161.1
H. sapiens, A1AT (precursora), AAA51547.1
Pan paniscus, A1AT (predicha), XP 003832864.1
H. sapiens, inhibidora de serpín peptidasa, AAH15642.1
H. sapiens, variante de A1AT, ABG73380.1
Gorilla gorilla gorilla, A1AT isoforma 1 (predicha), XP 004055676.1
G. gorilla, A1AT, AGI62071.1
Macaca fascicularis, A1AT isoforma X2 (predicha), XP 005562164
Macaca fascicularis, A1AT isoforma X1 (predicha), XP 005562163
Pongo abelii, A1AT (precursora), NP 001124697
Hylobates ECACC MLA144, A1AT, AGI62072.1
Amycolatopsis orientalis, serpin B, WP 016332488
A. sp. MJM2582, inhibidora serín proteasa, WP 037342871
A. azurea, inhibidora serín proteasa, WP 039919481
A. azurea DSM 43854, inhibidora serín proteasa, EMD23250
A. orientalis, inhibidora serín proteasa, WP 037310434
Arthrospira platensis, inhibidora serpín proteinasa I4, WP 0357360991
A. platensis, inhibidora serpín proteinasa I4, WP 043468030
Chlorobium limicola DSM 245, inhibidora serpín proteinasa I4, ACD90423
Pedosphaera parvula (Ellin514), inhibidora serín proteinasa I4, EEF59283
Dictyoglomus thermophilum, inhibidora leucocito elastasa, WP 012548383 32 401
D. thermophilum, inhibidora leucocito elastasa, WP 012548383
D. turgidum, inhibidora serín treonina proteín quinasa, WP 012584016
Calditerrivibrio nitroreducens, inhibidora serpín proteinasa I4, WP 013450977
Beggiatoa sp. PS, inhibidora serpín proteinasa I4, EDN71463
Bacteria UASB14, inhibidora serpín proteinasa I4, GAK51139
1
2
3
0.2

Figura 1.- Árbol filoproteico obtenido por el método de mínima evolución. Se observan las tres grandes divisiones en las que el árbol clasifica las secuencias. Los números en la base de cada rama indican la longitud de estas.

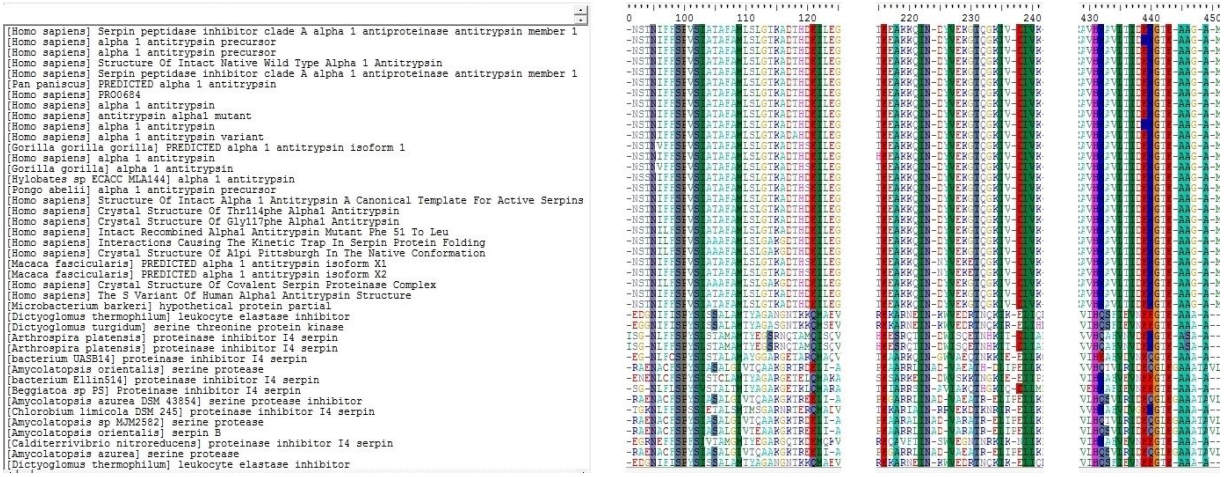


Figura 2.- Fragmentos del alineamiento múltiple extraídos de la colección de 42 secuencias. Las columnas de colores indican coincidencias del 100%, indicando que existen columnas conservadas en las secuencias que estas cubren.

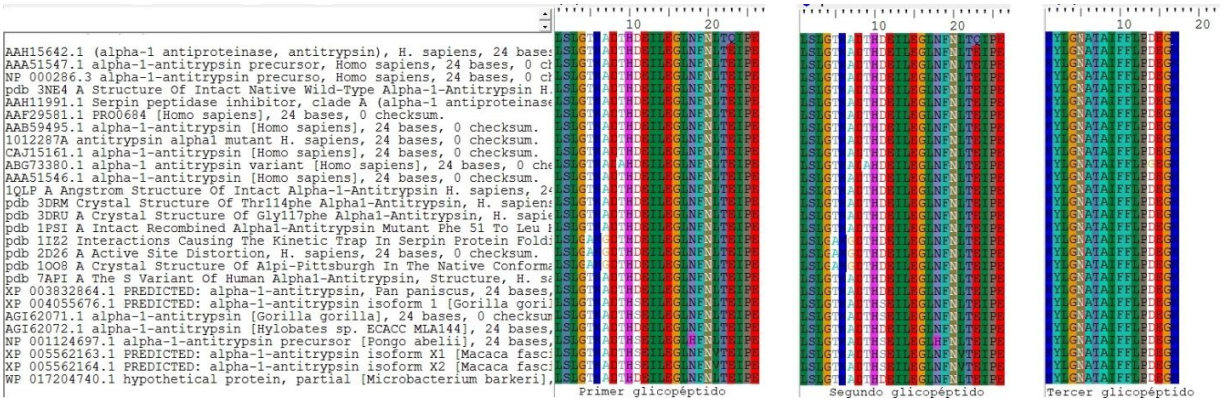


Figura 3.-Alineamientos múltiples realizados en eucariotas (se agregó la secuencia de *M. barkeri*) con las tres secuencias glicopeptídicas correspondientes a A1AT. Se observa que la asparagina necesaria para la *N*-glicosilación en cada sitio se conserva un 100% en las 28 secuencias.

DISCUSIÓN

La primera rama del árbol muestra una muy pequeña distancia evolutiva entre las distintas secuencias, se cree que es debido al gran polimorfismo que el gen de la A1AT posee, que son mayores al 1%, pero no sobrepasan el 5% en estas secuencias homólogas, por lo que observamos que las mutaciones puntuales no parecen ser relevantes en el dendrograma evolutivo. Prueba de ello es que dos de las secuencias pertenecientes a *H. sapiens* identificadas como productos de los alelos S y Pittsburgh se ubican a una mínima distancia del resto de secuencias. La ubicación de las proteínas de otros primates, como las pertenecientes a *Hylobates* o *Pongo abelii* en la base de la rama principal confirma la

coherencia taxonómica del árbol. Quizá uno de los hallazgos más relevantes sea la homología secuencial encontrada con *M. barkeri*, que se ubica dentro de esta misma rama de primates. Esta bacteria ha sido asociada con la colonización vegetal y tiene una gran importancia en el control biológico. [8] Además, Echanove *et al.* [6] reportaron seis casos de bacteriemia en los cuales fueron identificadas especies de *Microbacterium*. El reporte manifiesta la carencia de datos de transmisibilidad respecto a este brote, pero asocia la mortalidad por esta infección en poblaciones inmunocomprometidas. El antecedente de que especies no identificadas de *Microbacterium* tengan capacidad infecciosa plantea la posibilidad de que *M. barkeri* haya adquirido por transferencia horizontal el gen codificante de A1AT. Estos antecedentes vuelven necesaria la caracterización bioquímica de esta proteína a fin de comprobar su presunta función. No obstante la similitud entre secuencias, este resultado debe tomarse con precaución, pues la secuencia se presenta como hipotética y aún no ha sido completamente caracterizada.

La segunda rama del árbol, perteneciente a serpinas del género *Amycolatopsis* consta de inhibidoras de serpín proteasas. Este grupo fue agregado principalmente para incrementar la distancia evolutiva y favorecer el enraizamiento del árbol, sin embargo se registran numerosas secuencias atribuidas a una gran cantidad de serpinas, no todas homólogas a la sonda utilizada de A1AT. En la rama más alejada del grupo de los primates se hallan serpinas provenientes de bacterias mayormente extremófilas y halófilas. Es muy probable que la semejanza funcional de estas proteínas sea muy baja en relación a las A1AT humanas, sin embargo, la conservación de la estructura primaria y secundaria, así como el mecanismo de inhibición pone en evidencia la antigüedad de este grupo de proteínas.

El alineamiento de los sitios de *N*-glicosilación mostró que la asparagina necesaria es conservada en un 100% en las secuencias de primates, hecho observado en los alineamientos con los tres glicopéptidos. Los aminoácidos adyacentes al sitio exacto de glicosilación también muestran una elevada conservación, sobre todo el tercer glicopéptido. No obstante, la conservación de esta asparagina no es observada en el resto de secuencias que incluyen a organismos procariotas, donde a pesar de ello se observa una elevada conservación de otros aminoácidos en las zonas adyacentes al sitio de glicosilación. Existen algunos trabajos cuyos objetivo específico fue abordar la glicosilación en A1AT, como el de Carrell [5], que ha ubicado los sitios concretos de glicosilación; o como los de Kolarich, Mills y Vaughan [9, 11, 18] que han investigado sobre la naturaleza del patrón de glicosilación mediante técnicas proteómicas e instrumentales; en este trabajo ha sido comprobado mediante técnicas *in silico* que estos sitios son sumamente conservados en secuencias de A1AT evolutivamente cercanas a las de *H. sapiens*.

CONCLUSIONES

El árbol filoproteico obtenido confirma la amplitud de la familia de las serpinas y su presencia en al menos dos reinos, como anteriormente lo han señalado Law, Potempa y Silverman. [10, 14, 15]. El análisis revela fuertes homologías con la secuencia perteneciente a *M. barkeri*, junto a motivos conservados coincidentes con los sitios de *N*-glicosilación, que vuelve necesaria la caracterización bioquímica de ésta y una revisión bibliográfica profunda a fin de comprobar su presunta función y poder sugerir con mayores fundamentos algún mecanismo de posible transferencia genética. En el presente trabajo proporcionamos evidencias adicionales a la interrelación proteica entre distintas especies:

primero, la A1AT presenta grandes homologías con aquellas pertenecientes a primates y en menor medida con otras especies. La segunda, que la subfamilia de la A1AT ha evolucionado como una rama independiente a partir de otros miembros de las serpinas presentes en bacterias de distintos filos. Los ejes futuros son, por tanto, el análisis *in silico* del polimorfismo genético de esta proteína así como sus relaciones evolutivas no solo en organismos eucariotas. Se abre la interrogante sobre las relaciones evolutivas y funcionales entre las distintas isoformas de la A1AT y otros miembros de las serpinas, cuya actividad está en función del patrón de glicosilación observado y que podría abarcar áreas de la glicobiología evolutiva, la proteómica, y la bioinformática dentro de la biotecnología.

REFERENCIAS

[1] Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). "Basic Local Alignment Search Tool", J. Mol. Biol.(215), 403-410.

[2] Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Research, 25(17), 3389-3402.

[3] Boratyn, G. M., Schäffer, A. A., Agarwala, R., Altschul, S. F., Lipman, D. J., & Madden, T. L. (2012). "Domain enhanced lookup time accelerated BLAST", Biology Direct, 7(12).

[4] C. Crowther, D., Belorgey, D., Miranda, E., J. Kinghorn, K., K. Sharp, L., & A. Lomas, D. (2004). "Practical genetics: alpha-1-antitrypsin deficiency and the serpinopathies", European Journal of Human Genetics, 167-172.

[5] Carrell, R. W., Jeppsson, J. O., Vaughan, L., Brennan, S. O., Owen, M. C., & Boswell, D. R. (1981). "Human alpha 1-antitrypsin: carbohydrate attachment and sequence homology", FEBS Letters, 135(2), 301-303.

[6] Echanove, J. A., Shah, S. S., Valenti, A. J., Dirrigl, S. N., Carson, L. A., Arduino, M. J., & Jarvis, W. R. (2001). "Nosocomial Outbreak of Microbacterium Species Bacteremia among Cancer Patients", The Journal of Infectious Disease, 184(6), 754-760.

[7] Falfán Valencia, R., Silva Zolezzi, I., Pérez Rubio, G., Camarena, Á., Morales Mandujano, F., Montaño, M., & Ramírez Venegas, A. (2009). "Bases genéticas y moleculares de alfa-1 antitripsina (SERPINA1) y su papel en la EPOC", Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, 22(2), 124-136.

[8] Jian, L., Zhou, Q., Ibrahim, M., Liu, H., Jin, G., Zhu, B., & Xie, G. (2012). "Genome Sequence of the Biocontrol Agent Microbacterium barkeri Strain 2011-R4", Journal of Bacteriology, 194(23), 6666-6667.

[9] Kolarich, D., Weber, A., Turecek, P. L., Schwarz, H.-P., & Altmann, F. (2006). "Comprehensive glyco-proteomic analysis of human alpha 1-antitrypsin and its charge isoforms", Proteomics, 3369–3380.

[10] Law, R. H., Zhang, Q., McGowan, S., Buckle, A. M., Silverman, G. A., Wong, W., . . . Whisstock, J. C. (2006). "An overview of the serpin superfamily", Genome Biology, 7(216).

[11] Mills., P. B., Mills, K., Johnson, A. W., Clayton, P. T., & Winchester, B. G. (2001). "Analysis by matrix assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry of the post-translational modifications of α1-antitrypsin isoforms separated by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis", Proteomics, 1, 778-786.

[12] Owen, M. C., Brennan, S. O., Lewis, J. H., & Carrell, R. W. (1983). "Mutation of antitrypsin to antithrombin. Alpha 1-antitrypsin Pittsburgh (358 Met leads to Arg), a fatal bleeding disorder", The New England Journal of Medicine, 309(12), 694-698.

[13] Papadopoulos, J. S., & Agarwala, R. (2007). "COBALT: constraint-based alignment tool for multiple protein sequences", Bioinformatics, 23(9), 1073-1079.

[14] Potempa, J., Korzus, E., & Travis, J. (1994). "The Serpin Superfamily of Proteinase Inhibitors: Structure, Function and Regulation", The Journal of Biological Chemistry, 269(23), 15957-15960.

[15] Silverman, G. A., Bird, P. I., Carrell, R. W., Church, F. C., Coughlin, P. B., Gettings , P. G., . . . Whisstock, J. C. (2001). "The Serpins Are an Expanding Superfamily of Structurally Similar but Functionally Diverse Proteins", The Journal of Biological Chemistry, 276(36), 33293-33296.

[16] Stoller, J. K., & Aboussouan, L. S. (2005). "Alpha1-antitrypsin deficiency", The Lancet(365), 2225-2236.

[17] Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., & Higgins, D. G. (1997). "The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools", Nucleic Acids Research(25), 4876-4882.

[18] Vaughan, L., Lorier, M. A., & Carrell, R. W. (1982). "Alpha 1-antitrypsin microheterogeneity. Isolation and physiological significance of isoforms", Biochimica et Biophysica Acta, 701(3), 339-345.

MALDI-TOF MASS SPECTROMETRY IDENTIFICATION OF ASSOCIATED BACTERIA OF *Agave marmorata* SEEDS: AN OPPORTUNITY TO KNOW THE ECOLOGY OF MICROBIAL ENDOPHYTES IN THE *Agave* GENUS

(Identificación por espectrometría de masas MALDI-TOF de bacterias asociadas a semillas de *Agave marmorata*: una oportunidad de conocer la ecología de endófitos del género *Agave*)

Andrea Buendía-Aguirre[a*], America Martínez-Rodriguez[a], Miguel J. Beltran-Garcia[b+], Gloria Macedo-Raygoza[c], Claudia Cisneros-Reyes[d], Paolo Di Mascio[e].

[a] Biology School and [b]Chemistry Department. Universidad Autónoma de Guadalajara. Lomas del Valle Zapopan, Jalisco, Mexico.
[c]Universidad Autónoma de Baja California. Ex Ejido Coahuila, 21100 Mexicali, B.C. Mexico.
[d]Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, Ex-Hacienda San Juan Molino Carretera Estatal Tecuexcomac-Tepetitla Km 1.5, C.P. 90700, Tlaxcala, México.
[e]Biochemistry Department, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo Brazil.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: mbeltran71@hotmail.com

Área del Conocimiento: Conservación de Ecosistemas.

ABSTRACT
Agave belongs to the *Asparagales* order, within the *Agavaceae* family, with more than 200 species and 47 intra-specific categories. It's been reported that about 75% of the Agave species can be found in Mexico. Depending on the species, propagation can be achieved through seeds, vegetative stems and propagules from the inflorescence. It is currently well known that bacteria play a fundamental role in the development of plants especially as plant growth promoting bacteria (PGPB). In our laboratory, we have special interest in knowing the microbial communities that colonize agave seeds, we think these studies provide knowledge about the ecology of these plants, the dependence of plants and microbes and also as an alternative source for bio-fertilizers production. The main objective of this work consists of the analysis and identification of the cultivable endophytic bacteria isolated from seeds of Agave species such as *Agave marmorata* Roezl to compare the cultivable microbiota and their function. Our hypothesis is that endophytes that come from the seeds act as growth promoters and bio-control agents forming a symbiotic relationship in the subsequent stages. Also we are interested in knowing if there are similarities within cultivable microbiotas through the *Agave* genus. Bacterial and fungal isolates were obtained from seeds after elimination of external microbes and inoculated plates were incubated up to two weeks to recover slow-growing microorganisms. The bacterial strains were initially identified using a proteomic analysis by MALDI-TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics), with α-cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA) as the matrix. Based on the proteomic identification around 20 strains were obtained and later identified through 16s gene sequence analysis. They were found to be members of the genera *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Staphylococcus*, *Kocuria*, *Rhodococcus*, *Micrococcus* and *Stenotrophomonas*. A set of 500 seeds were also germinated using Phytagel medium to be used in future experimental assays.
Keywords: endophyte, symbiosis, agave, mass spectrometry.

OPTIMIZATION PLAN FOR THE USE OF DETERGENT IN A LACTEAL INDUSTRY

(Plan de optimización del uso de detergentes en el área de lavado de mantas de una industria láctea)

Mayra Isabel Morales Rodriguez[a], María Elena Pérez-López[a*+], María Adriana Martínez Prado[b], María Maura Margarita Teutli-León[c]

[a] Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (IPN CIIDIR) Unidad Durango
[b] INSTITUTO TECNOLÓGICO DE DURANGO
[c] BENEMERITA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE PUEBLA

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: maelena0359@gmail.com

Área del Conocimiento: Ecotoxicología.

ABSTRACT
Detergents used for its ability to form emulsions with fat-soluble materials solving all type of cleaning problems. However, its indiscriminate use has caused foaming, fat emulsion, and eutrophication in receiving water bodies, besides that most of them show low biodegradability. *Holanda* cheese factory, in the Mennonite colonies of Nuevo Ideal, Durango, has a problem in its wastewater treatment plant (WWTP) for the non-controlled use of detergents so that foam and fat affect the efficiency process. This work is focused on describing the use of cleaning agents to modify or replace them in order to minimize their effect on the WWTP and the environment in general. First, washing conditions of the different areas were evaluated; it was found that the washing of blankets was the largest contribution to the problem and the rest of the work was focused on its optimization testing nine detergents according to their washing efficiency and power to emulsify fat with a mass balance. Critical micelle concentration (CMC) was determined to the best detergent by the capillary rise method and its toxicity was evaluated using seeds of lettuce, corn and beans. Washing efficiency was achieved by the percentage removal of total solids, total fixed solids, total volatile solids and fat. Treatments and evaluation of all parameters for each repetition were run by triplicate and the differences were validated with a one-way ANOVA and Newman Keuls mean test ($\alpha = 0.05$). Best results showed 87% fat removal and was 6.45% emulsifying capacity; statistically different values with respect to the others. The concentrations used as best match agreed with the CMC and the improvements for its use are: a significant reduction of fat present in the effluent, no substances as chlorine are used that are prohibited in the food industry, and annual savings of $ 14,600 (Mexican pesos).

Keywords: Detergents, critical micelle concentration.

POTENTIAL MEDICINAL PLANTS BACKYARD OF THE TOWN OF EL PERICÓN MUNICIPALITY OF GRO TECOANAPA

(Potencial de las plantas medicinal de traspatio de la localidad de El Pericón municipio de Tecoanapa Gro.)

Alejo Javier Lungo Rodríguez*[a], Luz Patricia Ávila-Caballero[b+], Jorge Alberto Melgoza Ortega[a], Orfanel Parral Rivera[a]

[a]Profesor investigador invitado en la Licenciatura en Desarrollo Regional de la UAGro en el Pericón Gro.
[b]Profesora investigadora de la Unidad Académica de Ciencias Químico-Biológicas de la UAGro.
[a] Licenciados en Desarrollo Regional de la UAGro.
[a]Carretera Federal Tierra Colorada-Ayutla de los Libres, Km. 53; Guerrero, México.
[b] Av. Lázaro Cárdenas s/n Ciudad Universitaria Chilpancingo, Gro.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: paticaballero09@hotmail.com

Área del Conocimiento: Conservación de Ecosistemas.

ABSTRACT
Introduction: This paper studies the medicinal plants found in the backyards of Pericón, community of Tecoanapa municipality, located on the Costa Chica of Guerrero. The knowledge of plants is very helpful, they were the main resource of healers and later by doctors, this situation is still a reality today in rural communities. This resort is characterized by being accessible, less toxic and produces fewer side effects. **Objective:** To know the potential of plants backyard, in the case of study . **Hypotheses:** backyard plants are a medical resource for rural populations. **Methodology** In 9 backyards randomly selected plants were collected, identified using taxonomic keys dichotomous. **Results:** taxonomic identification recorded 23 families, 24 genera and 26 species are the predominant biological forms: tree, bush second place, third order less frequently grass bush and climbing shrub. The curative potential of some plants, the problems addressed by these , the part of the plant and its preparation are mentioned. The aceitilla (*Bidens odorata*) is used in cases of diabetes as a tincture, Grapefruit (*Citrus grandis*) for headache, leaf is harnessed and prepared, there are other 3 fruits, Papaya (Carica papaya) for digestive system problems reported eating the fruit, another 11 plants, Granadito lantana (*Lantana camera*) to hair loss was reported. Chaya (*Cnidoscolus chayamansa*) in fresh leaf For kidney inflammation and other plant the soursop (*Annona muricata*) to attend cancer, the leaves and stem cancer are used.

Keywords: Family Orchard, healing flora, botany and ecosystem.

ECOLOGICAL RETROSPECTIVE HIGH WATERSHED THE QUEBRADA GRANDE, MUNICIPIO DE SAN ANTONIO DE TEQUENDAMA CUNDINAMARCA - COLOMBIA

(Retrospectiva ecológica de la microcuenca alta de la Quebrada Grande, Municipio de San Antonio de Tequendama Cundinamarca-Colombia)

Germán Melo Quintana [a*+], Paulo Germán García Murillo[b], Juan Manuel Martínez Troya[c], Jesika Natali Valencia González[d]

[a,b] Universidad Santo Tomas, VUAD. Bogotá, Colombia. Docentes Programa Administración Ambiental y de los Recursos Naturales, Facultad de Ciencias y Tecnologías.
[c,d] Universidad Santo Tomas, VUAD. Bogotá, Colombia. Estudiante Especialización en Ordenamiento y gestión Integral en cuencas Hidrográficas. Estudiante, Programa Administración Ambiental y de los Recursos Naturales.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: germanmelo@ustadistancia.edu.co

Área del Conocimiento: Conservación de Ecosistemas

ABSTRACT
As a result of the fragmentation of the ecosystem of the upper reaches of Quebrada Grande are raging secondary succession processes tend not to recover previously existing conditions (Otálora, 2013). This study evaluated the current state of the ecosystem through the taxonomy of plants and birds, succeeded in describing the succession process caused by anthropogenic disturbances vegetation assuming that severely affects birds in intermediate conditions because there is less disturbance food supply.

A plant level proposed by the United States Department of Agriculture in paragraph visual indicators and management activities by type of disturbance protocol was used, the identification of species was performed by classifying Gentry and Judd supported herbarium National University of Colombia. Facing the bird fauna the method proposed by Ralph extensive tours and Villareal, in determining the texts used Field Guide to the Birds of Colombia was used as reference, The birds of northern South America: and identification guide - Vol. 2: Plates and Maps and Song Field Guide to the Birds of South America: The passerines. To catalog the species of birds recorded according to the degree of threat was taken into account Resolution 192 of 2014 of the Ministry of Environment, Housing and Territorial Development - MADS55, IUCN Red List of Threatened Species - Red Book Version 2014.1 and poultry according Colombia as established by the International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN). On the information obtained and bibliographic support of such ecosystems the main species of vegetation and birds of the watershed, making reference to define the ecosystem were determined. The research contributed to knowledge of this wild birds in this area, taking into account geographical spaces preserved and transformed, just as the system is assessed using fundamental ecological relationships through key species, this generated a stress reading posdisturbio round high watershed.

Keywords: Vegetation, Bird fauna, Ecological disturbance, Taxonomy.

RESUMEN

Como consecuencia de la fragmentación del ecosistema de la cuenca alta de la Quebrada Grande se han desencadenado procesos de sucesión secundaria con tendencia a no recuperar las condiciones anteriormente existentes. El presente trabajo evaluó el estado actual del ecosistema a través de la taxonomía de las especies vegetales y de aves, logrado describir el proceso sucesional ocasionado por disturbios antrópicos partiendo de que la vegetación influye severamente sobre la avifauna en condiciones de disturbio intermedio porque hay una menor oferta de alimento. A nivel vegetal se utilizó el protocolo propuesto por el departamento de agricultura de los Estados Unidos en su apartado indicadores visuales y actividades de manejo según los tipos de disturbio, la determinación de especies vegetales se realizó mediante la clasificación APG III y Christenhusz con el apoyo del herbario de la Universidad Nacional de Colombia y textos de flora. Frente a la avifauna se utilizó el método de recorridos extensivos. Frente a la determinación se utilizó como referencia los textos Field Guide to the birds of Colombia, The birds of northern south America: and identification guide - Vol. 2: Plates and Maps y Field Guide to the Song birds of South America: The Passerines. Para catalogar las especies de aves registradas de acuerdo al grado de amenaza se tuvo en cuenta la Resolución 192 de 2014 del Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible - MADS55, IUCN *Red List of Threatened Species* - Versión 2014.1 y libro rojo de aves de Colombia de acuerdo a lo establecido por la International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN). Sobre la información obtenida y el apoyo bibliográfico de ecosistemas semejantes se determinaron las principales especies de vegetación y aves representativas de la microcuenca alta especialmente, logrando definir el ecosistema de referencia. La investigación contribuyó al conocimiento de la avifauna silvestre presente en ésta área, teniendo en cuenta espacios geográficos conservados y transformados, de igual manera se evaluó el sistema a través de relaciones ecológicas fundamentales por medio de las especies clave, esto generó una lectura del estrés posdisturbio de la ronda de la microcuenca alta.

Palabras Claves: Vegetación, Avifauna, Disturbio, Taxonomía.

INTRODUCCIÓN

De acuerdo con Stiling [1] y Chapman & Reiss [2], la ecología de la restauración es definida como la ciencia que trata el estudio los organismos vivos y sus interacciones con el entorno; la ecología de la restauración toma los conceptos de la ecología básica y los provee de manera clara a los biólogos de la restauración modelos, herramientas y métodos para los diferentes casos de estudio Bradshaw [3]. En conclusión, la ecología de la restauración puede ser definida como la rama de la ecología que estudia las áreas disturbadas en proceso de restablecimiento de manera natural o asistida.

Sobre la base de las consideraciones anteriores, en ecología se define disturbio como un evento que destruye la biomasa, causa mortalidad y cambia los arreglos estructurales de poblaciones, comunidades y ecosistemas Vargas [4]. Cuando se trabaja en parches de vegetación con diferente grado de disturbio, los patrones de abundancia de las especies indican tendencias actuales de cambio, dentro de procesos complejos de sucesión-regeneración en mosaicos de vegetación. Existen patrones de baja diversidad, en los extremos de gradientes con alto y bajo disturbio, y un aumento significativo hacia los sitios de disturbio intermedio. Los índices de Shannon (H') y de Simpson (D) se comportan en estos gradientes de

manera inversa a la riqueza; esto concuerda con las predicciones de la Hipótesis del Disturbio intermedio (HDI) Conell y Slatyer [5]. Cuando los agentes causantes de mortalidad actúan con intensidades intermedias, evitan que las especies más competitivas excluyan a las demás, permitiéndoles permanecer en la comunidad. Si la intensidad del disturbio fuera baja las especies más competitivas no serían inhibidas; si fuera alta ninguna de las especies podría compensar la gran mortalidad causada por el disturbio.

En la actualidad los acelerados procesos de degradación ambiental ocasionados por la implementación de actividades agropecuarias mal planeadas, por la inadecuada utilización de los suelos y explotación de las coberturas boscosas protectoras de las cuencas y micro-cuencas del país, han provocado la pérdida paulatina de estos hábitats, importantes para especies de fauna y flora. Los bosques de montaña y alta montaña (bosques andinos) presentes en la cordillera Oriental, pueden considerarse como los ecosistemas más intervenidos en Colombia, a raíz de la alta tasa de deforestación y concentración de centros poblados en esta región, por aumentar el conflicto de oferta y demanda en la disponibilidad de recursos naturales, afectando principalmente la disponibilidad de recurso hídrico [6]. Para el municipio de San Antonio del Tequendama, el contexto no es diferente, donde los bosques presentes, se ven afectados por la deforestación, en particular las zonas altas de la micro-cuencas, ocasionado principalmente por la falta de protección de las rondas protectoras de cuerpos de agua, procesos de parcelación y contaminación, en especial por la actividad piscícola, ganadera y el uso doméstico del recurso hídrico no controlado [7], esta problemática generalizada para la mayoría de los bosques protectores de las cuencas y microcuencas del país, se asocia a la falta de planes y ordenamientos que permitan la formulación de estrategias, que puedan compensar la pérdida acelerada de hectáreas de bosque frente a la recuperabilidad de los ecosistemas intervenidos[8].

El presente estudio, se planteó como iniciativa a las estrategias de conservación futuras que puedan ser implementadas en el área de influencia directa de la microcuenca, partiendo de la primera línea base referente a las especies de aves y plantas asociadas a los hábitats que se encuentran disponibles en este paisaje. De esta manera, la vegetación al ser considerada integrante fundamental en la dinámica de los ecosistemas, como agentes generadores de energía y que dada su amplia distribución se convierten en herramienta útil para establecer el estado de conservación del entorno donde se encuentran [9]. Por lo anterior la caracterización de este grupo taxonómico contribuye al conocimiento de la microcuenca alta de la Quebrada Grande, como también aporta a la zonificación ecológica, como parte de la planificación y gestión, en el marco del proceso de Ordenamiento, en la Cuenca Grande del Municipio de San Antonio del Tequendama, Departamento de Cundinamarca y de ecosistemas semejantes con factores de disturbio intermedio.

METODOLOGÍA

Para definir el ecosistema de referencia se tuvo en cuenta la revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas físicas y Naturales, Revista Caldasia del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia y Acta Biológica Colombiana además de los sistemas de Información Geográfica y Biológica como el Sistema Nacional Ambiental (SINA) y Sistema de Información sobre Biodiversidad de Colombia (SiB). Frente a las descripciones ecológicas y listas de especies antes de la perturbación se realizaron las descripciones ecológicas por medio de inventarios de ecosistemas similares e intactos. Para evaluar el estado actual del ecosistema y taxonomía vegetal se empleó el sistema de clasificación

propuesto por Angiosperm Phylogeny Group (APG III) [10] y Christenhusz [11] además de la guía metodológica para la restauración ecológica del bosque altoandino Vargas [12]. La determinación de los individuos observados se realizó a nivel de género.

Para las evaluaciones ecológicas se utilizó el método de recorridos extensivos propuesto por Ralph [13] y Villareal [14], las observaciones se efectuaron en dos periodos de tiempo comprendidos entre las 06:00 – 10:00 y 14:00 – 17:00 al ser considerados periodos ideales para la observación de aves. La determinación de los individuos observados se realizó a nivel de especie, utilizando como referencia la Guía de las aves de Colombia Hilty & Brown [15], Field Guide to the birds of Colombia McMullan & Donegan [17], The birds of northern south america: an identification guide - Vol. 2: Plates and Maps Restal [18] y Field Guide to the Songbirds of South America: The Passerines Ridgel [19] y mapas de distribución de especies de avifauna [20]. La grabación de vocalizaciones se realizó en los mismos periodos de tiempo establecidos para los recorridos extensivos de manera simultánea. El procedimiento de grabación estuvo de acuerdo a las técnicas propuestas por Villareal [21]. El procesamiento de las grabaciones obtenidas en campo fueron editadas de forma digital, para ser comparadas con bases de datos existentes On-Line como www.xeno-canto.org y referencias de sonidos como la Guía sonora de las aves de los andes colombianos. Para realizar la actualización de la taxonomía de las especies de aves registradas para la microcuenca Quebrada Grande, se siguió la clasificación propuesta por Remsen [22]. Para establecer la selección de hábitat a cada una de las especies de aves reportadas en la micro-cuenca de la Quebrada Grande, se utilizó la clasificación de Stotz [23] y Libro rojo de aves de Colombia. Finalmente para la catalogación de las especies registradas de acuerdo al grado de amenaza se utilizó la resolución 383 de 2010 del Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial - MAVDT IUCN Red List of Threatened Species - Versión 2013.1. Se realizó el análisis de datos obtenidos utilizando el programa SAS y programas GVSIG, *Estimate S* versión 9.1.064.

RESULTADOS

En total se realizó el registro de 2983 individuos de plantas durante el estudio en un rango altitudinal comprendido entre los 1050 a 2200 metros sobre el nivel del mar (msnm). Durante el estudio se presentaron valores de precipitación de acuerdo a los registros de la estación Alicachín ubicada a 1425 msnm, en el municipio de Soacha, se tomó como referencia dicha estación meteorológica por ser la más cercana a la zona de estudio.

El análisis pluviométrico (figura 1) se basa en un registro multianual, mensual de 10 años, donde la zona de estudio se caracteriza por presentar un régimen de precipitaciones de carácter bimodal. Se observa que la zona de la microcuenca en San Antonio del Tequendama posee dos picos de altas precipitaciones primer pico en los meses de Abril y Mayo y el segundo Octubre a Noviembre. Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales de Colombia. IDEAM [24]

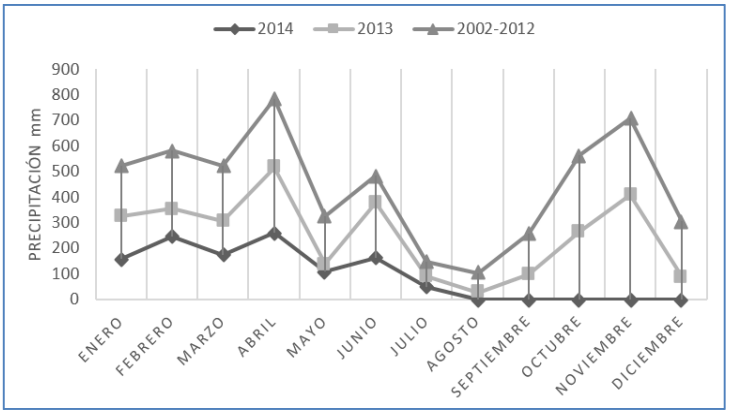


Fig. 1 Valores promedio de precipitación Mensual - Multianual (1994-2014). Estación Alicachín. Fuente: IDEAM 2014.

De acuerdo a lo mencionado anteriormente el mes de Abril de 2014 fue el que presentó mayor precipitación durante el estudio (790.9 mm) a la vez se registró el menor grado de disturbio (pastoreo), siendo el muestreo con mayor abundancia (288) organismos, Julio – Septiembre históricamente presentaron una precipitación bastante baja (141.2 mm). En general, los meses en los que se realizó este estudio presentan correspondencia con los registros mensuales multianuales (2003-2012), para la zona según el IDEAM. Se observa que el régimen pluviométrico es un factor importante para determinar el comportamiento de la vegetación y la fauna según lo corroborado por el análisis de distribución de datos el cual mostró que para el mes de Noviembre la riqueza en todos los sitios de muestreo fue la más alta siendo proporcional a las diversidades más altas registradas en este estudio, es de resaltar que para este muestreo el disturbio era ocasionado por tala e introducción de especies; para el muestreo de Agosto el comportamiento de la temperatura del suelo presentaba valores bajos 5-10 grados Celsius menos que los registrados para los muestreos siguientes, esto debido a que para los meses de Enero-Febrero se presentaron lluvias y los comienzos de Mayo que se caracterizaron por presentar una baja precipitación haciendo que la humedad relativa fuera del 75% y la temperatura del suelo de 28 grados Celsius.

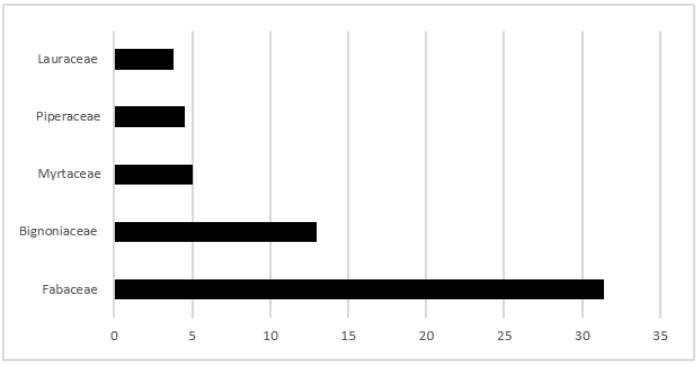


Fig. 2 Porcentaje de familias registradas durante el estudio. Microcuenca Quebrada alta San Antonio del Tequendama. Fuente: Investigación directa 2014. Fuente. Investigación directa. 2014.

En la figura 2 se observa que las familias más representativas en términos de su abundancia fueron: Fabaceae (31.4%), Bignoniaceae (13%), Myrtaceae, (5.4%), Piperaceae (4.5%) y Lauraceae (3.8%). El registro de la línea de base de la vegetación arbórea de la microcuenca alta de la Quebrada Grande con 2983 individuos vegetales se distribuyó de la siguiente manera: 765 individuos pertenecientes a Angiospermas según el sistema de clasificación APG III (74.8%), este a su vez se compone por 18 familias y 34 géneros, con respecto a gimnospermas se registró un total de 628 individuos (23.1%) conformado por 4 familias y 6 géneros y con respecto a Filicopsida se registró un total de 1590 individuos (2.15%) representado por 2 familia y 2 géneros del total de la muestra.

Frente a la avifauna en total se realizó el registro de 565 individuos de aves durante los recorridos extensivos para un esfuerzo total de 82 horas/hombre en un rango altitudinal comprendido entre los 1050 a 2200 metros de altura. Para el ensamble de aves presentes en la micro-cuenca Quebrada Grande, los estimadores de riqueza sugieren un inventario con una representatividad entre el 69.4% y el 82.6%. Figura 3.

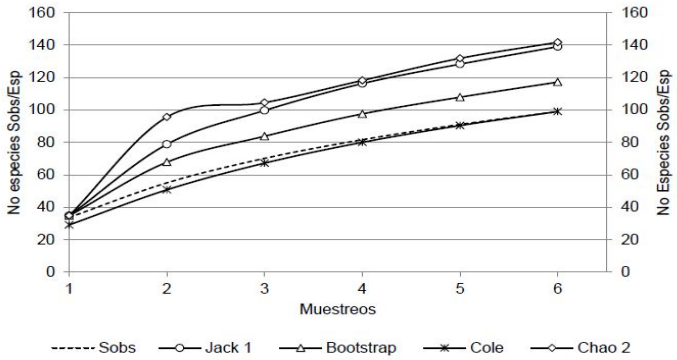


Fig. 3 Curva de acumulación de especies y estimadores de riqueza - aves de la microcuenca de la Quebrada Grande. Fuente. Investigación directa. 2014.

Se registraron 101 especies y 565 individuos en total, distribuidos en 29 familias y 12 ordenes. La familia con mayor riqueza fue Thraupidae con el 22.8%, seguida por Tyrannidae 12.9%, Trochilidae 7.9%, Parulidae 6.9%, Emberizidae 5.9%, Furnariidae 4.9% y Turdidae 4% del total de especies. Para las familias restantes se encuentran representadas por menos de tres especies (Figura 4).

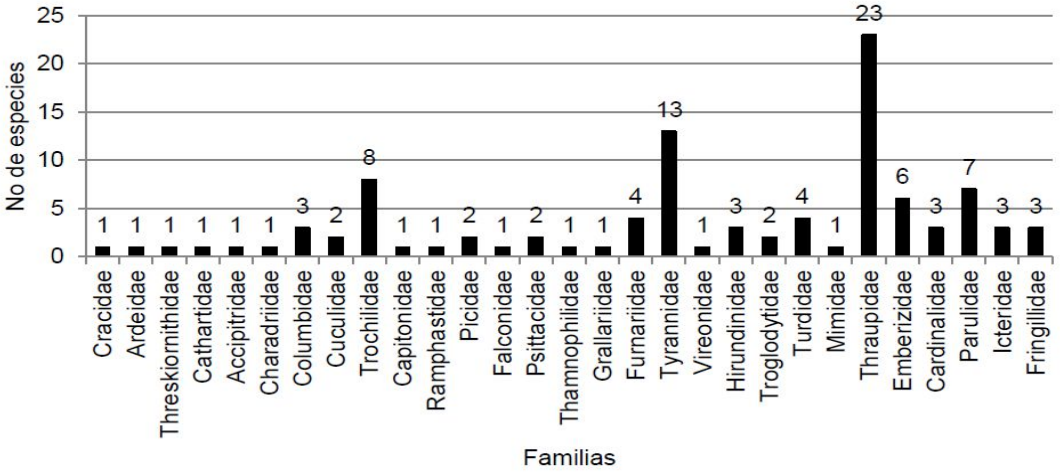


Fig. 4 Especies y familias de las aves asociadas a la microcuenca Quebrada Grande. Investigación directa. 2014.

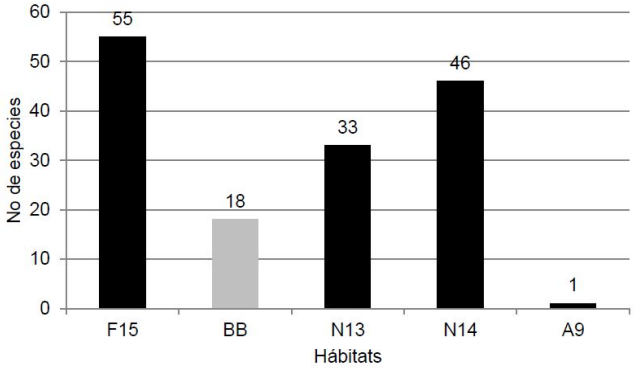


Fig. 5 Hábitats reportados para las aves de la microcuenca Quebrada Grande. Investigación directa. 2014.

Convenciones: F: Hábitats Boscosos - F15: Bosque y Selva de crecimiento secundario, BB: Borde de Bosque, N: Hábitats No Boscosos - N13: Tierras agrícolas y poteros, N14: Matorral de crecimiento secundario, A: Hábitats acuáticos - A9: Quebradas.

La selección de hábitat de las aves presentes en la Quebrada Grande según Stotz [25], se encuentran asociadas en su mayoría a bosques y selvas de crecimiento secundario (Hábitats boscosos - F) con 55 especies (se consideran 18 especies con presencia en el borde del bosque), seguida por los hábitats de Matorral de crecimiento secundario y Tierras agrícolas y poteros (Hábitats no Boscosos - N), con 46 y 33 especies, respectivamente (Figura 5). En los hábitats boscosos se registraron especies propias de estos , considerando como representativas de los mismos a *Penelope montagnii, Patagioenas fasciata, Aglaiocercus kingi, Coeligena coeligena, Coeligena torquata, Chlorostilbon gibsoni, Amazilia franciae, Eubucco bourcierii, Aulacorhynchus prasinus, Grallaria ruficapilla, Xenops rutilans, Anabacerthia striaticollis, Elaenia frantzii, Zimmerius chrysops, Mionectes olivaceus, Leptopogon rufipectus,*

Myiophobus flavicans, Pyrrhomyias cinnamomeus, Vireo leucophrys, Henicorhina leucophrys, Myadestes ralloides, Anisognathus igniventris, Pipraeidea melanonota, Tangara heinei, T. cyanicollis, T. vassorii, T. nigroviridis, T. labradorides, T. girola, T. xanthocephala, T. parzudakii, T. arthus, Arremon brunneinucha, Atlapetes albinucha, A. latinuchus, A. schistaceus, Chlorospingus flavopectus, Piranga rubra, Piranga olivácea y Myiothlypis fulvicauda.

Frente a los hábitos alimenticios se registró 13 grupos de dieta, donde las aves con hábitos Insectívoros e invertebrados pequeños (IP), está representado por la mayor riqueza *S* con el 44.4% del total de especies; para este grupo la familia Tyrannidae está representada por el mayor número de registros con 12 especies, seguida por Parulidae con siete (7) y Furnariidae con cuatro (4). Las aves que consumen Frutos como principal alimento e insectos e invertebrados pequeños como alimento secundario (F-IP), se encuentra representado por 17%; este grupo está representado en su mayoría por 14 especies de la familia Thraupidae. Los grupos restantes como Nectarívoros e insectívoros e invertebrados pequeños (N-IP) e insectívoros e invertebrados pequeños y frutos (IP-F), están representados por 11% de especies para cada uno, donde los colibríes (Trochilidae) presentan el mayor número de especies con ocho (8) para el grupo N-IP y para el grupo IP-F las familias Emberizidae y Cardinalidae, incluyen la mayor riqueza con tres (3) especies, respectivamente.

Frente a las especies de aves importantes para la conservación de acuerdo a la lista roja de la IUCN67, Resolución 0192/201468 y Libro rojo de aves de Colombia, no se establecen especies amenazadas en el área de estudio, y se considera la totalidad de los reportes como especies en Preocupación Menor (LC), que corresponden a especies que han sido evaluadas y no cumplen con ninguna categoría de amenaza, y donde se incluyen por lo general especies abundantes y de amplia distribución70. Para los Apéndices CITES71 se catalogan 12 especies en el Apéndice II, siendo la familia Trochilidae la que presenta el mayor número de reportes con ocho (8).
De acuerdo a lo establecido por Chaparro & Herrera [26], se registró la presencia de seis (6) especies endémicas para el área de estudio, siendo la familia Thraupidae en presentar el mayor número de reportes con tres (3) especies familia Trochilidae la especie *Chlorostilbon gibsoni,* familia Psittacidae la especie Forpus conspicillatus, familia Tyrannidae la especie *Leptopogon rufipectus,* familia Thraupidae las especies *Ramphocelus dimidiatus, Tangara vitriolina y Tangara labradorides.*

La privilegiada posición geográfica de Colombia en el extremo Noroccidental de Suramérica, sumada a la presencia de la cadena montañosa de los Andes y a sus costas sobre dos mares, convierten al país en el territorio con mayor flujo de aves migratorias de larga distancia [27,28]. Para el área de estudio se registró un total de 15 especies con comportamiento migrante, de carácter latitudinal, longitudinal, altitudinal, local y transfronterizo , que se caracterizan por ser movimientos en respuesta a disponibilidad de hábitat, la presencia de recursos alimenticios en áreas y lugares determinados, como también periodos reproductivos, según la biología de cada especie. En los desplazamientos latitudinales y transfronterizo se reportan nueve (9) especies migrantes boreales. Para el caso de especies con movimientos altitudinales y locales se registran seis (6) especies con este comportamiento. Pertenecen a la familia Ardeidae la especie *Bubulcus ibis,* familia Columbidae la especie *Patagioenas fasciata,* familia Trochilidae la especie *Colibri thalassinus,* familia Capitonidae especie *Eubucco bourcierii, familia* Ramphastidae especie *Aulacorhynchus prasinus, familia* Tyrannidae las especies *Mionectes olivaceus, Tyrannus melancholicus, familia* Hirundinidae la especie *Pygochelidon cyanoleuca , familia* Cardinalidae

las especies *Piranga rubra, Piranga olivácea, Pheucticus ludovicianus, familia* Parulidae las especies *Mniotilta varia, Setophaga fusca, Setophaga petechia y Setophaga striata.*

DISCUSIÓN

Los meses en los que se realizó este estudio presentan correspondencia con los registros mensuales multianuales (1994-2014), para la zona según el (IDEAM), el régimen pluviométrico es un factor determinante en el comportamiento de la vegetación según lo corroborado por el análisis de varianza el cual sugiere que para el mes de abril la riqueza en todos los sitios de muestreo es el más alto siendo proporcional a las diversidades más altas registradas en este estudio, es de resaltar que para este muestreo el disturbio era ocasionado por tala y aparición de cultivos como mora y tomate de árbol; para el muestreo de Octubre el comportamiento de la temperatura del suelo presenta valores bajos 5 - 10 grados Celsius menos que los registrados para los muestreos siguientes, esto debido a que para los meses de Enero-Marzo no se presentan lluvias y los comienzos de Mayo que se caracterizan por presentar una alta precipitación fueron históricamente muy bajos haciendo que la humedad fuera muy baja y la temperatura del suelo muy alta impidiendo la germinación de géneros como *Cecropia* que no soporta estas condiciones para su germinación, sumado a esto sobresale que para Junio de 2014 fecha en que se realizó el primer muestreo la cobertura ha descendido drásticamente haciendo que la retención de húmeda fuera mínima impidiendo la colonización de géneros como *Colocasia, Anthurium, Piper* que necesitan una humedad entre 82 y 95% para establecerse y competir haciendo que *Emilia, Heliopsis, Melinis y Desmodium* que soportan estas condiciones ejercieran estrés sobre sus competidores y no favorecen el establecimiento de especies arbóreas en un segundo estadio sucesional.

Respecto a la diversidad, el mayor valor alcanzado es de 3,07 bits en el segundo semestre del año 2014, correspondiente a abril-mayo de 2014 con una riqueza de 27 géneros donde se observa algunas zonas aclaradas por tala y control manual, así mismo la menor diversidad 2.04 bits se reporta en el primer semestre entre Mayo de 2014 y Julio donde se observa la caída de árboles por eventos naturales presentando una riqueza de 9 géneros, además se observa que la biodiversidad varia de 6.43 a 3.03; corroborándose que la riqueza y la diversidad descienden ante el incremento del disturbio. Así mismo la dominancia en estos mismos muestreos desciende de 0.94 y 0.84. Los géneros más abundantes de los primeros muestreos son *Pteridium (*15.6%) y *Cyathea* (14.0%), a diferencia del segundo semestre que muestra como luego de los diferentes eventos de disturbio provocados de manera natural y antrópica los géneros que prevalecen son *Bocconia (*1.68%), *Juglans* (1.40%), *Cytharexylum (*1.12%) y *Cecropia* (1.12%) que por su ecología establecen dominancia, esto es comprobado por el índice de Berger Parker que aumento en el último muestreo debido a la importancia proporcional de dichas géneros.

Según la escala de cobertura de Braun-Blanquet la zona de estudio presenta una vegetación continua mayor al 75% pero con la tala de los meses de Junio-Julio 2014 la cobertura bajo a 8.68% conllevando a que bajara la diversidad y riqueza y aumentara la uniformidad debido a los géneros con mayor resistencia a los disturbios como *Cecropia* que presenta características de alta producción de follaje, rápido desarrollo de tallo, hojas y flores y además establecer estrés de sombra sobre los competidores menos establecidos y las rasantes como *Bocconia* que presenta estructuras de reserva en raíces que le permiten recuperarse rápidamente ante un disturbio de corte de muchas de sus estructuras.

Se observa que el número de familias disminuyó progresivamente perdiéndose un valor aproximado de cobertura por muestreo de un 10% a 20% hasta los meses de Octubre-Noviembre a partir del mes de Septiembre fecha en que se realizó el muestreo cuarto el número de géneros bajo drásticamente de un 70% a 80% y de igual manera la cobertura descendió en la mayoría de los espacios muestreados en la microcuenca alta llegando a superar el 43%. Con respecto al uso del suelo las zonas que poseen algún cultivo o planta exótica *(Pinus patula)* se convirtió en una zona con una cobertura de 8.68% por $100m^{2,}$ con fuertes características erosivas y según Clewel [29] este tipo de características hace que se presente poca aireación en el suelo, escaso contenido de nutrientes y reducción de la flora microbiana que colabora en la descomposición de sustancias alelopáticas haciendo aún más intenso el disturbio. En cuanto a las variables, temperatura ambiental, temperatura del suelo y humedad relativa se analiza a través de una distribución de datos que si están afectando el normal comportamiento de la vegetación arbórea, debido a que los estratos arbóreo, arbustivo y herbáceo (50 a 150 cm) fueron talados ocasionando una disminución de sombra y aumento de temperatura que para algunas plantas bajas como *Pteridium* que le es imposible tolerar, es de resaltar que bajo estas condiciones de disturbio no actúa totalmente ya que es menos permeable en la cutícula y no favorece la apertura de estomas según [30].

La vegetación que resulta después de una tala intensiva, es un césped de hierbas rasantes y pastos cortos con alta cobertura y alta proporción de biomasa viva. Este cambio en la estructura y diversidad tiene consecuencias directas en el ecosistema, tales como la regulación del flujo de agua hacia regiones más bajas y el almacenamiento de nutrientes en el suelo, este caso presentado por Vargas [31], que coincide en varios puntos con que a niveles altos de disturbio, la diversidad de especies disminuye debido que varios géneros como *Swietenia* y *Guazuma* entre otros no pueden reproducirse lo suficientemente rápido como para compensar el incremento de la mortalidad causada por el disturbio.

Lo anterior indica que durante el año de estudio la microcuenca alta de San Antonio del Tequendama estuvo ligada a un disturbio antrópico y cada uno con un intervalo de 15 días a 30 días. Los géneros *Calliandra, Brunellia* e *Inga* están presentes en los cuatro muestreos debido a presentar una estrategia con una gran producción de semillas y baja latencia y las que desaparecieron como *Ficus sp*, *Ochroma sp* son remplazados por géneros con mayores características adaptativas como *Clusia sp, Erythrina sp, Casia sp* y *Myrsina sp* que poseen un periodo de crecimiento más activo y que son plantas con gran producción de semillas, crecimiento rápido y resistentes a cambios ecosistemas abruptos.

El análisis de los estimadores de riqueza, Jack1, Chao2, Bootstrap y Cole, establecen, de acuerdo a los datos de presencia ausencia de las especies de aves observadas en el recorrido de la Quebrada Grande, un inventario (muestra) representativo y no sesgado por sub-muestreo, por la proximidad (distancia) que existe entre las curvas de los estimadores de riqueza y *Sobs*82. Para el caso de la curva *Cole,* ubicada por encima de *Sobs*, evidencia que la agregación espacial tuvo poca influencia en los muestreos, aduciendo que todos las especies de aves tuvieron la misma posibilidad de ser registradas (azar).
La tendencia de estas curvas se apoya en el comportamiento del grupo de estudio (ecología), al considerarse de fácil observación e identificación, abundantes, presentes en diferentes ecosistemas y hábitats, y amplia distribución geográfica, que permite que a lo largo del recorrido de la quebrada, se obtuvieran registros todos los días de censado y hábitats visitados. Cabe anotar, que el comportamiento no asintótico de las curvas calculadas, señala la posibilidad de añadir otras especies en futuras muestras, en donde se incluya las dos temporadas de migración y temporadas climáticas diferentes (altas y bajas lluvias). La composición del ensamble de aves permitió establecer la presencia 101 especies, que de

acuerdo a su distribución geográfica y altitudinal, se consideran características de ecosistemas y hábitats de alta montaña y coincide con lo reportado para aves presentes en áreas de estudio aledañas y similares como lo reportado por y el listado de aves del parque Chicaque [32].

Para este estudio se destaca la adición de 20 nuevos reportes para la zona, con integrantes de las familias Threskiornithidae, Picidae, Falconidae, Psittacidae, Thamnophilidae, Tyrannidae, Hirundinidae, Turdidae, Thraupidae, Emberizidae, Cardinalidae, Parulidae y Fringillidae (Tabla 1).

Tabla 1 Aves de la microcuenca Quebrada Grande como nuevos reportes

FAMILIA	**ESPECIE**	**NOMBRE COMÚN**
Threskiornithidae	*Phimosus infuscatus*	Coquito
Picidae	*Colaptes punctigula*	Carpintero Pechipunteado
Falconidae	*Milvago chimachima*	Pigua
Psittacidae	*Brotogeris jugularis*	Periquito Bronceado
Thamnophilidae	*Thamnophilus doliatus*	Batará Barrado
Tyrannidae	*Mionectes olivaceus*	Atrapamoscas Oliváceo

Fuente: Investigación directa, 2014.

Para entender, la presencia de las especies en la Quebrada Grande, Ramírez-Albores [33] la composición de la avifauna está en función de los hábitos alimenticos y ligada a la estructura de la vegetación, entendiéndose como disponibilidad de nichos y oferta de alimenticia, dada por la complejidad y heterogeneidad de los diferentes ecosistemas, así como también la conservación de los hábitats presentes, y de esta manera influir en la distribución de las especies de aves, tanto en el espacio, como en el tiempo. Para las aves de la microcuenca, de acuerdo a las observaciones y registros estas se distribuyen en hábitats con mayor heterogeneidad vertical (bosques y selvas de crecimiento secundario), que se caracterizan por la presencia de especies de aves con hábitos frugívoros (45.5%) y nectarívoros (9%), teniendo en cuenta que estas aves prefieren estas zonas por una mayor disponibilidad de recursos y en algunos casos su estrecha relación con el alimento consumido, comportamiento que ha sido reportado en otros estudios como Kattan [33], donde las especies con estos dos hábitos, son considerados más sensibles a la reducción de los remanentes de bosque, por reducir la oferta de alimento.

Caso contrario es lo sucedido en las áreas de borde de bosque (transición a áreas abiertas), donde el reclutamiento de plántulas y oferta de flores y frutos, puede ver reducida por procesos herbivoría y presencia de depredadores en el borde (integrantes de las familias Accipitridae y Falconidae) Lopez-Barrera [34], la preferencia en el consumo de insectos se ve reflejado en un 66% por las aves que se encuentran en esta transición de hábitats.

Sin embargo, esta particularidad en la distribución de las especies de aves no es estricta y se pueden presentar cambios y/o intercambios constantes entre las coberturas presentes, que puede obedecer a la estacionalidad y disponibilidad del recurso alimenticio Lau-Pérez [35], que presionen movimientos de algunas especies de acuerdo a sus requerimientos fisiológicos, reproductivos, según sea el caso.

Esta observación para la microcuenca se puede ver reflejada por la cercanía y entremezcla de diferentes habitas en distintos estados de sucesión (conservación), que permitirá este flujo, siendo el matorral de crecimiento secundario (áreas semi-abiertas) uno de los hábitats que ayudaría a esta transición, entre las tierras agrícolas y potreros (áreas abiertas) y las zonas de bosque y selva de crecimiento secundario, permitiendo el movimiento de las especies de aves entre los hábitats reportados para la quebrada.

El alto grado de intervención que ha sufrido la micro-cuenca Quebrada Grande a lo largo de su recorrido desde su nacimiento en el Distrito de Manejo Peñas Blancas y el Subia, por encima de los 2600 metros hasta su desembocadura al Río Bogotá a los 1200 metros, ha modificado en casi en su totalidad las coberturas vegetales originales, y han sido reemplazadas por pastos dedicados a la ganadería y cultivos. Esta transformación paulatina del paisaje, como se observa para la microcuenca en estudio, no es diferente a lo ocurrido en otras del territorio colombiano y puede considerarse un efecto generalizado, como lo plantea Andrade [36], donde las causas de la perdida de la biodiversidad en el país para los diferentes grupos taxonómicos, están fuertemente asociadas a la pesca comercial, alteración de hábitats, caza, fragmentación de las poblaciones, actividades agrícolas, deforestación, actividades ganaderas, comercio-cacería, extracción maderera, cultivos ilícitos, contaminación, minería, destrucción de humedales, erosión, especies introducidas, animales domésticos y en muchos casos por lo acelerado de estos procesos desconocimiento de la especie aumentan más las probabilidades de amenaza.

Para el área de estudio, aunque el paisaje se encuentra modificado en su totalidad, a excepción de la parte alta de la micro-cuenca, no se reportaron especies de aves en alguna categoría de amenaza a nivel nacional durante los censos, sin embargo, esta consideración a nivel local puede verse diferente, teniendo en cuenta, el grado de deforestación e intervención de la zona, que puede llegar a causar amenazas puntuales. Un ejemplo de esto, es la distribución de la avifauna de la micro-cuenca, donde especies propias de bosque se encuentran en la cuenca alta (susceptibles a los cambios de cobertura vegetal) y aves de áreas abiertas (tolerantes a cambios de cobertura vegetal), se ubican en la cuenca media y baja, donde el grado de deforestación es mayor por la pérdida casi total del bosque y presencia de pastos y cultivos. De acuerdo a lo anterior, la parte alta de la microcuenca se puede considerar como un refugio potencial para las especies que sean menos tolerantes a los cambios de cobertura, como es el caso particular del colibrí *Coeligena prunellei*, que aunque no fue reportado en las salidas de campo, es de conocimiento que su presencia en áreas aledañas como es para el Parque Natural Chicaque. Esta especies es considerada endémica y catalogada como Vulnerable (VU), por la pérdida de su hábitat en su área de distribución, y cabe la posibilidad de su registro en el área de estudio, por existir mayor posibilidad que en el encuentre recurso alimenticio a comparación de la parte media y baja, deforestadas en la actualidad De esta manera, la condición del estado de conservación de la microcuenca, se puede ver reflejado en las especies de aves reportadas, por la ausencia total o pocos reportes de especies sensibles a las perturbaciones mínimas en las condiciones del bosque, como es la perdida de cobertura vegetal, como son los integrantes de las familias Cracidae, Odontophoridae, Strigidae, Trochilidae, Trogonidae, Momotidae, Bucconidae, Capitonidae, Ramphastidae, Psittacidae, Picidae, Thamnophilidae, Formicariidae, Rhinocryptidae, Pipridae, Furnariidae (Dendrocolaptidae) y Cotingidae. Por lo anterior, las aves reportadas para la micro-cuenca son características en su mayoría de bosques con alto grado intervención y áreas abiertas. Se identificaron cinco (5) actividades económicas en el trayecto de la micro-cuenca Quebrada Grande desde la parte alta, media y baja, que son relevantes y que pueden considerarse una amenaza para la vegetación nativa y la avifauna local, porque han provocado desde el retiro de la cobertura vegetal hasta la captación excesiva de recurso

hídrico, que al final causan la perdida de hábitats potenciales para la avifauna asociada a esta microcuenca. Las amenazas identificadas corresponden a prácticas pecuarias y agrícolas, parcelación para fines recreativos, piscicultura y captación de agua por uso doméstico correspondiente a la dinámica de u disturbio intermedio-alto.

CONCLUSIONES

El ensamble de aves de la micro-cuenca Quebrada Grande es característico de zonas de alta montaña con el predominio de aves características de áreas abiertas y bosques con alto grado intervención y vegetación en un alto porcentaje exótica.

Registro de la línea de base de la avifauna de la microcuenca Quebrada Grande con 102 especies de aves y la adición de 20 nuevos reportes para la zona, con integrantes de las familias Threskiornithidae, Picidae, Falconidae, Psittacidae, Thamnophilidae, Tyrannidae, Hirundinidae, Turdidae, Thraupidae, Emberizidae, Cardinalidae, Parulidae y Fringillidae.

El registro de la línea de base de la vegetación arbórea de la microcuenca alta de la Quebrada Grande con 2983 individuos vegetales que se pueden distribuir de la siguiente manera: 765 individuos pertenecientes a Angiospermas (74.8%), gimnospermas se registró un total de 628 individuos (23.1%) y con respecto a Filicopsida un total de 1590 individuos (2.15%).

Registro de la línea de base de la vegetación arbórea de la microcuenca Quebrada Grande con 247 individuos vegetales que se pueden distribuir de la siguiente manera: 145 individuos pertenecientes a Angiospermas según el sistema de clasificación APG III (74.8%), este a su vez se compone por 18 familias y 34 géneros, con respecto a gimnospermas se registró un total de 83 individuos (23.1%) conformado por 4 familias y 6 géneros y con respecto a Filicopsida un total de 19 individuos (2.15%) representado por 2 familia y 2 géneros del total de la muestra.

La parte alta de la microcuenca se puede considerar como un refugio potencial para las especies que sean menos tolerantes a los cambios de cobertura.

Las variaciones en las precipitaciones de la zona inciden sobre la abundancia de los organismos vegetales, sin embargo no es determinante ante este ecosistema que se encuentra sujeto a un disturbio intermedio y alto, además de que las comunidades vegetales están compuestas principalmente por las familias Fabaceae, Bignoniaceae y Myrtaceae.

Las estrategias de conservación deben enfocarse en primera instancia en la parte alta de la microcuenca, para mantener y aumentar la presencia de aves y vegetación en el paisaje, para posteriormente generar procesos de recuperación del bosque protector de la quebrada en la parte media y baja.

Se estableció la composición de las especies de aves y vegetación arbórea presentes en la microcuenca Quebrada Grande, Municipio de San Antonio del Tequendama, es necesario hacer comprobación en la cuenca media y baja para contrastar los resultados frente al proceso de disturbio intermedio.

REFERENCIAS

[1] Stiling, P. D., Stiling, P. D. (1996). *Ecology: Theories and applications*. Upper Saddle River, N.J: Prentice Hall.

[2] Chapman, J.L., Reiss, M. (2001). Ecology principles and applications. Cambridge University Press. U. K. 327.

[3] Bradshaw, A.D. (1993). Restoration ecology as a science. Restoration Ecology, 1 (2): 71-73.

[4] Vargas O, Premauer J. (2002). Efecto del pastoreo sobre la estructura de la vegetación en un páramo húmedo de Colombia. Ecotropicos; 15(1):35-50.

[5] Connell, J; Slatyer, R. (1977). Mechanisms of succession in natural communities and their role in community stability and organization en Vargas, O, Premauer. 1998. El pastoreo de ganado y su impacto en los ecosistemas naturales: el caso de los páramos andinos. Revista Pérez Arbelaezia. No 14- Febrero 2003 págs. 149-180.

[6] Vargas, O. (2011). Guía metodológica para la restauración ecológica del bosque altoandino. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

[7] Amazonas, Colombia. 68 p. 3 Instituto De Hidrología, Meteorología Y Estudios Ambientales De Colombia – IDEAM. 2010. Estudio Nacional del Agua. 4 Arévalo, D., J.G. Lozano., & J. Sabogal. (2011). Estudio Nacional de Huella Hídrica Colombia Sector Agrícola, Revista Internacional de Sostenibilidad, Tecnología y Humanismo, número 7, Cátedra UNESCO de Sostenibilidad, Universidad Politécnica de Cataluña, España

[8,9] Alcaldía De San Antonio Del Tequendama, Cundinamarca (2001). Esquema de Ordenamiento Territorial Municipio de San Antonio del Tequendama, Cundinamarca.

[10] Stotz D. F., J. W. Fitzpatrick, T. A. Parker Iii & D. K. Moskovits. (1996). Neotropical birds. Ecology and conservation. The University of Chicago. En: Martínez O, Olivera M, Quiroga C & Gómez I. 2010. Evaluación de la avifauna de la ciudad de La Paz, Bolivia. Rev. Perú. Biol. 17(2): 197 – 206.

[11] APG III (2009). An update of the Angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. Bot J.Linnean Soc. 161: 105-121.

[12, 31] Vargas, O. (2011). Guía metodológica para la restauración ecológica del bosque altoandino. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

[13] Ralph, C. J; Geupel, G. R.; Pyle, P; Martin, T.E.; Desante, D.F; M, Borja. (1996). Manual de métodos de campo para el monitoreo de aves terrestres. Gen. Tech. Rep. PSW-GTR-159. Albany, CA: Pacific Southwest Research Station, Forest Service, U.S. Department of Agriculture, 46 p.

[14,21] Villareal, H.; Álvarez, M.; Córdoba, F.; Escobar, G.; Fagua, G.; Gast, F.; Mendoza, H.; Ospina, M.; Umaña, A.M. (2004). Manual de métodos para el desarrollo de inventarios de biodiversidad.

Programa de inventarios de Biodiversidad. Bogotá, Colombia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt 236 p.

[15] Hilty & Brown. (2001). Guía de las aves de Colombia (traducción de H. Álvarez-López). American Bird Conservancy. 1030 p.

[16, 17] Mcmullan & Donegan. (2010). Field guide to the birds of Colombia. Fundación PROAVES. 230 p.

[18] Restall, R., Rodner, C., & M., Lentino. (2006). Birds of northern South America: an identification guide. Volume 2. Plates and maps. Yale University Press, New Haven. 656 p.

[19] Ridgely, R. S. & G. Tudor. (2009). Field Guide to the Songbirds of South America: The Passerines. University of Texas Press. 750 p.

[20] The Cornell Lab of Ornithology Neotropical Birds. (2013). Available from internet: http://neotropical.birds.cornell.edu/portal/home

[21,22] Remsen, J. V., J.R., C. D. Cadena, A. Jaramillo, M. Nores, J. F. Pacheco, M. B. Robbins, T. S. Schulenberg, F. G. Stiles, D. F. Stotz, & K. J. Zimmer. (2014). A classification of the bird species of South America. American Ornithologists' Union. Electronic Database accessible at http://www.museum.lsu.edu/~Remsen/SACCBaseline.html

[23] Stotz D. F., J. W. Fitzpatrick, T. A. Parker Iii & D. K. Moskovits. (1996). Neotropical birds. Ecology and conservation. The University of Chicago. En: Martínez O, Olivera M, Quiroga C & Gómez I. 2010. Evaluación de la avifauna de la ciudad de La Paz, Bolivia. Rev. Perú. Biol. 17(2): 197 – 206.

[23] IDEAM, Instituto de Estudios Meteorológicos y Ambientales. (2014) Estado Ambiental del país y las Cuencas.

[25] Stotz D. F., J. W. Fitzpatrick, T. A. Parker Iii & D. K. Moskovits. (1996). Neotropical birds. Ecology and conservation. The University of Chicago. En: Martínez O, Olivera M, Quiroga C & Gómez I. 2010. Evaluación de la avifauna de la ciudad de La Paz, Bolivia. Rev. Perú. biol. 17(2): 197 – 206.

[26] Chaparro-Herrera, S., Echeverry-Galvis, M. A., Córdoba - Córdoba, S., Y A. Sua-Becerra. (2013). Listado actualizado de las especies endémicas y casi-endémicas de Colombia. 14 (2): 235-272

[27] Rangel, O. (1995). Diversidad biótica I. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia

[28] Hilty & Brown. (2001). Guía de las aves de Colombia (traducción de H. Álvarez-López). American Bird Conservancy. 1030 p.

[29] Clewel, A. (1993). Ecology, restoration ecology and ecological restoration. Restauration Ecology, 1 (3)

[30,31,32] Rios, J; Vargas, O (2014). Listado Parque Natural Chicaque URL:http://www.chicaque.com/files/7014/0026/7554/LIstado_de_aves_2014.pdf.

[33] Ramírez-Albores, J. F. (2010). Avifauna de sitios asociados a la selva tropical en la depresión central de Chiapas, México. Acta Zoológica Mexicana (n.s.) 26(3): 539-562

[34] Kattan, G. H., H. Alvarez-López, & M. Giraldo. (1994). Forest fragmentation and bird extinctions: San Antonio eighty years later. Conservation Biology 8:138-146.

[34] Connell, J. H., and R. O. Slatyer. (1977). Mechanisms of succession in natural communities and their role in community stability and organization. The American Naturalist lll: lll9-ll44.

[35] López-Barrera, F. (2004). Estructura y función en bordes de bosques. Ecosistemas 13 (1): 67-77.

[36] Lau, P. (20089. Patrones de utilización de los hábitats por parte de las aves, en una región de sabanas bien drenadas de los llanos orientales en Venezuela. Ecotrópicos 21(1):13-33.

[37]Andrade-C., M. G., (2011). Estado del conocimiento de la biodiversidad en Colombia y sus amenazas. Consideraciones para fortalecer la interacción ambiente-política. Rev. Acad. Colomb. Cienc. 35 (137): 491-507.

FOREST LAND COVER CLASSIFICATION BASED ON OBJECTS DEFINITION

(Clasificación de coberturas de suelo forestal basadas en la definición de objetos)

José Germán Flores Garnica[a*+]

[a] Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: flores.german@inifap.gob.mx

Área del Conocimiento: Conservación de Ecosistemas.

ABSTRACT
Although in the last years remote sensing technologies have been improved, still many users base their land cover classification on concepts developed in the 70´s. This means that, in general, imagery classification is supported at the pixel level, considering the pixel as an isolated entity. In the last years commercial systems have allowed to consider not only pixel reflectance, but also texture, size, shape, context, etc. This paper illustrates an example of such approach. We used Landsat TM imagery of 2003 to support two classification process: 1) No supervised classification, which represent the traditional classification approach (pixel based); and 2) As an alternative process we used an object oriented classification, under which it is possible to use five characteristics of the image, such as reflectance value, object shape, object size, context, and texture. We used Kappa index to evaluate classification accuracy. In general object orientation classification showed the better results, however its process in more complicated that a simple no supervised classification.

Keywords: Image texture, landuse, satellite imagery.

ESTIMATION OF FOREST FUELS SPATIAL DISTRIBUTION BASED ON CLASSIFICATION AND REGRESSION TREES (CART)

(Estimación de la distribución espacial de combustibles forestales basada en arboles de clasificación y regresión)

José Germán Flores Garnica [a*+]

[a] Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: flores.german@inifap.gob.mx

Área del Conocimiento: Conservación de Ecosistemas.

ABSTRACT
Due to forest fire problematic, it is necessary to implement fuels management strategies that favor the reduction of forest fuels, while protecting the soil. To do this we must characterize fuels and estimate their spatial distribution (fuels maps). However, the development of these maps has been difficult and expensive. So this paper aims to analyze the use of classification and regression trees as an alternative for the generation of continuous surfaces (maps) of different types of fuels. These trees are presented in a graphical form, allowing better understanding of the criteria used in the classification of each pixel. The graphic representation of the results of the regression models (trees) was obtained. The graphical representations are presented assigning colors to the pixels of the grids, based on a value range of fuel loads. Thus, continuous surfaces, for classifying pixels with similar values (within a certain range) are defined. The continuous surfaces are the basis for the definition of final thematic maps. Since the measurement of fuels is not an activity that traditionally takes place in forest inventories, we illustrate techniques that help understand such process. It is also suggested that such measures be integrated with conventional inventories. In this way, we do not require to make two separate inventories.

Keywords: Forest fire, fuels management, fuels mapping.

MONITORING OF FOREST RESOURCES BASED ON GEOESTATISTIC ESTRATEGIES

(Monitoreo de recursos forestales a través de estrategias de geoestadìstica)

José Germán Flores Garnica [a*+]

[a] Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: flores.german@inifap.gob.mx

Área del Conocimiento: Conservación de Ecosistemas.

ABSTRACT
The management of forest resources requires, first of all, knowledge of both the quality and quantity of the resources it has. These have been traditionally estimated through forest inventories. However, it is important to consider that the realization of these inventories entails much effort and resources, for managing purposes in a forest area. Furthermore, it has tended to two perspectives: 1) using a systematic sampling design; and 2) handle low sampling intensities. This strategy has resulted in low accuracy of the statistical parameters. Moreover, it does not consider the spatial variation of the variables of interest (eg diameter, height, regeneration, etc.) throughout the study area. According to the above, an outline of the benefits of alternative strategies for inventory and monitoring of forest resources, such as the two-stage sampling and two-phase sampling is presented. These are based on the application of geomatic strategies, such as remote sensing and geostatistics. The application of these strategies tends to: a) reduce the sampling effort and time, with the consequent economic savings; b) define a better accuracy in estimating the spatial distribution of the variables of interest. Finally, I comment on the benefits of the use of geomatics in monitoring processes of forest resources.

Keywords: Interpolation, forest inventory, forest sampling.

ENVIRONMENTAL GOVERNANCE ACTIONS TO RECOVER THE CAJITITLAN WETLAND

(Acciones de gobernanza ambiental para rescate del humedal de Cajititlán)

Ramiro Luján Godínez[a*+],Adolfo Preciado Quiroz[a], Luz Adriana Vizcaíno Rodríguez[a], Alejandro Brena Becerril[a], Juan Luis Caro Becerra[a]

[a] Universidad Politécnica de la Zona Metropolitana de Guadalajara, Carretera Tlajomulco- Santa Fe km. 3.5 No. 595, Colonia Lomas de Tejeda, Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco, México. C. P. 45640. Correo electrónico: ramiro.lujan@upzmg.edu.mx

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: ramen5302@hotmail.com

Área del conocimiento: Conservación de Ecosistemas

ABSTRACT
Wetlands are among the most valuable environmental assets of a country. They provide multiple economic, social, aesthetic, and environmental benefits. Despite the significant benefits they provide, wetlands are increasingly affected by many factors, mainly of anthropogenic nature; therefore, is of the utmost importance to protect them. Environmental governance actions can help to reach that goal. In 2014 Mexico was ranked second in the world listing of international wetlands and the State of Jalisco had 14 wetlands classified as “Ramsar” sites. Several characteristics of the Cajititlan Lake make possible to classify it as an important state wetland. Today this wetland is in a critical condition due to contamination and improper use. In January 2014, several regional academic, research and social entities began a series of studies aimed to increase the knowledge about the wetland and its dire status, and particularly, to asses if the Cajititlan wetland meets some of the “Ramsar” Convention’s criteria to classify it as a wetland of international importance, assuming that the identification and implementation of potential environmental governance actions could ultimately lead to the recovery, protection and conservation of the lake. The conducted studies were of a transversal and descriptive nature and covered physiographic, topographic, and hydrologic characteristics of the lake and its basin, aspects related to the native flora and fauna of the region, as well as archeologic, architectonic and social issues. The results of the studies indicate that the lake complies with four out of nine of the “Ramsar” Convention’s requirements; hence, it could be potentially designated as a “Ramsar” site. The inclusion of the Cajititlan wetland in the “Ramsar” sites Convention’s listing could bring fourth important benefits to the lake, its associated environment and the whole region.

Keywords: wetland, environmental governance, recovery, Cajititlan.

RESUMEN
Los humedales forman parte de los recursos naturales más valiosos con los que puede contar un país, pues proporcionan múltiples beneficios económicos, sociales, estéticos, y ambientales. No obstante tales beneficios, los humedales se ven cada vez más afectados por muchos factores, principalmente de origen antropogénico, por lo que es de vital importancia su rehabilitación y protección. La implementación de acciones de gobernanza ambiental podría permitir lograr tales metas. En el 2014

México se ubicó en el segundo lugar a nivel mundial en el listado de humedales de importancia internacional y el estado de Jalisco contaba con 14 humedales clasificados como sitios "Ramsar". Algunas características de la laguna de Cajititlán permiten catalogarla como un importante humedal estatal. Actualmente este humedal se encuentra en una condición crítica debido a la contaminación y al mal uso. En enero de 2014, varias instituciones académicas, de investigación y del sector social, iniciaron una serie de estudios dirigidos a incrementar el conocimiento sobre el humedal y su deplorable situación, considerando que la identificación e implementación de potenciales acciones de gobernanza ambiental podrían conducir a la recuperación, protección y conservación de ese cuerpo de agua. Los estudios realizados fueron de naturaleza transversal y descriptiva cubriendo temas relacionados con las características fisiográficas e hidrológicas de la laguna y su cuenca, flora y fauna nativas de la región, así como aspectos arqueológicos, arquitectónicos y sociales. Los resultados de los estudios indican que la laguna cumple con cuatro de los nueve criterios que la Convención "Ramsar" establece para designar a un humedal como de importancia internacional, por lo que podría ser eventualmente declarado como sitio "Ramsar". La inclusión del humedal de la laguna de Cajititlán en el listado de humedales de importancia podría generar importantes beneficios a ese cuerpo de agua, el medio ambiente asociado y a la región entera.

Palabras Clave: humedal, gobernanza ambiental, recuperación, Cajititlán.

INTRODUCCIÓN

Los humedales forman parte de los recursos naturales más valiosos de un país, pues proporcionan múltiples beneficios ambientales, económicos y sociales. A pesar de su importancia se ven cada día más afectados por factores de origen natural y/o antropogénico. Entre las alternativas para rehabilitar y conservar los humedales se pueden mencionar las acciones de gobernanza ambiental. El concepto gobernanza se refiere al "arte o manera de gobernar que tiene como objetivo el logro de un desarrollo económico, social e institucional duradero, promoviendo un sano equilibrio entre el Estado, la sociedad civil y el mercado de la economía" [1]. Es un término que implica una relación de complementariedad entre el Estado y la sociedad civil. [2]. Como gobernanza ambiental se entiende el gobierno y la administración del medio ambiente y sus recursos naturales como un bien común mundial.

México es un país con gran número de humedales reconocidos como importantes. En el 2014 ocupaba el 2º lugar a nivel mundial con 142 sitios incluidos en la Lista de la Convención sobre los Humedales de Importancia Internacional, organismo conocido como la Convención Ramsar. El estado de Jalisco cuenta con trece (13) sitios "Ramsar" [3], además de esos sitios cuenta con cuerpos de aguas naturales y artificiales con características de humedales: presa Basilio Vadillo y laguna de Cajititlán [4].

Descripción del área de estudio

La laguna de Cajititlán se localiza en el municipio de Tlajomulco de Zúñiga, en la porción centro sur estado de Jalisco, a 25 kilómetros al sur de la ciudad de Guadalajara. Jalisco, México. Su cuenca registra una extensión de 370 km^2, es un cuerpo de agua natural perenne entre los paralelos 20°26.2' – 20°24.1' de latitud norte y meridianos 103°22.3'-103°16.9' de longitud oeste [5].



Figura 1. Imagen satelital de la laguna de Cajititlán, (Google earth, 2014)

El clima del área se clasifica como tipo (A) C (WO) (w) a (i) semicálido subhúmedo, según el Sistema de Clasificación Climática de Köppen (modificado por E. García, 1975 y 1988) [6], con precipitación media de 883 mm, máxima de 900 mm y mínima de 600 mm. La distribución de lluvias es de un 88.5% entre junio y octubre, el 8.3% se da entre enero y mayo y el 3.2% entre noviembre y diciembre [7]. Temperatura media anual: 19.9° C y el rango de valores extremos oscila entre los 7.7ºC y los 31.7ºC [8].

La laguna tiene una longitud de 7.5 km, un ancho promedio de 2.0 km, profundidad máxima de 4.72 m y media de 2.5 m; la capacidad máxima de almacenamiento es de 54.400 millones de m^3, con un área de embalse de 1,700 hectáreas, a una altitud media de 1,551 metros sobre el nivel del mar [9]. Es un lugar de gran atractivo turístico estético e histórico. La laguna constituye para los habitantes del municipio de Tlajomulco de Zúñiga, un símbolo de identidad e importante fuente de ingresos [10]. Actualmente sufre un severo y creciente proceso de deterioro ambiental facilitado por diversos factores antropogénicos.

En la parte final del siglo pasado la tasa de crecimiento poblacional municipal se ubicó en un valor cercano al 3% anual, alcanzando al final del siglo XX el 6 % anual [11]. Reportes del Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática de México (INEGI), señalan que los habitantes en las inmediaciones del lago en el año 2010 fueron 59,000 personas [12].

El tratamiento de las aguas residuales municipales no ha recibido la atención necesaria por la falta de solvencias económicas y voluntades políticas [13]. Los sistemas de alcantarillado de las poblaciones y desarrollos urbanos asentados en las proximidades de la laguna descargan en ella. Hasta el 2009, las aguas residuales no recibieron tratamiento alguno, después de ese año se construyeron tres plantas de tratamiento de aguas residuales: planta de Cajititlán, con capacidad de 12 l/s y trata 11 l/s; planta de San Juan Evangelista la cual puede tratar 5 l/s y trata 1.5 l/s; planta de tratamiento de Cuexcomatitlán, equipada para tratar 60 l/s y trata 57.5 l/s, finalmente, en el 2010 entró en operación la planta de de Cuexcomatitlán. (Velázquez, 2012). Según la Comisión Estatal del Agua de Jalisco (CEAS), las aportaciones de aguas residuales en la cuenca hidrológica de la laguna en el 2013 alcanzaron un gasto de 99.5 l/s, de los cuales se trataron 57.5 l/s, con una cobertura de saneamiento del 58% [14].

La proliferación de desarrollos habitacionales y áreas industriales construidas en las últimas décadas ha reducido sustancialmente la cobertura vegetal de la cuenca, modificando usos de suelo previos. La pérdida de suelo se estima del orden de 70,000 toneladas anuales [15]. La extensión media y la poca profundidad del embalse favorece la concentración de partículas suspendidas y disueltas, nutrientes, contaminantes biológicos y la proliferación de vegetación acuática invasora [16]. Los eventos de secado parcial y contaminación de sus aguas han reducido las poblaciones de especies nativas de peces [17].

Los factores anteriores han ocasionado un severo deterioro de las condiciones existentes en la laguna antes de 1980, generando un proceso de eutrofización evidenciado por el permanente color verde intenso y la elevada turbidez de sus aguas. Son recurrentes los eventos de muertes masivas de peces.

Justificación de los trabajos

El continuo y creciente deterioro de la calidad del agua de la laguna y su medio ambiente lagunar, generaron la preocupación de los habitantes de las poblaciones locales y de la sociedad organizada de la región, motivándolos a buscar el apoyo de instituciones académicas y de investigación locales y regionales, para identificar y desarrollar acciones que condujeran a la rehabilitación, conservación y protección de ese cuerpo de agua y el ecosistema asociado.

Objetivo de los estudios

Las instituciones educativas de la CASETEJ que participaron en los trabajos realizaron estudios sobre las características físicas del sitio y su región biogeográfica. El objetivo de los mismos fue evaluar si la laguna de Cajititlán cumple con alguno o algunos de los criterios necesarios para ser declarado como humedal de importancia internacional.

METODOLOGÍA

Los estudios fueron de naturaleza transversal y descriptiva, realizados de enero a diciembre de 2014 mediante trabajos de gabinete y campo y la obtención de indicadores ambientales y sociales. Se obtuvo información sobre las características físicas, hidrológicas, calidad de agua, limnología, pesquería, presencia de flora y fauna de la laguna y su cuenca; así como aspectos históricos, arqueológicos, sociales y turísticos del área. Se desarrolló un programa mensual de monitoreo de calidad de agua de la laguna. Se obtuvieron datos de parámetros físicos y químicos del agua tales como: temperatura, transparencia, oxígeno disuelto, alcalinidad, dureza conductividad, $DBO_{5,}$ pH, nitritos, nitratos y fósforo total.

RESULTADOS

Coincidiendo con resultados de estudios previos y del estudio limnológico de la laguna de Cajititlán realizados en el periodo de marzo 2009 a septiembre 2014 [18], [19], [20] [21], [22], [23] se determinó que se trata de un cuerpo de agua cálido, eutrófico con tendencia a la hipereutrofización y bajos niveles de oxígeno disuelto que fluctúan entre los 0.392 mg/L y 17.38 mg/L [23]. Los niveles de oxígeno en las aguas de la laguna variaron según las horas del día, con rangos desde 0 hasta sobresaturación. Las aguas de la laguna son muy alcalinas, con pH alto (9.52 a 8.54), alto contenido de amonio y ortofosfato disuelto. Los niveles promedio de clorofila se situaron en 88.0 mg/m^3, de salinidad entre 0.3 a 0.342 ppm y los sólidos totales variaron entre 0.405 a 0.4542 ppm [24]. Los valores relativos a la Demanda Química de Oxígeno (DQO), se registraron entre los 394.8 a 14.76 mg/L, la Demanda Bioquímica de

Oxigeno (DBO_5) a los cinco días fue de 27.6 a 9.6 mg/L. Los niveles de organismos coliformes totales se situaron entre 2400 y 5 UFC/100 ml y organismos coliformes fecales entre los 2400 y 7 UFC/100 ml [25].

Descripción de la flora

Los estudios sobre la flora de la región comprendieron los principales tipos de comunidades vegetales: terrestre, acuática y semi-acuática. Se identificaron en la cuenca tipos de vegetación terrestre, caracterizados por bosques de pino, pino-encino, encino-pino, encino, bosque tropical caducifolio, pastizal inducido [26], vegetación semiacuática y acuática y vegetación secundaria. Se registraron 330 géneros y 530 especies distribuidas en 100 familias botánicas [27]. La vegetación semiacuática es la que ocupa el segundo lugar en cuanto a extensión [28]. Están presentes diversas especies como estrato herbáceo en forma semiacuática y terrestre en la periferia de la laguna [29]. En zonas donde se presenta la transición entre el pastizal y el bosque espinoso, en lugares poco inundados y en el área perifocal se encuentraron diversas especies de arbustos. Se encuentran especies de hábito trepador [30]. Existen géneros de fitoplancton de 5 grupos: Cianófitas, Clorófitas, Crisófitas, Euglenóitas y Pyrrófitas [31].

Descripción de la fauna:

Los estudios sobre fauna incluyeron la clasificación de especies de invertebrados (zooplancton) y vertebrados (mamíferos, aves, reptiles, anfibios y peces) del lago y su cuenca.

Invertebrados

Se detectaron 35 géneros de invertebrados pertenecientes a 2 grandes grupos zoológicos: rotíferos y crustáceos. Los géneros más representativos por su abundancia y su frecuencia están formados por 15 géneros. Algunas de las principales especies de invertebrados son: *Nauplius, Cyclops, Anuraea, Cypridopsis, Daphnia, Eubramchipus* y otros [32].

Vertebrados:

Mamíferos: es un grupo afectado significativamente por las actividades antropogénicas en la zona. Se identificaron en el área de la laguna 40 especies de mamíferos, distribuidos en 7 órdenes y 14 familias. En lo relacionado con las aves se tiene un inventario de 58 especies de aves residentes y migratorias, pertenecientes a 17 familias y 8 órdenes, de las cuales 16 especies son residentes y 42 son migratorias [33]. De los reptiles y anfibios se tiene el registro en la laguna de 13 especies de reptiles, agrupados en 2 órdenes y 5 familias; así como 6 especies de anfibios agrupados en 1 orden y 3 familias [34]. El inventario de peces comprende siete (7) géneros y doce (12) especies. Las especies más relevantes son cuatro (4) exóticas y tres (3) nativas. Del total de especies, cuatro (4) son susceptibles de cultivo y comercialización [35]. Las especies que se cultivan y comercializan son: Carpa común (*Ciprinus carpio*), Carpa espejo (*Ciprinus carpio var specularis*) y Tilapia (*Oreochromis sp*.)[36]. Las especies nativas son tres: sardinita (*Astyanax fasciatus),* pescaditos loderos (*Goodea atripinnis*) y el guppy (*Poeciliopsis infans*) que no son aprovechables económicamente; de la familia Atherinidae se tiene una especie exótica: charal (*Menidia grandocule*) que tiene importancia comercial [37].

Aspectos arqueológicos, arquitectónicos y sociales

Se tiene el registro de vestigios arqueológicos, evidencias del establecimiento desde épocas remotas de núcleos de población significativos en el área. Las poblaciones de origen indígena son: Cuyutlán, Cuexcomatitlán y Cajititlán, y otras dos de origen antiguo que se conocen por sus nombres en castellano: San Juan Evangelista y San Lucas Evangelista, que fueron repobladas en el Siglo XVI a la llegada de los conquistadores españoles al área de la laguna. [38]. En la cuenca del lago existen construcciones religiosas de alto interés histórico. Se tienen sitios en la cuenca donde se pueden llevar a cabo actividades de ecoturismo, turismo religioso y rural. Los usos de suelo en la cuenca son variados: 50 % del área tiene usos agrícolas, el 27 % son áreas boscosas, un 11 % es selva caducifolia, el 8 % lo constituyen pastizales, las áreas urbanos son el 2%, la superficie del cuerpo de agua es del 2% [39].

DISCUSIONES

La Convención Ramsar establece nueve (9) criterios para identificar humedales de importancia internacional los cuales son divididos en dos grupos: El Grupo A de criterios comprende sitios de humedales raros o únicos, el cual no aplica al lago de Cajititlán. El Grupo B de criterios se refiere a sitios de importancia internacional para conservar la diversidad biológica, el que a su vez se subdivide en criterios basados en especies y comunidades ecológicas, criterios específicos basados en aves acuáticas, criterios específicos en base a peces y criterios específicos basados en otros taxones.

El **Criterio 2** del subgrupo de criterios B basados en especies y comunidades ecológicas, establece que un humedal es de importancia internacional si sustenta especies vulnerables, en peligro o en peligro o comunidades ecológicas amenazadas según las respectivas normas nacionales. Según la norma mexicana NOM-059-SEMARNAT-2001 [40], en Cajititlán se identifican tres (3) especies de aves, tres (3) especies de reptiles, dos (2) de anfibios y dos (2) de mamíferos.

El **Criterio 4** establece que un humedal será considerado de importancia internacional si sustenta especies vegetales y/o animales en etapa crítica de su ciclo biológico, o les ofrece refugio cuando prevalecen condiciones adversas. Entre las especies de flora de la laguna dos se consideran en peligro; otras dos especies de la región, aunque no presentan estado crítico de conservación, pueden verse afectadas en el tamaño de sus poblaciones según la norma NOM-059-SEMARNAT-2010 [41]. De acuerdo con estudios realizados en la zona, se tiene registro de la rana de patas grandes (*Rana megapoda*), especie endémica de importancia ecológica y económica, considerada vulnerable en la Lista Roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) y bajo protección especial en la NOM-059-SEMARNAT-2001 [42]. No se identificaron especímenes del batracio en el periodo de estudio.

El **Criterio 5** es un criterio relativo a aves acuáticas. Un humedal deberá ser considerado de importancia internacional si sustenta de manera regular una población de 20,000 o más aves acuáticas. En promedio, en la laguna se mantiene una población aproximada a las 24,000 aves, tanto residentes como migratorias, que utilizan al lago como punto de descanso, refugio y alimentación. De las especies de aves 56 son acuáticas, y 3 son especies asociadas al cuerpo de agua, pertenecientes a 17 familias y 8 órdenes; 17 especies son residentes y 42 migratorias [43] Destacan la presencia de la garza ganadera (*Bulbucus ibis*), el garzón blanco (*Casmerodius albus)* y la gallareta (*Fullica americana)* entre otros [44].

El **Criterio 7** de la Convención establece que un humedal será de importancia internacional si sustenta una proporción significativa de subespecies, especies o familias de peces autóctonas, interacciones de

especies y/o poblaciones representativas de beneficios y/o valores de los humedales. La laguna de Cajititlán cumple con este criterio ya que sustenta tres (3) especies de peces nativos de importancia: el charal (*Menidia Grandocule),* el pescadito lodero o popochita (*Goodea atripinus)* y pintitas *(Posiliopis infans)* [45]. Entre las especies bajo protección especial según la norma NOM-059-SEMARNAT-2001 [46] se incluyen al aguililla aura (*Buteo albonotatus*), la víbora de cascabel (*Crotalus basiliscus*) y la tortuga común (*Kinosternon integrum*), entre otros.

Los criterios mencionados son las bases para identificar y desarrollar acciones de gobernanza para revertir el deterioro del humedal y lograr su rehabilitación y uso sustentable. Entre las potenciales acciones de gobernanza se consideran las siguientes: designación de una porción de la cuenca como Área de Protección Ambiental, elaboración de la Ficha Informativa Ramsar y formación de la Comisión de Cuenca de la laguna de Cajititlán.

CONCLUSIONES

Los estudios realizados por las instituciones académicas que forman la Comisión Ambiental del Sistema Tecnológico del Estado de Jalisco (CASETEJ) permiten concluir que la laguna de Cajititlán es un humedal natural de alta prioridad. La laguna cumple con 4 de nueve (9) criterios que la Convención Ramsar establece para identificar un humedal como de importancia internacional y sitio Ramsar, los cuales son: Criterios 2, 4, 5 y 7. Los criterios anteriores constituyen las bases para plantear e implementar acciones de gobernanza ambiental dirigidas a rescatar el humedal de Cajititlán, tales como: declaratoria de ese cuerpo de agua como humedal de importancia internacional y sitio Ramsar.

La potencial declaratoria de la laguna como humedal de importancia y como sitio Ramsar permitiría detener su actual proceso de deterioro, mejorar sus condiciones actuales y las del medio ambiente lagunar asociado, impactando positivamente la calidad de vida de la localidad la región.

REFERENCIAS

[1], [2] Brenner, L., Vargas del Rio D. (2010). Gobernabilidad y Gobernanza ambiental en México. La experiencia de la Reserva de la Biosfera Sian Ka'an., Biblioteca Jurídica Virtual del Instituto de Investigaciones Jurídicas de la UNAM. POLIS 2010, Vol.6 Núm. 2 pp. 115-154.,www.juridicas.unam.mx.

[3] Comisión Nacional de Áreas Nacionales Protegidas (2014). Humedales Mexicanos de Importancia Internacional. Dirección electrónica: http://ramsar.conanp.gob.mx. Visitada el 15 de julio de 2015.

[4], [5], [7], [8], [9] [11], [13], [14], [16], [26], [28], [39] POETT, (2010). Programa de Ordenamiento Ecológico Territorial del Municipio de Tlajomulco de Zúñiga., H. Ayuntamiento 2006-2009 de Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco, pp. 60, 51, 20-24, 20-22, 60, 10-12, 73, 75, 78, 116-125, 138-139, 139-150.

[6] García, E. (1975), Modificación a la Clasificación Climática de Köppen, Instituto de Geografía. UNAM.

[9] CONAGUA (2007). Comparativo de presas de almacenamiento en el estado de Jalisco en el 2007-2010. Estadísticas del Agua en México, edición 2010. www.conagua.gob.mx.

[10] Valenzuela Zapata, A.G., 2011. López-Muraira I.G., Gaytán S. Traditional *Knowledge Agave inaequidens* K. Koch conservation and the Charro Lariat artisans of San Miguel Cuyutlán, México. Ethnobiology letters. Vol. 2: 72-80.

[12], Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI). Censos de población en el estado de Jalisco, 2010. Dirección electrónica: http://cuentamen.inegi.gob.mx.

[14] CEAS, (2014). Comisión Estatal de Agua de Jalisco, Sistema de Calidad del Agua de Cuerpos Superficiales. Sitio de red: www.ceajalisco.gob.mx/sca/sca.html, visitado en julio de 2014.

[15] Juárez, A. (2013). Contaminación Agrícola y Erosión en la Cuenca del Lago Chapala. Instituto Corazón de la Tierra/Instituto Politécnico Nacional/Universidad Veracruzana/Baylor University Internacional Lake Environment Committe Foundation. 170 pp. ISBN 978-607-96305-0-8.

[17] Velázquez L. L. *et al*. (2012). Agua y conflictos ambientales en la ribera de Cajititlán. Repositorio Institucional del ITESO. Sitio de red: http://rei.iteso.mx.

[18] INEGI, (2000). Cartas topográficas, F13D76 (Chapala) y F13D75 (Jocotepec), escala 1:50,000.

[19] Michel P. J. G. *et al.* (2011). Avances del programa de protección, conservación, manejo y aprovechamiento del Humedal de importancia internacional "Laguna de Zapotlán" Sitio Ramsar. 1° Ed. Universidad de Guadalajara. Zapopan, Jalisco, México. 978-607-450-881-9.

[20] Guzmán. A. M. (1989). La Fauna Acuática de la Nueva Galicia. Instituto de Limnología. Universidad de Guadalajara, Chapala, Jalisco, México.

[21] [23], [24], [25] Vizcaíno R., A., Luján, G. R, Brena, B. A., Caro B, J.L. (2014). "Reporte técnico de resultados de las investigaciones realizadas sobre el Lago Cajititlán", UPZMG, Informe Final. Octubre de 2014. Autor corresponsal Dra. Adriana Vizcaíno R., correo electrónico: adyvizcaino7@gmail.com.

[22] Reyes R. J., Chávez M. M. C., Serratos A. J. C., Carreón A. J., Bello, C. D., (2014). Mercurio en la Laguna de Cajititlán, Jalisco. Datos sin publicar.

[27] Rzedowski, J., (2006). Vegetación de México, 1ra. Edición digital, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México.

[29], [30], [31] Cortés, C. (2000). Florística de la región de Cajititlán. Tesis de Licenciatura. U. de G.

[32] López-Muraira I.G. (2014). Instituto Tecnológico de Tlajomulco, Jalisco. Comunicación personal.

[33], [43], [44] Reyna B. O. F., López, A. I., Salazar, G.V.R., (2011). Riqueza, abundancia, distribución y estacionalidad de las aves acuáticas de la laguna de Cajititlán, Jalisco, México. XI Congreso para el estudio y conservación de las aves en México (CECAM). Mazatlán, Sinaloa. 70 pp.

[34] Michel Parra J. Guadalupe, *et al. (*2010). Estudio comparativo del monitoreo limnológico en cuatro humedales de Jalisco. XIX Semana Nacional de Investigación. Centro Universitario del Sur. 2010.

[35], [36] Michel Parra J. G., *et al.* (2009). Monitoreo ictiológico, limnológico, pesquero y sanitario en cuatro humedales de Jalisco. XIX Semana Nacional de Investigación. Centro Universitario del Sur. Universidad de Guadalajara. Ciudad Guzmán, Jalisco.

[37], [45] Michel P., J.G. *et al*., (2010) Barragán B., E. Flores O.J. (2011). Ictiología, limnología, pesquería y microbiología del lago de Cajititlán. IX Congreso Internacional y XV Nacional de Ciencias Ambientales, Universidad de Quintana Roo - Academia Nacional de Ciencias Ambientales A.C. 2010.

[38] Patiño, f. J.A. 1878. «Topografía del curato de Tlaxomulco». Noticias varias de la Nueva Galicia S/A. Tipografía Banda Ex Convento de Santa María de Gracia, Estado de Jalisco (Periódico Oficial del Estado).

[40], [42], [46] SEMARNAT, (2001). Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001. Protección ambiental-especies nativas mexicanas de flora y fauna silvestres-categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-lista de especies en riesgo., D. O. F., miércoles 6 de marzo de 2002, segunda sección: 1-78.

[41] SEMARNAT, (2010). Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2010. Protección ambiental-especies nativas de México de flora y fauna silvestres-categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación, jueves 30 de diciembre de 2010.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

AUTOTROPHIC INDEX EVALUATION IN DIFFERENT NICHES AT LAS ANIMAS CREEK IN NATURAL PARK LA PRIMAVERA, JALISCO, MEXICO.

(Evaluación del índice autotrófico en diferentes nichos en el arroyo Las Ánimas en el APFF Bosque La Primavera, Jalisco, México)

Esteban Gottfried Burguett[a], Desiree Guzmán Gómez*[a], Laura L. Ramírez Godínez[a], Violeta B. Castañeda Robles[a], Miguel Ángel Velarde Flores[a], J. Francisco Echaide Aquino[a], Jessica G. Lamas Hernández[a], José Luis Zavala Aguirre[b+].

[a] Escuela de Biología. Universidad Autónoma de Guadalajara.

[b] Laboratorio de Hidrobiología y Ecotoxicología Acuática. Universidad Autónoma de Guadalajara.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: joseluis.zavala@mail.uag.mx

Área del Conocimiento: Conservación de Ecosistemas.

ABSTRACT
Las Animas creek is born in the Natural Park La Primavera; is a non-intermittent system that flows into La Vega Reservoir at Tala municipality, Jalisco. Even though the forest has been studied with a floristic and zoological approach there is still a lack of ecological studies to have a reference point that allows evaluating its evolution as a consequence of anthropic intervention, forest fires, etc. In the present study, periphyton community is evaluated inside the creek by the quantification of the autotrophic and heterotrophic rate during 2014 rainy season. The studied area was delimitated in a Nano basin inside the governmental administration locally known as “El Chal” which has access by dirt road. Artificial substrates were prepared with weighted and coded microscopic slides which were set in 9 different locations with different shadow, water flow and vegetation type and maintaining depth and substrate as constant. After 4 weeks of incubation in situ periphyton samples were collected. Biomass and chlorophyll content were measured at laboratory with limnological standard methods to obtain the autotrophic index. Important variation were found both at biomass as autotrophic index with average respective values of 1.3 g m^{-2} y 337.8 (dimensionless). The autotrophic index was between good (131.2) and medium condition (1311.6) representing a reference value for future studies related to seasonal or man induced variations. Staring from the biomass value, annual productivity can be estimated as 15.7 g m^{-2} $year^{-1}$.

Keywords: La Primavera Forest; Las Animas Creek; Productivity; Autotrophic index.

VEGETAL GROWTH PROMOTION IN NOPAL SEEDLINGS THROUGH FUNGI APPLICATION

(Promoción de crecimiento vegetal en plántulas de nopal mediante la aplicación de hongos)

Diana Marcela Arias-Moreno[a*], Maria de la Luz Guerrero-González[a], Juan Francisco Jiménez-Bremont[b], Pablo Delgado-Sánchez[a+].

[a] Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Soledad de Graciano Sánchez, SLP., México.
[b] División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, San Luis Potosí, SLP., México.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: pablo.delgado@uaslp.mx

Área del Conocimiento: Conservación de Ecosistemas.

ABSTRACT
The use of biocontrol organisms has received very attention in recent years, not only for their successful applications in different plant species for disease control, but also by the ability of these microorganisms especially fungi colonize the roots, in which interaction increases the growth and productivity of plants. In the present study was evaluated the action of *Trichoderma harzianium*, *Trichoderma koningii*, *Penicillium chrysogenum* and *Phoma medicaginis* as vegetal growth promoters in *Opuntia streptacantha* seedlings. The experiment was conducted under laboratory conditions with temperature, light and irrigation controlled. When the seedlings had two well developed cotyledons, they were transplanted into pots containing sterile substrate and subsequently were inoculated with a concentration of 6 x 10^7 spores/ml per treatment. The treatments were arranged under a completely randomized design with 3 replications including the control, for which fungal spores were not applied to seedlings evaluated. Were taken as parameters for measuring the presence, height and thickness of the cladode. The results showed that the cladode appeared faster in the seedlings that were inoculated with *T. harzianium*, *T. koningii*, *Phoma medicaginis* and *P. chrysogenum* respect to the control. However, the greatest number of seedlings that showed cladode were inoculated with *P. chrysogenum* and *T. koningii*. Further statistical analysis showed significant differences for the variable height of cladode, where *T. koningii* was the best treatment. Moreover, for the thickness of cladode showed no significant differences between treatments. The results obtained in this study suggests that *T. koningii* has the ability to promote vegetal growth in *O. streptacantha.*

Keywords: biocontrol; *Trichoderma koningii*; *Opuntia streptacantha*.

ISOLATION AND PROPAGATION OF EDIBLE ECTOMYCORRHIZAL MUSHROOM MYCELIUM IN “EL FARO” FOREST SCHOOL

(Aislamiento y propagación de micelio de hongos ectomicorricicos comestibles en “El Faro” bosque escuela)

Lorenzo W. P. Rodríguez Pérez*[a], María de los Ángeles Aquiahuatl Ramos[b], Nancy Edith Bautista Martínez[a]

[a] Programa de Investigación Sierra Nevada-UAM
[b] Universidad Autónoma Metropolitana

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: aura@xanum.uam.mx

Área del Conocimiento: Conservación de Ecosistemas

ABSTRACT
Ectomycorrhizal fungi form symbioses with all major tree species in the boreal forest zone and are of key importance in nutrient acquisition, plant protection against root pathogens and drought stress. Controlled mycorrhization into nurseries has been used in some countries in order to achieve improved growth responses and rapid post-transplantation adaptation and with the aims of introducing growth-promoting ectomycorrhizal fungi in reforestation sites. The objective of this work is the isolation and propagation of fungus mycelium of one of the native edible fungi most appreciated by the local population and which is collected in the protected area "El Faro” (ANP) in Tlalmanalco, State of México; contributing in this way to the collective construction of knowledge and to encourage neighboring communities to take ownership of the actions for the preservation and maintenance of the ANP. Mycelium cultivated on a solid culture system, maintaining long-term viability and retaining colonization capacity could be used as inoculant in afforestation. For that purpose fruiting bodies of *Lactarius indigo* were collected and then aseptic fragments were growth on Potato dextrose agar (PDA) and flour bean agar (FBA) plates and incubated at 25 °C for 20 days. Ten cork borer punches of mycelium in sterile saline solution which where then blender homogenized during 10, 20 and 30 seconds where used to measure colony forming units (CFU) / mL by plate count on PDA and FBA culture media, after a 10 days incubation period at 28 °C. For solid culture, autoclave sterilized mixtures of volcanic sand, peat moss and nutrient media were prepared in polypropylene bags and culture bottles, inoculated *with Lactarius* mycelium homogenate and incubated at 28 °C for 1 month, similarly the mycelial resistance was evaluated. The *Lactarius indigo* bottle cultured mycelium was feasible during and after 18 months storage a 25°C under study conditions.

Keywords: ectomycorrhizal fungi, inoculum, *Lactarius*, solid culture.

TROPHIC BEHAVIOR OF COASTAL LAGOON COYUCA DE BENITEZ, EDO. GRO. MEXICO.

(Comportamiento Trófico de la Laguna Costera de Coyuca de Benítez Edo. de Gro. México)

Raúl Arcos Ramos[a*+], Monserrat L. Portillo Ojeda[a], Jafet Reyes Cardoso[a]

[a] FES Zaragoza UNAM /Lab .Contaminación acuática.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: biolrar@terra.com.mx

Área del Conocimiento: Conservación de Ecosistemas.

ABSTRACT
The lagoon of Coyuca de Benitez is located in the coastal lagoons set of Edo. Gro. Mexico Separated from the sea by a small barrier, in the dry season is closed, the lagoon, it is an important generator of employment for fishermen and tourism service providers. This system shows an increase in tourism and agricultural activities, which affects the metabolic behavior of the system, making and considering its ecological, economic and social importance is necessary to know the trophic level that presents the Lagoon. This paper presents the evaluation the behavior of physical and chemical parameters of the system, among which consider: nutrients, salinity, BOD, COD, sulphates, temperature, and index Saprobiety as a complement to two different levels in the water column; establishing surface and bottom seven different monitoring points considering anthropogenic effect six monthly samples were taken for sampling, Van Dorn sampler was used, and for chemical determinations multiparameter models brand Hanna HI 9829 and HI 83200. Used were made Univariate statistical tests (ANOVA) using the statistical package Stat Graphic Centurion XVI. Like nulle hipothesis, we consider to find nutrimental variatons in the different points of sampling. The results established that chemical parameters have normal statistical behavior, which showed significant differences if dissolved oxygen, phosphates, BOD, ammonium, and sulfates. In conclusion we can establish that: The system in relation to the nutritional assessment is moderately eutrophic; salinity has oligohaline except features in the bar, when this marine influence opens. Saprobiety index establishes us Mesosaprobiety conditions, in conclusion is meso trophic system with a tendency towards the eutrophication in some areas, so it is advisable to continuously monitoring the feeding behavior of the lagoon system.

Keywords: Nutrients; Coastal lagoon; Eutrophication.

INTRODUCCIÓN

Dentro de lo que se denomina zona costera (aproximadamente comprendida desde la plataforma de mar abierto hasta donde crece la vegetación halófila tierra adentro) se encuentran diversos rasgos que conforman la línea de costa, como lagunas, estuarios, esteros, marismas, bahías, caletas, ensenadas; también existen dentro de esta zona cenotes, aguadas, sartenejas, entre otros Dicha diversidad morfológica ha sido consecuencia de la ubicación latitudinal tropical de México y su evolución geológica.

Según Lankford [1] en el país se encuentran 123 rasgos costeros importantes, sin contar los cenotes y cuerpos asociados; por su parte, Contreras [2] registra la presencia de poco más de 600, entre los que incluye todos los rasgos arriba citados (sin contar los cenotes) tomando como unidades individuales los que pertenecen a un mismo sistema lagunar pero intercomunicados. En el caso de los cenotes y su diversidad morfológica, funda- mentalmente se localizan en la Península de Yucatán en un número aproximado de 10 000.

En forma general, existen diferencias marcadas entre los sistemas costeros del Golfo de México y los del Pacífico, incluso entre los del Golfo de California y el lado occidental de la Península, como resultado del clima que trae consigo el patrón, la recurrencia y la intensidad de las lluvias o la ausencia de las mismas, que se traducen en aportes fluviales, desde grandes ríos hasta escasos y efímeros aportes continentales. Según Ortiz Pérez [3], la alta productividad de las lagunas costeras está basada no solo en la producción fitoplanctónica (máximos de 1 gc m−2 día−1), sino también en la productividad de la vegetación sumergida (fanerógamas de 2 a 5 gc m−2 día−1), en las macro algas y en el manglar.

Uno de los aspectos menos estudiados en cuanto a flujos de materiales en ecosistemas lagunares en México es la dinámica de la materia orgánica particulada o disuelta. Si bien los productores primarios consumen nutrientes fundamentalmente en forma inorgánica disuelta, la materia orgánica lábil representa un almacén temporal de dichos nutrientes, y este almacén suele ser mucho mayor que el contenido de nutrientes inorgánicos disueltos en la columna de agua. Por ejemplo, con base en datos recientes del contenido de fósforo orgánico lábil en los sedimentos de Bahía San Quintín Suarez [4] se puede calcular que mientras la columna de agua contiene alrededor de 8 ton de fosfatos, solo los dos primeros centímetros de la superficie de los sedimentos contienen 150 ton de fosfatos en forma orgánica lábil. Por esta razón, el proceso de descomposición de la materia orgánica en los cuerpos costeros someros desempeña un papel fundamental en la disponibilidad de nutrientes inorgánicos y, en consecuencia, en la productividad de dichos eco- sistemas. En el caso de la región NW del país, en varias lagunas costeras se ha determinado que si bien la producción primaria puede ser alta, durante primavera-verano la respiración de la comunidad puede ser aún mayor. Es decir, el metabolismo neto del ecosistema (mne = P − R, donde P es la producción primaria y R la respiración de la comunidad) en dichos sistemas es heterotrófico Suarez [4]. Esta observación es una prueba de que estos ecosistemas no solo reciben aportes de nutrientes inorgánicos disueltos desde el mar adyacente, sino que deben de recibir un subsidio de material orgánico que les per- mite mantener la condición heterotrófica neta.

Las lagunas costeras y estuarios se ubican entre los ecosistemas de mayor productividad, la cual depende de muchos factores, entre los que se encuentran la disponibilidad de luz y nutrientes para la comunidad fitoplanctónica. Estos factores a su vez, se ven modificados por los aportes fluviales y los intercambios mareales, los cuales alternarán su dominancia en función de las principales épocas climáticas que se presentan a lo largo del año. En las zonas de aguas abiertas de lagos y embalses, el fitoplancton constituye la base esencial de las tramas tróficas Ramírez [5], por lo que estos cuerpos de agua pueden considerarse como sistemas autótrofos, donde los componentes vegetales del plancton son capaces de acumular energía lumínica solar en forma de compuestos químicos energéticos gracias a la fotosíntesis Valdez [6]. El fitoplancton está sometido a una fuerte influencia estacional y en las zonas tropicales se pueden observar grandes contrastes entre las asociaciones de especies en las épocas de lluvias y de sequía Monreal *[7].*

El Municipio de Coyuca de Benítez está ubicado entre dos de los polos turísticos más importantes del Estado de Guerrero: Ixtapa-Zihuatanejo y Acapulco, formando así un corredor de localidades urbanas con un elevado potencial turístico, en la zona sur del Municipio, es dónde se concentra la mayor cantidad de asentamientos. La principal fuente de contaminación de la laguna es la contaminación del agua por descargas o infiltración de aguas residuales de origen doméstico provenientes del río Coyuca, el cual recibe las descargas de diversas comunidades como La Cabecera Municipal, Las Lomas y El Bejuco, además de la infiltración de agua residual que generan las viviendas, restaurantes y otros comercios y servicios localizados a lo largo de la Barra de Coyuca y Pie de La Cuesta y La Estación, principalmente. El uso de lanchas para la pesca deportiva y comercial también contribuye a la contaminación de esta laguna con detergentes, grasas y aceites. Existen niveles crecientes de contaminación en la Laguna de Coyuca; dónde se puede observar el florecimiento de lirio acuático a lo largo del sistema cómo un síntoma notorio. La situación actual indica que no existen sistemas completos de drenaje, ni un tratamiento adecuado de las aguas residuales, las cuales finalmente inciden en la contaminación de la Laguna de Coyuca (POET [8].

Justificación

La Laguna de Coyuca es un cuerpo de agua somero de volumen variable dependiente de las épocas de lluvias y estiaje. Es un sitio de alta biodiversidad, y una zona importante de anidación de aves, y hábitat para diferentes especies de mamíferos, reptiles, peces e invertebrados. Por otro lado como ecosistema costero, los manglares soportan una parte de la producción primaria de la laguna, formando además, un albergue de muchas especies de invertebrados como los moluscos y crustáceos, destacando el camarón y el ostión cuyo valor alimenticio y económico es alto. Además es, una importante generadora de empleo para los pescadores y prestadores de servicios turísticos de sus habitantes. Por la importancia de esta zona y la sensibilidad emanada de las presiones a las que está sometida se requiere de un análisis y una normatividad de mayor detalle a fin de contemplar las condiciones de fragilidad ambiental a las que está sujeta POET [8].

Objetivos

General:

Evaluar el comportamiento trófico del sistema considerando el balance nutrimental y apoyándose en organismos indicadores dela contaminación.

Particulares

1) Evaluar parámetros físicos y químicos a nivel superficie y fondo en siete puntos de muestreo en la Laguna de Coyuca de Benítez, Guerrero.

2) Considerar el Índice de Saprobiedad en cada punto de muestreo de la laguna de Coyuca de Benítez mediante el método de Pantle y Buck [9] y las listas de Sládecek [10] utilizando el fitoplancton como bioindicador.

3) Realizar un análisis estadístico univariado de cada parámetro a fin de conocer su comportamiento espacio-tiempo.

4) Realizar un análisis estadístico multivariado a fin de establecer la posible relación entre los parámetros en el sistema; además de establecer el posible comportamiento de la laguna mediante los sitios de muestreo.

Descripción del área de estudio

La Lagua de Coyuca de Benítez que forma parte de la Costa Grande, se sitúa en el Municipio del mismo nombre a una latitud 17°27'36'' - 16°46'48'' N y 100°28'48'' - 99°49'12'' W Longitud Delgadillo, [11].

Se extiende paralelamente al litoral de la bahía de Acapulco, tiene una longitud de 10 Kilómetros y una anchura máxima de 5 Kilómetros.

La profundidad máxima es de 10 m en la parte central Ramírez-Granados [12]; y desemboca al Oeste por un canal, formando así la barra de Coyuca. Se caracteriza por ser de boca efímera y estar separada del mar por una barrera de arena Yáñez-Arancibia [13], Leinweber [14] que separa a laguna del mar, ésta barra se abre frente a la desembocadura del Río Coyuca durante dos períodos al año por un canal de aproximadamente 10 m, aunque generalmente su apertura es inducida; este fenómeno tiene lugar cuando la laguna alcanza los máximos niveles, lo que sucede entre agosto-septiembre y entre noviembre-diciembre, pero la influencia marina en el canal adyacente a la boca de la laguna es escasa lo que determina condiciones oligohalinas en el área interna de la desembocadura.

Fase de campo.

Consistió en seis muestreos mensuales, dónde se seleccionaron siete sitios de muestreo a lo largo de la Laguna de Coyuca **(Fig. 1)** tratando de que éstos representaran las principales fuentes de contaminación de la Laguna, principalmente relacionadas a actividades antropogénicas, además de que algunos sitios se diferencian en su dinámica ya sea por la batimetría o relacionado a la cercanía o lejanía con el agua proveniente del mar. Durante los seis meses y en cada Sitio de muestreo a nivel de superficie y fondo se determinaron parámetros físicos y químicos *in situ,* con el uso de Disco de Secchi (Profundidad y Transparencia) multiparamétrico HANNA HI9828 (Temperatura, pH, DO, TSD). Y se tomaron muestras de agua mediante el uso de botella Van Dorn para evaluar los parámetros químicos en laboratorio, así como para el análisis cualitativo y cuantitativo de fitoplancton.



Figura 1.Ubicación de los sitios de muestreo. Imagen tomada de INEGI (2014).

Fase de laboratorio.

Se determinó la DBO_5 mediante el método de la *NMX-AA-028-SCFI-2001;* Demanda Química de Oxígeno se llevó a cabo mediante el método de reflujo cerrado de la *NMX-AA-030-SCFI-2001.* Así como los siguientes parámetros químicos NO_3^-, NH_4^+, NH_3, PO_4^{3-}, SO_4^{2-}, utilizando el multiparámetro fotométrico marca Hanna mod. HI83200.

Fase de gabinete

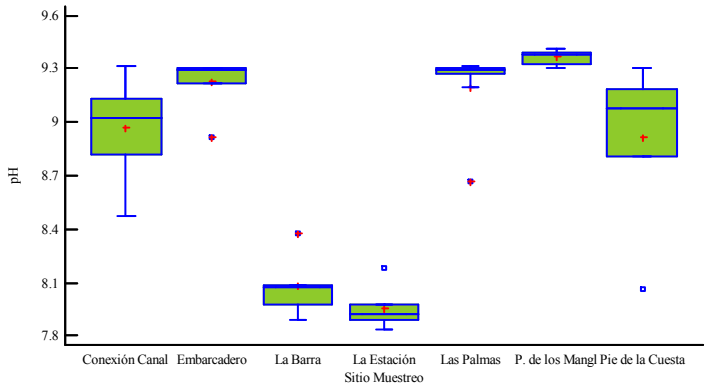
Primeramente, en el análisis exploratorio a los datos obtenidos se les realizó la prueba de Kolmorogov-Smirnov a fin de conocer su normalidad. Los resultados mostraron que los datos tienen un

Comportamiento no normal, por lo que se les ejecutaron pruebas no paramétricas al conjunto de datos. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el paquete estadístico Stathgraphics Centurión XVII.

RESULTADOS

Dentro de los resultados se obtuvo una profundidad promedio durante los meses de muestreo de 3.12 m; el mínimo fue de 1.35 m, el cual corresponde al mes de Abril en el Sitio Conexión Canal; el valor máximo fue de 10.0 m en Sitio el Embarcadero en el mes de Marzo. La profundidad tuvo un comportamiento homogéneo y no mostró diferencias significativas durante los seis meses de muestreo puesto que P=0.764875; (P≥0.05 KW); La transparencia tuvo un promedio 49.47 ± 34.65 el valor mínimo fue de 10 en el mes de Mayo en el Sitio La Estación, el valor máximo fue de 200 en el sitio La Barra en el mes de Enero. Espacialmente éste parámetro mostró diferencias significativas (P=0.0023) (P< 0.05 KW). Por un lado, los valores en los Sitios La Barra y La Estación mostraron rangos más amplios y los otros Sitios mostraron valores con un rango menor. Por nivel mostró un comportamiento heterogéneo con diferencia estadísticamente significativa (P= 0.0008; P< 0.05 KW); pH tuvo un promedio de 8.73 ±0.52; el valor mínimo fue de 7.84 en el Sitio La Estación a nivel Superficie en el mes de Febrero y el máximo fue de 9.41 en el Sitio Paraíso de los Mangles a nivel Superficie en el mes de Enero.

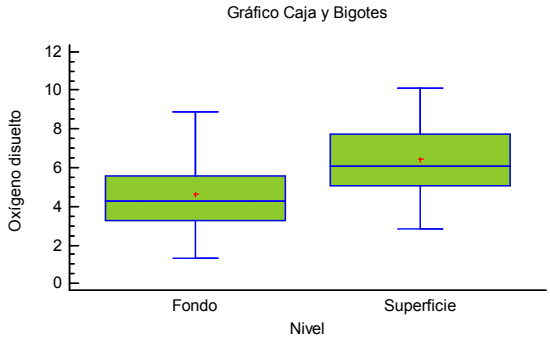
Por sitio de muestreo (P= 0.00002) (P< 0.05), existe diferencia estadísticamente significativa. En éste gráfico se observa que los rangos de cada Sitio son pequeños, sin embargo difieren notablemente sus valores. Por un lado se encuentran los Sitios La Barra y La Estación con un pH de alrededor de 8.0 y por otro lado se encuentran Embarcadero, conexión Canal, Palmas, Paraíso de los Mangles y Pie de la Cuesta con pH de 9.2. Por nivel el pH tiene un comportamiento heterogéneo, dónde el rango de valor es menor a nivel fondo y es más amplio a nivel superficie (P = 0.0336; P< 0.05) existe una diferencia estadísticamente significativa (graf.1).



Gráfica. 1: comportamiento espacial del pH.

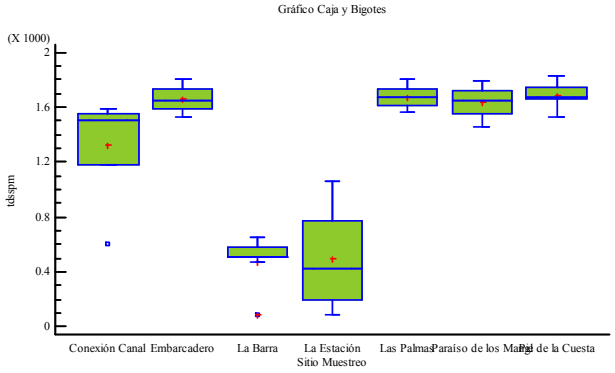
El Promedio mensual del Oxígeno Disuelto (DO) fue de 5.53 7± 2.11, con un valor máximo de 10.07 (mg/L) en el Sitio Paraíso de los Mangles a nivel Superficie en el mes de Abril y el valor mínimo fue de 1.31 (mg/L) en el Sitio El Embarcadero a nivel Fondo en el mes de Mayo. La prueba entre las medianas de los meses de muestreo mostraron una diferencia significativa (P= 0.0013); (P< 0.05); dónde se puede observar el incremento del OD del mes 5 de Enero al mes de Abril y posteriormente un ligero descenso en los meses de Mayo-Junio. se puede observar un comportamiento heterogéneo entre la

concentración de datos en cada Sitio de muestreo, por un lado un grupo formado por los sitios La Barra, Estación y Pie de la Cuesta, dónde el rango de valores es menor y otro grupo formado por conexión Canal, Embarcadero, Las Palmas y Paraíso de los Mangles cuyo rango de valores es más amplio. Por nivel existe diferencia estadísticamente significativa (P=0.0001); (P< 0.05). Dónde se puede observar que los valores en Superficie son considerablemente más altos que en el grupo de datos del nivel fondo. (Graf: 2).



Gráfica: 2 comportamiento en los niveles (sup. Fondo).

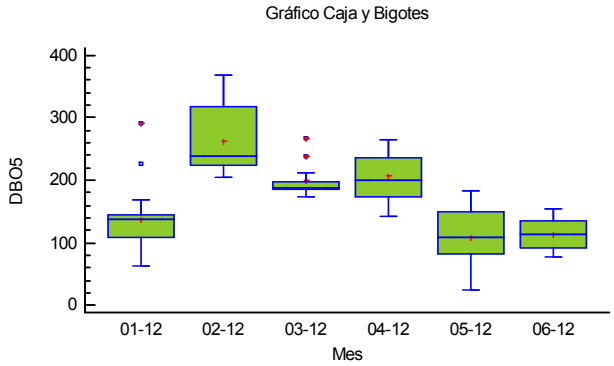
El promedio mensual de Sólidos Totales Disueltos (TDS) fue de 1233.93 ± 535.93, el valor mínimo fue de 10.0 en Paraíso de los Mangles a nivel fondo en el mes de Mayo, y el máximo de 1824.0 en Pie de la Cuesta a nivel Superficie igualmente en el mes de Mayo. El comportamiento mensual fue homogéneo sin diferencia estadísticamente significativa entre las medianas (P=0.3760; P ≥0.05 KW). Por sitio de muestreo se tuvo un comportamiento heterogéneo con diferencia estadísticamente significativa (P=0.00005; P< 0.05), dónde se observan dos comportamientos el primero formado por La Barra y La estación cuyas medianas están debajo de 0.6 y otro formado por Conexión Canal, Embarcadero, Las Palmas, P. de los Mangles y P. de la Cuesta cuyas medianas son mayores a 1.5. (Graf: 4).



Gráfica: 4 comportamiento espacial de los SDT.

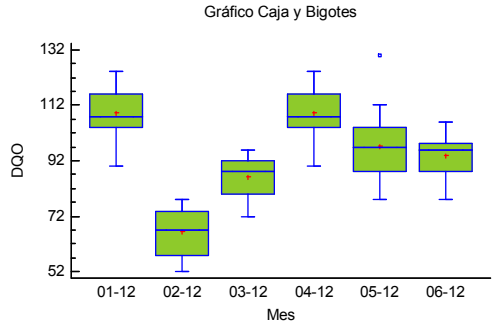
La Demanda Bioquímica de Oxígeno (BOD_5) tuvo un promedio de 169.36±70.25 mgL^{-1}, el valor mínimo fue de 25.3 mgL^{-1} en La estación a nivel Superficie en el mes de Mayo y el valor máximo fue de 366.86 mgL^{-1} en el sitio Las Palmas a nivel fondo en el mes de Febrero. El comportamiento por mes fue

heterogéneo con diferencia estadísticamente significativa (P= 1.5245-10 ; P< 0.05), por un lado destaca Febrero con un rango amplio y con una mediana arriba de 200 y por otro los otros cinco meses con valor igual o menor a 200 y con rangos menores en cada mes. Por sitio de muestreo mostró un comportamiento homogéneo sin diferencia estadísticamente significativa (P=0.8533; P ≥0.05 KW) , dónde se observa un rango amplio en casi todos los Sitios, a excepción de La Barra, y dónde las medianas se comportan más o menos uniformes. (Graf: 5).



Gráfica: 5 comportamiento temporal de la DBO.

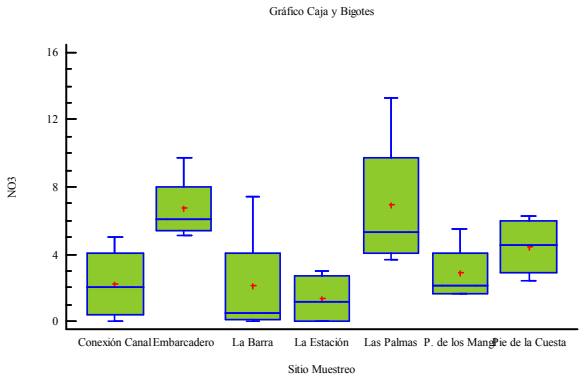
El promedio de Demanda Química de Oxígeno (DQO) fue de 94.41 ± 17.19 mgL^{-1}, con un mínimo de 52.0 mgL^{-1} en Las Palmas a nivel Superficie en el mes de Febrero y un máximo de 130.0 mgL^{-1} en La Estación fondo en el mes de Mayo. La DQO tuvo un comportamiento heterogéneo por mes con una diferencia estadísticamente significativa (P=8.37407-11; P< 0.05). Con valores más altos en Enero y Abril (arriba de 100 mgL^{-1}) y con valores menores a 100 mgL^{-1} en los cuatro meses restantes. (Graf: 6).



Gráfica: 6 comportamiento temporal de la DQO.

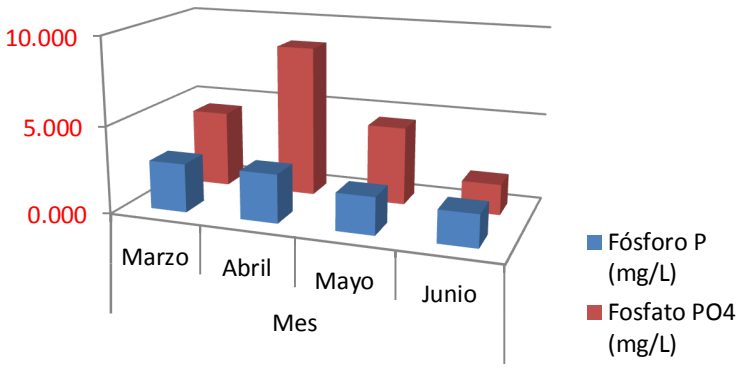
El Amonio (NH_4) tuvo un promedio mensual de 0.6086 ± 0.4532 mgL^{-1}, dónde el valor mínimo fue de 0.2 mgL^{-1} en el Sitio La Barra a nivel Superficie en el mes de Junio y el valor máximo fue de 2.12 mgL^{-1} en el sitio Las Palmas a nivel fondo en el mes de Abril. El comportamiento por mes fue heterogéneo con diferencia estadísticamente significativa (P=0.0062;P< 0.05), dónde destaca Abril con un rango de valores mayor y con mediana cerca de 0.8 mgL^{-1} al igual que Febrero; contrario a Marzo, Mayo y junio con medianas cerca de 0.4 mg/L.

El promedio mensual de Nitrato (NO_3^{-}) de fue de 3.9067 ±,3.7771 mgL^{-1}, dónde el valor mínimo fue de 0.0 mgL^{-1} en La Barra a nivel fondo mes de Junio y Abril, en la Estación a nivel de superficie, Conexión Canal a nivel fondo, Paraíso de los Mangles , Embarcadero, las palmas fondo en el mes de Abril, La Barra nivel fondo en Marzo, la Estación , Conexión Canal a nivel superficie en el mes de Marzo y Paraíso de los Mangles a nivel fondo en el mes de Marzo; por otro lado el valor máximo fue de 15.8 mgL^{-1} en el sitio La Estación a nivel fondo en el mes de Marzo. El comportamiento por mes fue heterogéneo con diferencia estadísticamente significativa entre las medianas (P= 0.00801; P< 0.05 KW) los rangos de cada mes fueron descendiendo de Marzo a Junio, las medianas se mantienen debajo de 4 mgL^{-1}, a excepción de Marzo cuya mediana se encuentra arriba de 5 mgL^{-1}. Espacialmente el NO_3 se comportó de manera heterogénea con diferencia estadísticamente significativa (P=0.0377; P< 0.05 KW); dónde se pueden observar dos grupos, el primero formado por dos Estaciones, Embarcadero y Las Palmas dónde sus medianas se encuentran por encima de 5 mgL^{-1}. (Graf. 7).



Gráfica: 7 comportamiento espacial de los nitratos.

Los PO_4 tuvieron un promedio general de 5.3052 ± 3.6925 mgL^{-1}, dónde el valor mínimo fue de 0.09 mgL^{-1} en La Barra a nivel fondo en el mes de Junio, y el valor máximo de 12.4 mgL^{-1} en Las Palmas a nivel fondo durante el mes de Febrero. Por mes tuvo un comportamiento heterogéneo, con diferencia significativa entre las medianas (P=0.000003; P< 0.05 KW), cómo se puede apreciar en la gráfica (8), los rangos de los valores son amplios y dónde destacan principalmente Abril con una mediana alrededor de 9 mgL^{-1}.



Gráfica 8 comportamiento estacional de los PO^4.

CONCLUSIONES

1.- Los parámetros físicos y químicos mostraron un comportamiento diferencial, según el punto de monitoreo. Específicamente los nutrimentos y el oxígeno disuelto.
2.- los Nitratos presentan mayor concentración en la desembocadura de los ríos.
3.- La concentración de los fosfatos y Fosforo Total son elevadas sobre todo donde hay hay actividad antropogénica.
4.-Por la importancia de esta zona y la sensibilidad emanada de las presiones a las que está sometida se requiere de un análisis y una normatividad de mayor detalle a fin de contemplar las condiciones de fragilidad ambiental a las que está sujeta (POET Coyuca de Benítez).
5.-El sistema sigue presentando características mesotróficas.

REFERENCIAS

[1] Lankford, R., 1977. Coastal lagoons of México: Their origin and classification. En: M.Wiley (ed). *Estuarine Processes, Circulation, Sediments and Transfer of Materials in the Estuary*. Academic Press, Inc., Nueva York, 182-215.

[2] Contreras, F. 1993. Ecosistemas costeros mexicanos. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad y Universidad Autónoma Metropolitana. México, D.F. 415 pp.

[3] Ortiz Pérez, M.A., y G. de la Lanza Espino. 2006. *Diferenciación del espacio costero de México: un inventario regional*. Geografía para el Siglo XXI, Serie Textos Universitarios, Instituto de Geografía, UNAM.

[4] Suárez J. M. (2005) Flujos de material suspendido y disuelto entre el estero "El Conchalito" y la laguna "Ensenada de La Paz", B. C. S., Tesis de Maestría. México.

[5] Ramírez, R. 1988. Laguna de Coyuca de Benítez, Guerrero, un sistema de estudio integrado. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de México, México D.F. 64 pp.

[6] Valdez J., 1994.Variaciones diarias de temperatura, salinidad, oxígeno disuelto y clorofila a, en una laguna hipersalina del Golfo de California. En: Ciencias Marinas, 20(2):123-137

[7] Monreal, P. A. 1991. Evaluación de la concentración de la clorofila *a* fitoplanctónica estacional en la laguna de Coyuca de Benítez. Guerrero, utilizando técnicas hidrobiológicas y de percepción remota. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 175 pp.

[8] Programa de Ordenamiento Ecológico y Territorial del Municipio de Coyuca de Benítez, Julio 2009, EURA Espacio urbano y Arquitectura, S. C

[9] Pantle. R. y Buck. H. 1955. Die biologische Überwachung der Gewässer und die darstellung der Ergebnisse. *Gas und Wasserfach.* 96:604.

[10] Sládecek V., 1973. System of Water Quality from Biological Point of View. Arch. Hydrobiol. Beith. 71. 218 pp.

[11] Delgadillo, E.A. 1986. Evaluación de la materia orgánica particulada en la laguna de Coyuca de Benítez, Gro. Durante el ciclo otoño 1983-verano 1984 y su relación con Percepción remota. Tesis de Licenciatura Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F, México. 82 pp.

[12] Ramírez E. 1988 Laguna de Coyuca de Benítez, guerrero un sistema de Estudio integrado. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. México. D.F. 67 pp.

[13] Yáñez-Arancibia, A. 1986. Ecología de la Zona Costera, análisis de siete tópicos. A. G. T. Editor, S.A. 171 pp.

[14] Lein weber, P., B. L. Turner and R. Meissner, 2002. Phosphorus. In: Agriculture, Hydrology and Water Quality, Haygarth, P.M. and S.C. Jarvis (Eds.). CABI Publ., Wallingford, UK. 29-55.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

ZONING BY DENSITY AND BASAL AREA IN A NANOBASIN IN THE "LAS ANIMAS" RIVER WITHIN THE PROTECTION AREA OF FLORA AND FAUNA "LA PRIMAVERA", JALISCO (MEXICO) BY USING gvSIG.

(Zonificación por densidad y área basal en nanocuenca del Arroyo Las Ánimas dentro del APFF La Primavera, Jalisco (México) mediante el uso de gvSIG)

Violeta B. Castañeda Robles*[a], Ana Karen Reyes Salazar[a*], Ubaldo Zaragoza Araujo[a], J. Germán Flores Garnica[b], José Luis Zavala Aguirre[c+].

[a] Biology School, Universidad Autónoma de Guadalajara.

[b] National Institute of Forestry, Agriculture and Livestock Investigation "INIFAP" (Spanish).

[c] Hidrobiology and Ecotoxicology laboratory. Universidad Autónoma de Guadalajara.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: joseluis.zavala@mail.uag.mx

Área del Conocimiento: Conservación de Ecosistemas.

ABSTRACT
The kind of studies that have been developed in the Primavera Forest (APFFBLP) are mainly of the floristic and faunal type. Nevertheless there haven´t been localized ecological studies about forest productivity or nutrient dynamics in soil. In order to start with the characterization of the site, in the present study, it was evaluated the tree cover by the criteria of density and basal area, in the nanobasin "El Chal" which belongs to the Las Animas river, in the governmental administration area. In the first place, the zone of study was delimited by the location of the watershed using altitudinal criteria. The subdivision of the area into quadrants of 50 x 50 meters, was achieved using the Google Earth platform by generating a grid with equidistant UTM coordinates. In the center of each of the 119 resulting quadrants, located by GPS, it was made a lifting of the density and diameter at breast height of the specimens inside a 100m2 area circumference. Data were processed in Excel spreadsheet and converted to dot shape file formby using the ARCsig tool. The interpolation of discrete data to obtain continuous data surfaces by the method of Kriging (raster), zoning, and subsequent vectorization, were made by the GVsig tool. The studying area consists in a 24 hectare estate in which 5 tree species were detected; from the genus: *Pinus, Quercus* and *Clethra*. In the quadrants, there were found ranges of density and basal area, from 0 to 22 specimens by m2 and from 0 to 131 dm2, respectively; with which it proceeded to generate zoning maps useful for the elaboration of stratified random sampling for ecological interest.

Keywords: Forest zoning; density; basal area; gvSIG.

GENETIC DIVERSITY ANALYSIS IN NATIVE HELICONIAS FROM THE SOUTHEAST REGION OF MEXICO

(Análisis de diversidad genética en heliconias nativas del sureste de México)

Sergio Olvera[a*], Moisés Cortés-Cruz[a+], Aremi Contreras-Toledo[a], Simitrio Ortiz Curiel[b], Carlos Avendaño-Arrazate[b], Aída Olivera de los Santos[b], Jorge Canul Ku[c] and Manuel Grajales Solis[b]

[a]Centro Nacional de Recursos Genéticos-INIFAP/ Boulevard de la Biodiversidad No. 400, Tepatitlán de Morelos C.P. 47600, Jalisco
[b]Campo Experimental "Rosario Izapa"-INIFAP, Km. 18 de la Carretera Tapachula-Cacahoatán, Tuxtla Chico C.P. 30870, Tuxtla Chico, Chiapas
[c]Campo Experimental "Zacatepec"-INIFAP, Km. 5 Carretera Zacatepec-Galeana, Col. Centro, Zacatepec, Morelos

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: cortes.moises@inifap.gob.mx

Área del Conocimiento: Conservación de Ecosistemas.

ABSTRACT
The *Heliconia* L. genus is a group of ornamental species that is gaining international relevance as fresh cut flower, because of its bracts morphology and color. There are about 220 species reported, most of them native to Colombia while 16 species have been reported in Mexico. *Heliconia* species have very subtle differences, which have caused problems in their identification. Although taxonomic information is available, information regarding diversity studies, characterization and genetic improvement is still lacking. The use of molecular tools, such as microsatellites, could be used as an option to generate basic information on these subjects, and contribute to the correct taxonomic identification, conservation strategies and breeding schemes development. The aim of the present study was to analyze the genetic diversity within and among 22 Heliconia populations. Basic genetic parameters and the genetic structure were calculated using GenAlEx 6.5 and STRUCTURE 2.3.4 software, respectively. Phylogenetic relationships were identified and computed based on the Neighbor-joining (NJ) methodology using the MEGA 5.2 software. Our results identified 76 alleles, with an average of 3.4 alleles per locus. Nei´s genetic diversity index was low in all populations, with a value of 0.16 and 35.8% polymorphism. The population structure was determined by the *K* value = 19. The N-J showed associations for each population but undetermined relationships for the same specie populations. Genetic structure and N-J results are in agreement, confirming the identified relationships. This is the first report in which microsatellites have been used to analyze genetic diversity among different *Heliconia* species.

Keywords: *Heliconia* genus; microsatellite; genetic diversity; population structure.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

THE CURRENT ECOLOGICAL FRAGILITY OF THE WATERSHED OF LAKE CAJITITLAN AND ITS RELATION TO LAKE CHAPALA

(La fragilidad ecológica actual de la microcuenca del Lago de Cajititlán y su relación con Lago de Chapala)

Alejandro Brena Becerril[a, b*], Luz Adriana Vizcaíno Rodríguez[a,b], Juan Luis Caro Becerra[a,b], Ramiro Lujan Godinez[a,b], Luis Manuel Martínez, José Guadalupe Michel Parra[b], Irma Guadalupe López Muraira[b], Felipe de Jesús Iñiguez[a,b]

[a] Member of the Environment and Sustainable Development faculty of UPZMG
[b] Member of the Environmental Committee of Technological Education System Jalisco (CASETEJ)

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: abrenabe@gmail.com

Área del Conocimiento: Conservación de Ecosistemas.

ABTRACT
The massive fish kills and cyclical in Lake Cajititlán in recent years has highlighted the severity of the conditions of ecological balance of this body of water, the crisis as ecosystem stability and fragility of his health . This is due to increased pollution from uncontrolled dumping sewage and lack of decisive action by the different levels of government and the refusal to accept such a reality that for the inhabitants of the banks is obvious and clear: increasingly strong odor, the green colored lake, the loss of species and the recent massive fish kills from lack of oxygen. They succeeded at last, to the scandal of more than 200 tons of dead fish in September and October 2014, state authorities recognize is pollution and lack of control over discharges into the lake, runoff of agrochemicals and other pollutants the causing the serious state of the lake. Before this the UPZMG and the newly formed Environmental Committee of Technological Education System of the State of Jalisco (CASETEJ) based on technical studies conducted separately by different institutions decided to request the intervention of the Government to declare a RAMSAR site Lake and avoid still used as a municipal sewer. The results are clear lack oxygen to water, competition between fish, algae and organic matter degraders. We intend to continue monitoring studies and action to save the lake, since not act now, then it will be too late. The immediate strategy is to propose and take corrective actions and technical methodology is the one that asks the International RAMSAR sites and specific studies conducted under the Official Mexican Standard. Supported by the experience of what was done before in RAMSAR Chapala and Rio lagoon Zapotlán Ayuquila in Jalisco sites. With the work, research and joint actions aim to complement studies, monitor and help save the lake together with Chapala, are nature's kidneys and could be best areas for recreation and tourism for Jalisco.

Keywords: Lake Cajititlán; Pollution of water body; Ramsar site, CASETEJ.

RELATION BETWEEN EUTROPHICATION LEVELS AND MICROALGAE PRESENCE IN EL TUNAL AND DURANGO RIVERS

(Relación entre niveles de eutrofización y presencia de microalgas en los ríos el Tunal y Durango)

María Guadalupe Sánchez-Martínez [a], María Elena Pérez-López[a*+], Araceli Loredo Treviño[a], María Guadalupe Vicencio de la Rosa[a].

[a] Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (IPN CIIDIR) Unidad Durango

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: maelena0359@gmail.com

Área del Conocimiento: Conservación de Ecosistemas.

ABSTRACT
This work determined the relationship between the levels of eutrophication and presence of diverse microalgae groups in El Tunal and Durango Rivers. To achieve this, in three seasons, seven points were evaluated. These points were selected due to the discharges of wastewater that the river received and in each one of them water samples were taken with an interval of 15 minutes between them. Parameters were evaluated at 30 cm deep *in situ* and were temperature, dissolved oxygen and saturation percentage. In laboratory, pH, electric conductivity, ammonia nitrogen, nitrates, nitrites, phosphates and fecal coliforms were determined. With this information and using Pesce & Wunderlin ecuation, the Trophic State Index (TSI) was obtained as well as water quality index (WQI) for aquatic life. Also, types and abundance of different microalgae were determined. A canonic correspondence analysis (CCA) was used to stablish correlation between physicochemical data and algae groups. We found significant difference between sites and seasons for every parameter evaluated. Using the TSI, two sites were classified as eutrophic; two as mesotrophic and the rest was oligotrophic according to phosphorous, nitrate and ammonia nitrogen content. WQI confirmed that two eutrophic sites were less suitable to development of aquatic life. The most representative algae groups during both seasons were diatoms, followed by Chlorophytes, Cyanophytes, Euglenophytes and Cryptophytes. The CCA showed that Cyanophytes and Euglenophytes were related with high quantities of phosphates and ammonia, while Chlorophytes and Cryptophytes were affected by temperature and pH rising, respectively. Bacillariophytes were insensitive to physicochemical changes recorded. With this information we found that sites that received wastewater discharges besides of having mesotrophy or eutrophy problems, presented abundance of toxic Cyanophytes, which are a danger to fauna, cattle and people that use water from these rivers. Further work is needed to stablish the relationship between this toxic algae and environmental characteristics needed to produce a dangerous bloom.

Keywords: Cyanophyte, water quality.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

CAPACITY OF DEPREDATION OF CHRYSOPIDAE SPECIES ASSOCIATED TO *Diaphorina citri* KUWAYAMA IN CITRUS IN SINALOA, MEXICO

(Capacidad de depredación de especies de Chrysopidae asociadas a *Diaphorina citri* Kuwayama en cítricos en Sinaloa, México)

Edgardo Cortez-Mondaca[a], José Isabel López-Arroyo[b], Mara Patricia Partida-Valenzuela[c], Jesús Pérez-Márquez[c+*].

[a] INIFAP-C.E. Valle del Fuerte, Km. 1609, carret. México-Nogales, Juan José Ríos, Sinaloa, México.
[b] INIFAP-C.E, General Terán. General Terán, Nuevo León, Méx.
[c] Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Sinaloa, Km.17.5, carret. Culiacán-Eldorado, Culiacán, Sin. [4]INIFAP-C.E. Valle de Culiacán. Km 17.0, carret. Culiacán-Eldorado, Culiacán, Sinaloa.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: marquez.jesus@inifap.gob.mx

Área del Conocimiento: Control Biológico.

ABSTRACT
The aim of the study was to evaluate the ability of predation of species Chrysopidae on egg, small nymphs (N1 + N2) and large nymphs (N4 and N5) of the Asian Citrus Psyllid. *C. comanche* and *C. rufilabris* showed higher predation capacity of egg, small nymphs and large nymphs during the first six hours of exposure the predator, however, in the last reading of predation, at 24 h, all lacewing species presented a similar consumption (p> 0.05), about 100 specimens per predator. The consumption of egg and small nymphs was faster than that of large nymphs. These results support the use of *C. comanche* and possibly *C. valida* for the biological control of *D. citri* in Sinaloa and is suggested for the rest of Mexico, before validating the results shown here, since in the country there is at least a laboratory reproduction of beneficial insects in each state and in most reproduced any kind of *Chrysoperla*.

Keywords: Biological control, Predation, *Chrysoperla, Ceraeochrysa,* ACP.

RESUMEN
El objetivo del estudio fue evaluar la capacidad de depredación de especies de Chrysopidae asociadas al psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri* Kuwayama sobre las etapas de huevo y ninfas en huertas comerciales, en el estado de Sinaloa, México. *Chrysoperla comanche* y *C. rufilabris* mostraron mayor capacidad de depredación de inmaduros: huevos, ninfas chicas (ninfa 1 y ninfa 2) y ninfas grandes (ninfa 4 y ninfa 5) de *D. citri* durante las primeras seis horas de exposición de las presas al depredador. Sin embargo, en la última lectura de depredación, a las 24 h, todas las especies de crisopa presentaron un consumo prácticamente similar (p> 0.05), de alrededor de 100 especímenes por depredador. El consumo de huevo y ninfa chica fue mayor que el de ninfas grandes, entre más pequeña fue la presa la velocidad y capacidad de consumo fue mayor. Con estos resultados se sustenta el empleo de *C. comanche* y posiblemente *C. valida*, para el control biológico de *D. citri* en el estado de Sinaloa y se sugiere para el resto de México, validando previamente los resultados aquí mostrados, toda vez que en

el país existe al menos un laboratorio de reproducción de insectos benéficos en cada entidad estatal y en la mayoría se reproducen alguna especie de *Chrysoperla*.

Palabras Clave: Control biológico, depredación, *Chrysoperla, Ceraeochrysa,* ACP.

INTRODUCCIÓN

En México se ha impulsado el manejo integrado del psílido asiático de los cítricos (PAS) *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), vector del Huanglongbing (HLB), a través del control químico para eliminar sus poblaciones y el control biológico mediante la liberación masiva de *Tamarixia radiata* (Waterston) (Hymenoptera: Eulophidae), el principal enemigo natural de *D. citri* [1, 2, 3, 4]. En el país existen dos centros de reproducción de éste parasitoide y aunque mantienen una producción considerable, es insuficiente para satisfacer el requerimiento de las mismas regiones citrícolas en donde se producen (Península de Yucatán y región limonera del Pacífico). Por otra parte, existen numerosos depredadores que atacan poblaciones de *D. citri*; los más abundantes son especies de crisopas de los géneros *Chrysoperla* y *Ceraeochrysa*, además de coccinélidos [5, 6] como la catarinita gris *Olla v-nigrum* (Mulsant), señalada por presentar un elevado potencial para suprimir poblaciones de PAS [1]. El objetivo del presente estudio fue evaluar la capacidad de depredación de especies de Chrysopidae sobre huevo, ninfas chicas y ninfas grandes del psílido asiático de los cítricos.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en condiciones de laboratorio, en el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP)-Campo Experimental Valle del Fuerte (CEVAF), los meses de julio y agosto de 2011. Se realizaron siete pruebas de depredación: cuatro con huevos, una con ninfas chicas y dos con ninfas grandes.

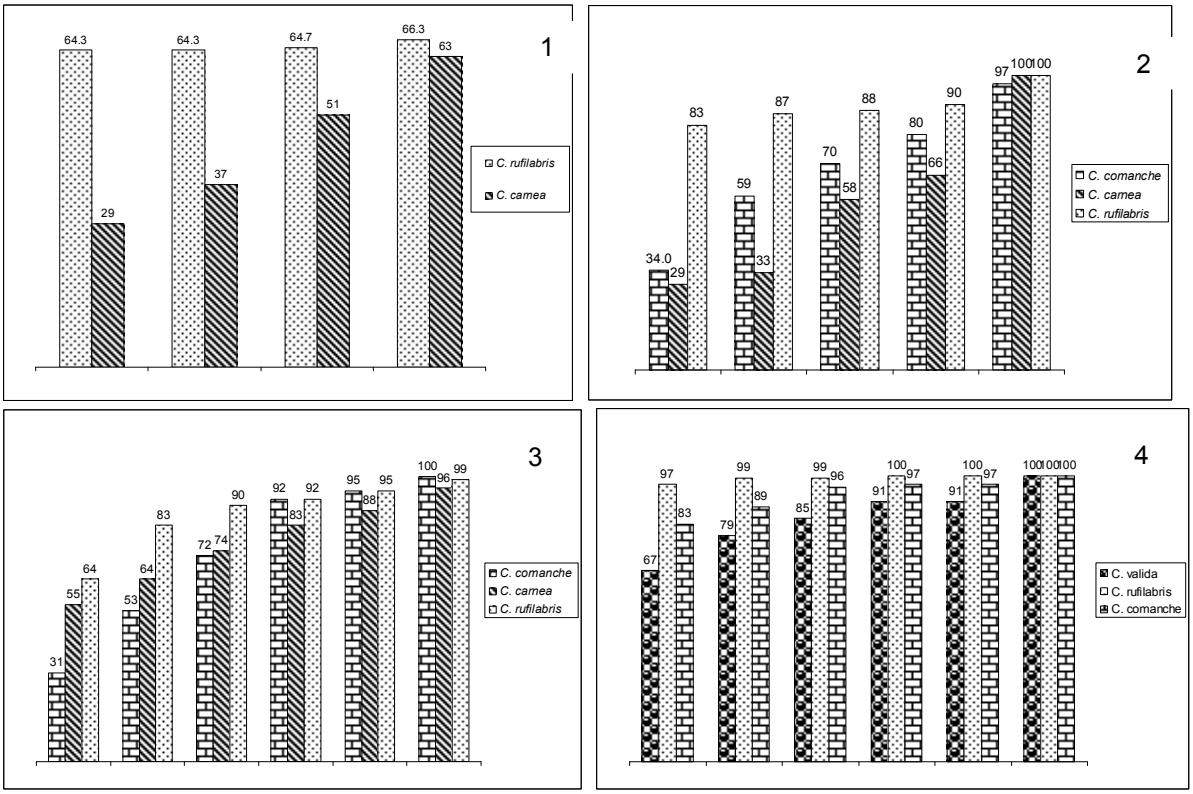
DEPREDADORES. Se evaluaron larvas de segundo instar de especies de crisopa en existencia en el Laboratorio de Cría de Insectos Benéficos, perteneciente a La Junta Local de Sanidad Vegetal del Valle del Carrizo, obtenidas del pie de cría de adultos capturados en huertas comerciales de cítricos del norte y centro de Sinaloa [9].

PRESAS. Se recolectaron brotes tiernos altamente infestados con el PAS, de cinco a 10 cm de longitud, en árboles de huertas comerciales de cítricos y en árboles de traspatio en casa habitación, generalmente de limón mexicano, para obtener inmaduros del PAS y se contabilizaron, para establecer un número determinado de ellos en cada brote. Los estados de desarrollo diferentes a los objeto de evaluación se eliminaron con una aguja entomológica, dejando sólo especímenes de la edad que se deseaba evaluar en cada prueba. Los brotes con 100 ejemplares de *D. citri* por lo general, se colocaban en una caja de Petri de plástico, de 13 cm de diámetro, y se exponían a una larva de segundo instar, previamente aislada y sometida a ayuno durante 24 h [10]. La larva fue colocada directamente sobre los brotes que contenían las presas, después, en diferentes intervalos de tiempo en horas se inspeccionaban al microscopio, para contabilizar el número de especímenes sobrevivientes [huevos, ninfas chicas o ninfas grandes] y por diferencia se obtenía el número de ejemplares consumidos.

Para cada especie de depredador y etapa de la plaga se establecieron cuatro repeticiones de la prueba. Los resultados se sometieron por separado en un ANVA de una vía y a los promedios se les aplicó la prueba de Tukey (5%) [11].

RESULTADOS

En la evaluación de la capacidad de depredación de *C. carnea*, *C. rufilabris*, *C. comanche* y *C. valida* sobre huevos de *D. citri* no se detectó diferencia significativa entre tratamientos (*P*> 0.05); sin embargo, en todas las pruebas *C. rufilabris* mostró mayor consumo de presas en las primeras horas de exposición, después de cinco o seis horas ya había consumido el 90% o más de los huevos disponibles (Fig. 1). En la segunda prueba, *C. comanche* consumió más que *C. carnea* en las primeras cuatro lecturas de depredación (Fig. 2); en la tercera evaluación *C. carnea* consumió más huevo en las primeras tres lecturas de depredación (Fig. 3). En la última evaluación de depredación de huevo, al igual que *C. rufilabris*, *C. comanche* depredó más que *C. valida* en las primeras cinco lecturas (Fig. 4). En las pruebas dos, tres y cuatro, las tres especies evaluadas consumieron el total de huevos de *D. citri* antes o a las 24 h de exposición (Figs. 2, 3 y 4).



Figuras 1, 2, 3 y 4.- Consumo de huevos de *Diaphorina citri* por especies de crisopa de pies de cría provenientes de huertas de cítricos.

En la única evaluación sobre ninfas chicas con *C. rufilabris, C. comanche* y *C. valida,* se obtuvo diferencia significativa (*P* < 0.001) en las primeras cinco lecturas de depredación: en la primera y tercera hora de exposición de las presas (1 y 4 h) *C. comanche* consumió mayor número de ninfas que *C. rufilabris* y *C. valida;* en la segunda y quinta lectura (3 y 6 h) *C. comanche* depredó más que *C. valida*; en la cuarta lectura (5 h) *C. comanche* y *C. rufilabris* consumieron más ninfas que *C. valida.* Para las 5 h de exposición *C. comanche* consumió casi los 100 ejemplares de *D. citri.* Las tres especies depredaron el total de ninfas chicas antes de completar el periodo de exposición de 24 h (Fig. 5).

En la primera prueba de capacidad de alimentación de *C. rufilabris, C. comanche* y *C. carnea* sobre ninfas grandes de *D. citri*, no se detectó diferencia significativa las lecturas de depredación. El consumo de *C. rufilabris* fue mayor en las primeras cuatro lecturas (1, 2, 3 y 5 h); entre *C. comanche* y *C. carnea* la diferencia de consumo fue reducida, aunque en todas las lecturas fue mayor para la primera e incluso mayor que para *C. rufilabris* en la lectura de las 24 h. A 24 h de exposición todas las especies consumieron más de 90 ninfas grandes de *D. citri* en promedio (Fig. 6). En la segunda prueba, con evaluación de *C. rufilabris, C. comanche, C. carnea* y C. *valida, s*e observó diferencia significativa entre tratamientos ($P < 0.001$), de *C. comanche* respecto a *C. valida* en la primera lectura y a las 24 h de exposición entre *C. rufilabris* y *C. valida;* en ambos casos no existió diferencia entre el resto de los tratamientos. *C. comanche* consumió mayor cantidad de presas durante las primeras cinco lecturas (1, 2, 5, 6 y 7 h) que *C. valida* y *C. carnea*. En tanto que *C. rufilabris* consumió más presas que *C. valida* en las primeras dos lecturas y que *C. carnea* en la primera lectura (Fig. 7).

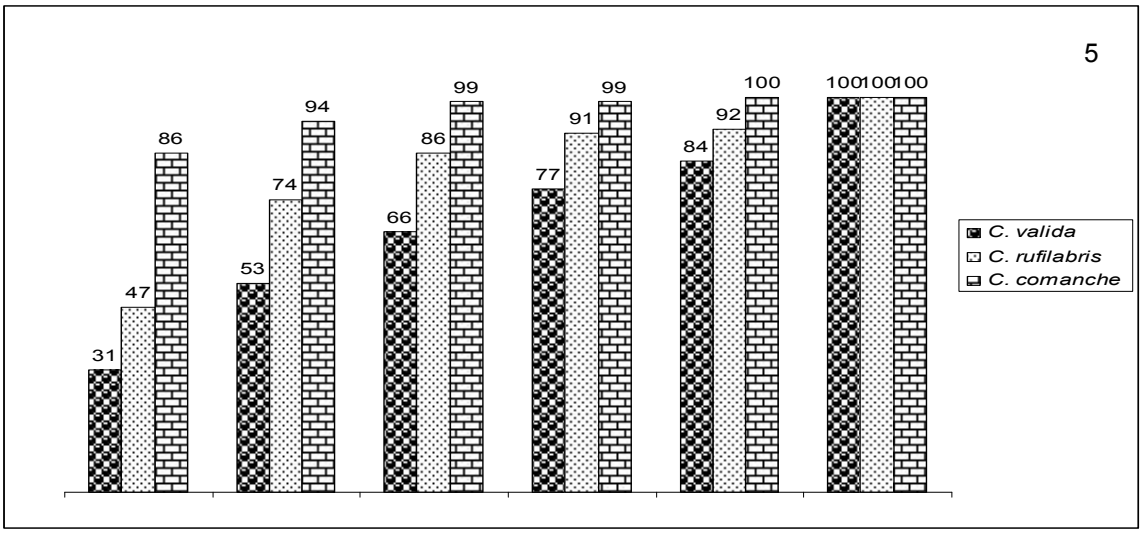


Figura 5.- Consumo de ninfas chicas de *Diaphorina citri* por especies de crisopa de pies de cría provenientes de huertas de cítricos.

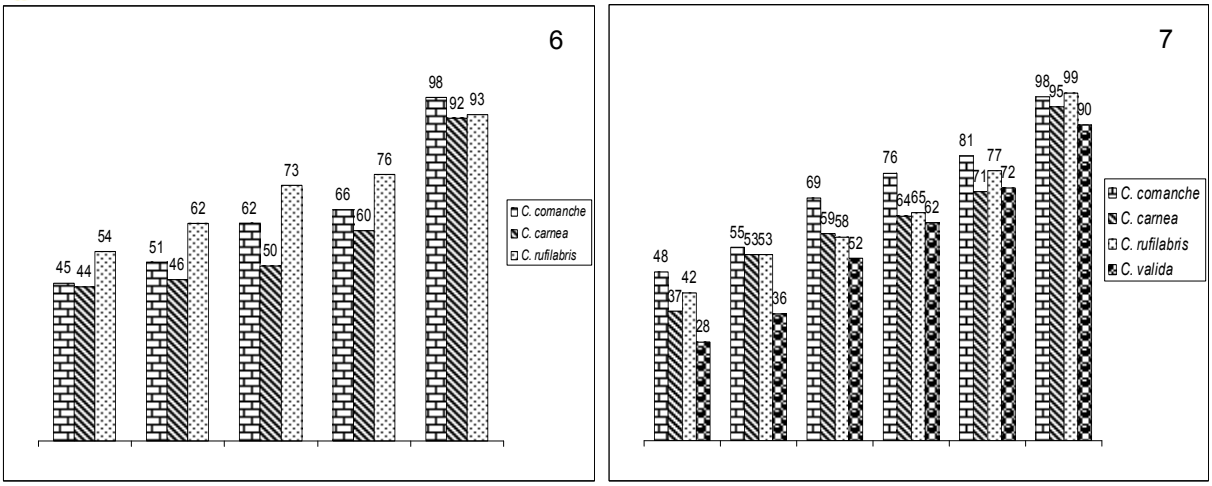


Figura 6 y 7.- Consumo de ninfas grandes de *Diaphorina citri* por especies de crisopa de pies de cría provenientes de huertas de cítricos.

DISCUSIÓN

C. comanche y *C. rufilabris* mostraron mayor capacidad de depredación de inmaduros de *D. citri* durante las primeras seis horas de exposición de las presas. Sin embargo, en la última lectura de depredación, a las 24 h, todas las especies de crisopa presentaron un consumo similar ($p > 0.05$), de alrededor de 100 especímenes por depredador. El consumo de huevo y ninfa chica fue mayor que el de ninfas grandes, es decir, entre más pequeña fue la presa la velocidad y capacidad de consumo fue mayor. Es necesario realizar evaluaciones para determinar el total de presas de *D. citri* requeridas, en diferentes estados de desarrollo, por cada especie de Chrisopidae indicadas en larva de primero, segundo y tercer instar, para estimar la capacidad de consumo total.

La decisión de utilizar alguna especie de estos depredadores para el control biológico por aumento contra el PAS, dependería de: 1. La adaptación que posee cada especie de crisopa, definida en gran parte por su predominancia en un ambiente determinado [12]; 2. La capacidad depredadora sobre el PAS [13] y 3. La factibilidad de producción de cada una, considerando la capacidad de reproducción y la duración del ciclo de vida, que influyen el costo de inversión por especímen reproducido. En el caso de factibilidad de reproducción, la diferencia entre las especies de *Chrysoperla* evaluadas es reducida; mientras las especies carga basura *C. valida* y *C. claveri* presentan un ciclo de vida larvaria superior en 3-4 días y períodos de pre-ovisposición que difieren en 3-9 días, lo que involucra un mayor período de alimentación y mantenimiento en laboratorio antes de reproducirse; no obstante, estos factores podrían ser ventajas en campo, ya que el depredador estaría en activo durante mayor tiempo [14, 15], pero además, la capacidad de reproducción de las especies de *Chrysoperla* evaluadas y específicamente de *C. comanche* es mayor que la de la crisopa carga basura *C. valida*, así como de *C. claveri*.

La mayor predominancia de *C. comanche* en las huertas de cítricos, combinada con la capacidad de consumo de presas y la factibilidad de reproducción, sugieren a ésta especie como la que eventualmente puede tener mayor posibilidad de éxito como agente de control biológico del PAS en Sinaloa, por lo cual se recomienda su reproducción, sin descartar a *C. valida* que también predominó. Ésta propuesta se sustenta también en que la técnica de cría está ampliamente difundida y desarrollada,

y existe amplia infraestructura en el país para realizarla, ya que en cada estado hay al menos un laboratorio de reproducción de insectos benéficos y en la mayoría se reproduce alguna especie de *Chrysoperla* [7, 8], lo cual no sucede en el caso de otros entomófagos del PAS. El empleo de crisopa se propone como una alternativa que vendría a reducir la dependencia exclusiva del control químico para el control de *D. citri*, ya que el uso único de insecticidas eventualmente provocaría la selección de resistencia del insecto a los plaguicidas, así como la resurgencia de otros insectos plaga asociados al cultivo y porque se puede utilizar en lugares donde sea inadecuada la aplicación de insecticidas; como en áreas urbanas, panteones, jardines, cultivos de traspatio, huertas orgánicas, huertas adyacentes a áreas urbanas, etc.

AGRADECIMIENTO
A la Junta Local de Sanidad Vegetal del Valle del Carrizo.

REFERENCIAS

[1]Michaud, J. P. 2004. Natural mortality of Asian Citrus Psyllid (Homoptera: Psyllidae) in Central Florida. Biol. Control 29:260–269.

[2]Aubert, B. 2008. Citrus Huanglongbing experiences of integrated vector management (IVM) in Reunion and Guadeloupe, two ultra-peripheral regions of the European Union, pp. 16-24. *In*: Proceedings of the International Research Conference on Huanglongbing. USDA, University of Florida. December 2008. Orlando Fl.

[3]Chien, Ch.-Ch., S.-Ch. Chiu and S.-Ch. Ku. 2001. Mass rearing and field release of an eulophid wasp, *Tamarixia radiata* (waters.). FFTC Technical notes. Plant Protection. 2001-5: 1-4.

[4]Etienne, J., S. Quilici, D. Marival and A. Franck. 2001. Biological control of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in Guadeloupe by imported *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae). Fruits. 56: 307-315.

[5]Cortez-Mondaca, E., Lugo-Angulo, N.E., Pérez-Márquez, J. y Apodaca-Sánchez, M.A. 2010. Primer reporte de enemigos naturales y parasitismo sobre *Diaphorina citri* Kuwayama en Sinaloa, México. Southwest. Entomol. 35(1): 113-116.

[6]López-Arroyo, J. I., A. González-Hernández, M.A. Reyes-Rosas, R. Rodríguez-Guerra, M. Lozano-Contreras, J. Jasso-Argumedo, E. Cortez-Mondaca. 2010. Avances en el control biológico de *Diaphorina citri,* vector del patógeno causante del huanglongbing de los cítricos, pp. 87-98. *In*: Memoria del Simposio Nacional para el Control Biológico del Psílido Asiático de los Cítricos. Sociedad Mexicana de Control Biológico. 10-12 Noviembre de 2010. Uruapan, Michoacá, México.

[7]Bahena, J. F. 2008. Enemigos Naturales de las Plagas Agrícolas de Maíz y Otros cultivos. Libro Técnico Núm. 5. SAGARPA-INIFAP. Uruapan, Michoacán, México. 180 p.

[8]SENASICA-Dirección General de Sanidad Vegetal. 2010. Plantas Productoras de Insectos Benéficos; Situación Actual y Perspectivas de la Red de Laboratorios Veterinarios y agronómicos en el País. Junio de 2010. http://www.senasica.gob.mx/?id=2684. Consultada en agosto de 2011.

[9]Cortez-Mondaca, E., M.P Partida-Valenzuela, J.I. López-Arroyo, L.R. Ruíz, V.M. González-Calderón. 2011. Determinación de Especies de Chrysopidae Asociadas a *Diaphorina citri* Kuwayama en Sinaloa, México. XXXIV Congreso Nacional de Control Biológico. Monterrey, México.

[10]Cortez M., E., *et al*. C. 2000. Prueba de Alimentación de *Chilocorus stigma* (Coleoptera: Coccinellidae) Sobre "Escamas Armadas" de Cítricos. *In:* Memorias del XXIII Congreso Nacional de Control Biológico. SMCB. Guanajuato, Guanajuato. pp. 173-176.

[11]SAS Institute. 2009. SAS systems for information delivery for Windows. Release 9.2. Cary, North Caroline. USA.

[12]Cortez-Mondaca, E., F. J. Orduño-Cota, and M. López-Buitimea. 2008. Species of Chrysopidae Associated with Whiteflies in Soybean in Northern Sinaloa, Mexico. Southwest. Entomol. 3(2): 153-155.

[13]Tauber, M. J., C. A. Tauber, K. M. Daane, & K. S. Hagen. 2000. Commercialization of predators: Recent lessons from green lacewing (Neuroptera: Chrysopidae: *Chrysoperla*). Am. Entomol. 46: 26-38.

[14]López-Arroyo, J. I., C.A. Tauber, and M.J. Tauber. 1999. Comparative life-histories of the predators *Ceraeochrysa cincta*, *C. cubana*, and *C. smithi* (Neuroptera: Chrysopidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 92: 208-217.

[15]Albuquerque, G. S., C. A. Tauber, and M. J. Tauber. 2001. *Chrysoperla externa* and *Ceraeochrysa* spp.: potential for biological control in the New World tropics and subtropics, pp. 408-423. *In*: P. McEwen, T.R. New, and A.E. Whittington (Ed.). Lacewings in the Crop Environment. Cambridge University Press. Cambridge, U.K.

EVALUATION OF THE EFFECTS OF BIOFERTILIZER ENERBAC IN THE GROWTH AND DEVELOPMENT OF *Lactuca sativa* L. IN CIBAC UAM-X.

(Evaluación de los efectos del biofertilizante ENERBAC en el desarrollo de *Lactuca sativa* L. en el CIBAC UAM-X)

Venus Jiménez Castañeda[a*+], Miguel Santos Flores Valderrama[a], Ignacio Garza Lombó[a], José Carlos López García[a], Augusto Martínez Villalobos[a], Michelle Villanueva Martínez[a], José Luis Sanchez Rios[a].

[a]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 que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: vjimenez@correo.xoc.uam.mx

Área del Conocimiento: Control Biológico.

ABSTRACT
The lettuce (*Lactuca sativa* L.) is one of the most important horticultural crops worldwide and is affected by a number of diseases that reduce its production. Bio-fertilizers are prepared from micro-organisms, the ENERBAC is a biological inoculant formulated with strains of *Bacillus subtilis* and other bacteria that promote healthy and vigorous growth of crops, has the ability to inhibit the growth of fungal pathogens that attack the plants. The objective of this research was to test the effect of bio-fertilizer ENERBAC on growth of lettuce, as well as as its fungicidal action. At the Center for Biological and Aquaculture Research Cuemanco (CIBAC) of the Universidad Autónoma metropolitana - Xochimilco, the effect of 3 doses (1 ml, 0.5 ml and 0.25 ml in 500 ml of water to the 100, 50 and 25% respectively evaluated the recommended dose) and a control was evaluated on the growth of lettuce crop, according to the recommendations specified in the product. On the other hand their effect on the presence of pests and diseases in the crop was analyzed. A variance analysis with the following results were made: growth highly significant differences between treatments were found compared to the control. There is a highly significant difference between treatment lel 100% compared with the control and treatment of 25%, and no significant differences between treatment 50% compared to 100% treatment and the control. Also, a remarkable root development in plants to treat 100% of the product and minimal development in the control was observed. Therefore the use of ENERBAC has a significant influence on improved growth and development of lettuce, even when the minimum dose is applied, although the best results were obtained with the highest dose. There was no significant presence of any agricultural plant pathogen or pest affecting crop productivity. It is concluded that the application of the maximum recommended dose of ENERBAC promotes healthy and vigorous growth of the lettuce crop.

Keywords: biofertilizer; lettuce; rhizosphere; *Bacillus subtilis*.

RESUMEN

La lechuga (*Lactuca sativa* L.) es uno de los cultivos hortícolas más importantes a nivel mundial y es afectada por una serie de enfermedades que merman su producción. Los biofertilizantes son preparados de microorganismos, ENERBAC es un inoculante biológico formulado con cepas de *Bacillus subtilis,* y otras bacterias que promueven el crecimiento vigoroso y saludable de los cultivos, tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos que atacan a las plantas. El objetivo de esta investigación fue analizar el efecto del biofertilizante ENERBAC en el crecimiento de la lechuga, así como también su acción fungicida. En condiciones de campo en el Centro de Investigaciones Biológicas y Acuícolas de Cuemanco de la Universidad Autónoma Metropolitana (CIBAC-UAM), se evaluó el efecto de 3 dosis y un testigo de biofertilizante ENERBAC en el crecimiento del cultivo de lechuga (*Lactuca sativa* L.), de acuerdo a las recomendaciones especificadas en el producto. El biofertilizante utilizado es un inoculante biológico del suelo con efecto fungicida formulado con cepas de *Bacillus subtilis.* Por otro lado se analizó su efecto en la presencia o ausencia de plagas y enfermedades en el cultivo. Se realizó un análisis de varianza que arrojó los siguientes resultados: en el crecimiento se encontraron diferencias altamente significativas entre los efectos de los tratamientos con respecto al testigo. Hay una diferencia altamente significativa entre las medias del tratamiento al 100% con respecto al testigo y al tratamiento al 25%, y hay diferencias significativas entre el tratamiento al 50% con respecto al tratamiento al 100% y al testigo. Asimismo, se observó un notable desarrollo radicular en las plantas con mayor aplicación del producto, y un desarrollo mínimo en aquellas testigo. Por lo tanto el uso de ENERBAC tiene una influencia importante en un mejor crecimiento y desarrollo de las lechugas, incluso cuando se aplica la dosis mínima, aunque los mejores resultados se obtuvieron con la dosis máxima. No hubo presencia notable de ningún agente fitopatógeno o plaga agrícola que mermara la productividad del cultivo. Se concluye que la aplicación de la dosis máxima recomendada de ENERBAC favorece el crecimiento saludable y vigoroso del cultivo de lechuga.

Palabras Clave: biofertilizante; lechuga; rizosfera; *Bacillus subtilis.*

INTRODUCCIÓN

La lechuga es uno de los cultivos hortícolas más importantes a nivel mundial. Para el año 2002 la producción mundial fue de 18.75 millones de toneladas, México se encuentra en el octavo lugar con 234,452 toneladas para ese mismo año. Para 2010 los estados con mayor superficie sembrada fueron Guanajuato, Puebla y Baja California. La ventaja agronómica que presenta es que se trata de un cultivo con un ciclo vegetativo corto lo cual permite producir todo el año [1].

La lechuga es afectada por una serie de enfermedades que merman su producción. La incidencia y severidad de dichas enfermedades se debe a la susceptibilidad de la planta, el medio ambiente y el microorganismo que las causa. Dentro de las enfermedades causadas por hongos, cabe destacar aquellas que son causadas por: *Bremia lactucae, Erysiphe cichoracearum, Botrytis cinerea,* entre otras [2].

Los biofertilizantes son preparados de microorganismos aplicados al suelo o a la planta que buscan sustituir parcial o totalmente el uso de la fertilización sintética así como la contaminación generada por los agroquímicos. Por otro lado, no sólo se enfocan al crecimiento vegetal sino que pueden ser elementos importantes de la estabilidad de los agroecosistemas y del ambiente ya que influyen en la disminución de la aplicación de pesticidas

Los microorganismos utilizados para la preparación de biofertilizantes se dividen en dos grupos: el primero promueve el crecimiento de la planta a partir de la síntesis de sustancias presentes en el ambiente y el segundo incluye a los organismos que son capaces de disminuir o prevenir los efectos de deterioro causados por microorganismos patógenos. Puede haber biofertilizantes que estén en los dos grupos, promoviendo el crecimiento e inhibiendo los efectos causados por patógenos.

Algunas bacterias son versátiles presentando varios mecanismos de acción, como es el caso de *Bacillus subtilis* que produce auxinas que promueven el crecimiento de las plantas e induce resistencia sistémica contra ciertos patógenos [3].

El ENERBAC es un inoculante biológico con efecto fungicida formulado con cepas de *B. subtilis,* y otras bacterias que promueven el crecimiento vigoroso y saludable de los cultivos. Tiene la capacidad de inhibir la germinación y crecimiento de hongos fitopatógenos que atacan a las plantas [4].

Existen las opciones y alternativas para generar una revolución en los sistemas de producción agrícola que supere económica, productiva y ecológicamente a los ya existentes. Dentro de este marco de acción cabe resaltar la importancia de los biofertilizantes y biocontroladores de patógenos que tienen un costo menor y una mayor eficiencia [5]. Resulta imprescindible e impostergable ahondar en la investigación científica sobre el efecto benéfico que tienen los biocontroladores de patógenos y su relación con el abatimiento de enfermedades, desarrollo vigoroso del cultivo y accesibilidad para el productor. La presente investigación analiza el efecto del biofertilizante ENERBAC en el desarrollo del cultivo de *L. sativa* L. en el CIBAC UAM-X, mediante la aplicación de tres tratamientos y un testigo. Por otro lado busca analizarse la incidencia de plagas y enfermedades en el cultivo en los tratamientos antes mencionados.

METODOLOGÍA

El experimento se realizó en el Centro de Investigaciones Biológicas y Acuícolas de Cuemanco de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco (CIBAC), ubicado en la zona lacustre de Xochimilco (99° 6' 10.69" W, 19° 16' 56.53" N) el clima de la zona es templado subhúmedo con lluvias en verano. De acuerdo a los datos de la estación meteorológica de San Gregorio Atlapulco la temperatura media anual para el periodo 1951-2010 fue de 16.2^{0}C con una temperatura media máxima anual de 24.4^{0}C y una mínima de 8.0^{0}C. La precipitación media anual fue de 756.4 mm para el mismo periodo [6, 7]. La unidad de suelo predominante en la zona es histosol [7].

Diseño experimental, análisis estadístico y variables analizadas.
Se realizó un diseño experimental al azar en filas en pequeños predios de 5 metros cuadrados. La variable cuantitativa analizada mediante un análisis de varianza y la prueba de Tukey, fue el crecimiento y desarrollo de las plantas (altura) en los diferentes tratamientos y el testigo. Se realizaron tres tratamientos y un testigo de acuerdo a las dosis recomendadas en el producto, con dos repeticiones.
Por otro lado, las variables cualitativas analizadas mediante la observación y descripción fueron: la apariencia de las hojas, el desarrollo y apariencia de las raíces de muestras de cada tratamiento seleccionadas al azar y las presencia o ausencia de plagas o enfermedades.

Primera etapa: trasplante y establecimiento del cultivo.
Se emplearon charolas con plántulas previamente germinadas de *L. sativa* L. Se trasplantaron en pequeños predios dentro del CIBAC un promedio de 20 plántulas por tratamiento, con el fin de garantizar el establecimiento de 12 plantas para cada tratamiento. Se realizó una primera aplicación de ENERBAC, de acuerdo a las recomendaciones establecidas en el producto para hortalizas (1 a 2 L/ha), lo que resultó en las siguientes dosis: 0.5 ml en 500 ml de agua para el tratamiento que corresponde al 100% de la dosis recomendada, 0.25 ml y 0.125 ml en 500 ml de agua para las dosis de 50 y 25% respectivamente. Se midieron las alturas iniciales de las plantas al momento del trasplante.

Posteriormente se realizó una segunda aplicación 15 días después, elevando la dosis a 1ml, 0.5 ml y 0.25 ml en 500 ml de agua para el 100, 50 y 25% respectivamente. Se dejaron transcurrir tres días y de igual forma se tomó una segunda medida de la altura de las plantas. Por último, se realizó una aplicación final 15 días después con las mismas dosis especificadas anteriormente y se midieron las alturas de las plantas tres días después.

Segunda etapa: Diagnóstico final.
Terminado el tiempo asignado al desarrollo y observación de la planta, se realizó un diagnóstico final en donde se identificaron y clasificaron los posibles signos y síntomas presentes en los cultivos experimentales, realizando un análisis comparativo referente al porcentaje de inoculante biológico aplicado en cada planta. Y se tomaron para cada tratamiento ejemplares de lechuga al azar para observar el desarrollo de las raíces.

Tercera etapa: Conclusión y análisis de los resultados.
En una última etapa se analizaron los resultados obtenidos con un análisis estadístico mediante la prueba de Tukey, se presentan los resultados obtenidos y el análisis de los mismos en cuadros. Por otro lado se analizan y muestran los resultados para las variables cualitativas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al notar un mayor crecimiento en las lechugas tratadas se hizo una medición (al momento de la segunda aplicación de ENERBAC) sobre su altura (cm), para ello, se seleccionaron al azar 3 plantas por fila, de cada tratamiento (de un total de 4 a 8 lechugas por fila) y cada uno dividido en 4 filas, de lo anterior se obtuvieron los siguientes datos (Tabla 1):

Tabla 1. Altura de las plantas

Fila No.	**1**	**1**	**1**	**2**	**2**	**2**	**3**	**3**	**3**	**4**	**4**	**4**
Testigo(cm)	8	11	11	8	7	7	9	8	7	7	6	11
25%(cm)	10	12	14	16	6	6	7	10	10	12	12	9
50%(cm)	10	12	14	12	8	13	11	12	8	12	9	9
100%(cm)	14	14	15	15	14	13	16	10	11	14	15	13

Para realizar un análisis estadístico de varianza se obtuvieron las medias por fila (de cada tratamiento), la suma de las mismas y las medias por tratamientos, de estas operaciones se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 2):

Tabla 2 . Medias por fila y por tratamiento

No. de repetición	1	2	3	4	Xi	Media (cm)
Testigo(cm)	10.00	7.33	8.00	8.00	33.33	8.33
25%(cm)	12.00	9.33	9.00	11.00	41.33	10.33
50%(cm)	12.00	11.00	10.33	10.00	43.33	10.83
100%(cm)	14.33	14.00	12.33	14.00	54.66	13.66

Con lo anterior se realizó un análisis de varianza con las siguientes fórmulas: **FC**=(Σtotal)2/rt **SCT**=Σxi2/r –FC, **SCE**=SC-SCT, **SC**=(Σtotal)2 –FC, **CMT**=SCT/glt, **CME**=SCE/gle, **Fc**=CMT/CME, **CV**=√CME/mediadelasmedias x100 y en el cual se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 3):

Tabla 3. Análisis de varianza

	g.l.	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	FC=1863.001
Tratamientos	3	58.0641 (SCT)	19.3547 (CMT)	Fc=15.7355
Error experimental	12	14.799 (SCE)	1.23 (CME)	
Total	15	72.8631 (SC)		

Basándonos en los parámetros:

1. Si Fc es menor que F 0.05 entonces no hay diferencia significativa entre los medias de los tratamientos (NS)
2. Si Fc es mayor que F 0.05 entonces hay diferencia significativa entre las medias de los tratamientos (*)
3. Si Fc es mayor que F 0.01 entonces hay diferencia altamente significativa entre los medias de los tratamientos (**)

Y a partir de los siguientes resultados (Tabla 4):

Tabla 4. Resultados del análisis de varianza

c.v.	Valor en tabla F de Fisher 0.05 (3/12)	Valor en tabla F de Fisher 0.01 (3/12)
10.28%	3.49	5.95

Se concluye que como Fc es mayor que F0.01 hay diferencias altamente significativas entre las medias de los tratamientos o dosis estudiados.

Posteriormente se realizó un análisis o prueba de Tukey con la siguiente formula **DMT**=alfa(√CME/r), y basándonos en los siguientes parámetros:

4. Si la diferencia entre las medias de dos tratamientos es menor que DMT 0.05 entonces no hay diferencia significativa entre los medias de estos dos tratamientos (NS)
5. Si la diferencia entre las medias de dos tratamientos es mayor que DMT 0.05 hay una diferencia significativa entre las medias de esos tratamientos (*)
6. Si la diferencia entre las medias de dos tratamientos es mayor que DMT 0.01 entonces hay diferencias altamente significativas entre las medias de esos tratamientos (**)

Los resultados son los siguientes (Tabla 5):

DMT 0.05= 4.20√1.23/4= 2.32 DMT0.01= 5.50√1.23/4= 3.04

Tabla 5. Prueba de Tukey

Tratamiento		**Testigo**	**25%**	**50%**	**100%**
	Media	8.33	10.33	10.83	13.66
100%	13.66	**5.33(**)**	**3.33(**)**	2.83(*)	
50%	10.83	2.5(*)	0.5 (NS)		
25%	10.33	2 (NS)			
Testigo	8.33				

Con el cuadro anterior se puede concluir que hay una diferencia altamente significativa entre las medias del tratamiento al 100% con respecto al testigo y al tratamiento al 25%, y hay diferencias significativas entre el tratamiento al 50% con respecto al tratamiento al 100% y al testigo. Por lo tanto el uso de ENERBAC tiene una influencia importante en un mejor desarrollo de las lechugas.

Al momento de realizar la tercera aplicación de ENERBAC (Mes y medio después del trasplante) se realizó la medición de las alturas de las lechugas (en cm), para ello se seleccionaron nuevamente al azar 3 lechugas por fila de cada tratamiento (de un total de 4 a 8 lechugas por fila) y cada uno dividido en 4 filas (cabe mencionar, que en la segunda aplicación, se doblo la dosis en todos los tratamientos siendo la primera dosis aplicada la mínima recomendada, en el caso del 100%, y la segunda, la máxima recomendada, con respecto al 100%), de lo anterior se obtuvieron los siguientes datos:

Tabla 6. Altura de las plantas

Fila No.	**1**	**1**	**1**	**2**	**2**	**2**	**3**	**3**	**3**	**4**	**4**	**4**
Testigo(cm)	8	8	10	8	8	9	7	9	11	11	11	11
25%(cm)	9	10	16	9	9	13	14	10	13	8	9	11
50%(cm)	10	11	11	12	13	14	16	15	15	12	15	16
100%(cm)	13	14	15	15	17	16	15	15	18	16	16	17

Para realizar un análisis estadístico de varianza se obtuvieron las medias por fila (de cada tratamiento), la suma de las mismas y las medias por tratamientos, de estas operaciones se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 7. Altura media de las plantas						
No. de repetición	**1**	**2**	**3**	**4**	**Xi**	**Media (cm)**
Testigo(cm)	8.66	8.33	9.00	11.00	36.99	9.24
25%(cm)	11.66	10.33	12.33	9.43	43.65	10.91
50%(cm)	10.66	13.00	15.33	14.33	53.32	13.33
100%(cm)	14.00	16.00	16.00	16.33	62.33	15.58

Con lo anterior se realizo un análisis de varianza con las siguientes formulas: **FC**=(Σtotal)2/rt **SCT**=Σxi2/r –FC, **SCE**=SC-SCT, **SC**=(Σtotal)2 –FC, **CMT**=SCT/glt, **CME**=SCE/gle, **Fc**=CMT/CME, **CV**=√CME/mediadelasmedias x100 y en el cual se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 8. Análisis de varianza				
	g.l.	**Suma de cuadrados**	**Cuadrado medio**	FC=802.7034
Tratamientos	3	1697.7050 (SCT)	565.9016 (CMT)	Fc=267.5654
Error experimental	12	25.3807 (SCE)	2.1150 (CME)	
Total	15	1723.0857 (SC)		

Basándonos en los parámetros:

1. Si Fc es menor que F 0.05 entonces no hay diferencia significativa entre los medias de los tratamientos (NS)
2. Si Fc es mayor que F 0.05 entonces hay diferencia significativa entre las medias de los tratamientos (*)
3. Si Fc es mayor que F 0.01 entonces hay diferencia altamente significativa entre los medias de los tratamientos (**)

Y a partir de los siguientes resultados:

Tabla 9. Resultados del análisis de varianza		
c.v.	**Valor en tabla F de Fisher 0.05 (3/12)**	**Valor en tabla F de Fisher 0.01 (3/12)**
11.85%	3.49	5.95

Se concluye que como Fc es mayor Que F0.01 hay diferencias altamente significativas entre las medias de los tratamientos o dosis estudiados.

Posteriormente se realizó un análisis o prueba de Tukey con la siguiente formula **DMT**=alfa(√CME/r), y basándonos en los siguientes parámetros:

4. Si la diferencia entre las medias de dos tratamientos es menor que DMT 0.05 entonces no hay diferencia significativa entre los medias de estos dos tratamientos (NS)
5. Si la diferencia entre las medias de dos tratamientos es mayor que DMT 0.05 hay una diferencia significativa entre las medias de esos tratamientos (*)

6. Si la diferencia entre las medias de dos tratamientos es mayor que DMT 0.01 entonces hay diferencias altamente significativas entre las medias de esos tratamientos (**)

Los resultados son los siguientes:

DMT 0.05= 4.20√2.11/4= 3.05 DMT0.01= 5.50√2.11/4= 3.99

Tabla 10. Prueba de Tukey

Tratamiento		**Testigo**	**25%**	**50%**	**100%**
	Media	9.24	10.91	13.33	15.58
100%	15.58	**6.34(**)**	**4.67(**)**	2.25 (NS)	
50%	13.33	**4.09 (**)**	2.42 (NS)		
25%	10.91	1.18 (NS)			
Testigo	9.24				

Con el cuadro anterior se puede concluir que hay una diferencia altamente significativa nuevamente entre las medias del tratamiento al 100% con respecto al testigo y al tratamiento al 25%, y la diferencia con el primer análisis es que la diferencia entre la dosis al 50% y el testigo se torno altamente significativa, por otra parte las demás diferencias (25%-testigo, 50%-25%, 100%-50%) no resultaron ni si quiera significativa. Por lo tanto se demuestra nuevamente que el uso de ENERBAC tiene una influencia importante en un mejor desarrollo de las lechugas, incluso aplicando la dosis mínima recomendada, cabe recalcar que los mejores resultados, se obtuvieron con la dosis máxima.

Por otro lado, se pudo observar que no hubo presencia de plagas o enfermedades causadas por ningún agente patógeno. La diferencia principal entre los tratamientos y el testigo radicó en el crecimiento y desarrollo de las plantas como se muestra anteriormente, así como en las fotografías del anexo 2. Sin embargo, no hubo diferencias en cuanto a la presencia de agentes fitopatógenos en los tratamientos, ni en el testigo. Esto puede deberse, en los tratamientos, al efecto antagónico que presentan las bacterias componentes de ENERBAC, que ocupan nichos ecológicos que inhiben la presencia de enfermedades, sobre todo de aquellas causadas por hongos; así como al manejo adecuado del cultivo durante su ciclo ya que tampoco el testigo tubo presencia de plagas o enfermedades.

Asimismo, en cuanto a las variables cualitativas analizadas, se pudo observar en muestras tomadas al azar de cada tratamiento y el testigo, una diferencia a simple vista en cuanto al desarrollo radicular de la planta. Esto se debe a la aplicación del producto, que además de ser un inoculante biológico del suelo para prevenir enfermedades, funciona también como un biofertilizante que favorece el desarrollo y crecimiento adecuado de las plantas. Las diferencias en cuanto al crecimiento de las raíces pueden apreciarse en las fotografías anexas. Por otro lado, todos los tratamiento, a pesar de las diferencias en cuanto a crecimiento, presentaron una coloración viva y saludable en las hojas, lo cual indica los efectos positivos que tiene en biofertilizante sobre el desarrollo de las mismas.

CONCLUSIONES

Hay una diferencia altamente significativa en la altura de la planta entre el tratamiento al 100% con respecto al testigo y al tratamiento al 25%.
Hay diferencias significativas en altura de las plantas entre el tratamiento al 100% con respecto al tratamiento al 50% .

El uso de ENERBAC tiene una influencia importante en un mejor desarrollo de las lechugas, incluso aplicando la dosis mínima recomendada, cabe recalcar que los mejores resultados, se obtuvieron con la dosis máxima.
Asimismo se concluye que no hubo presencia notable o que mermara el desarrollo y producción de *L. sativa* L de ningún agente fitopatógeno o plaga agrícola.

El crecimiento de las raíces es favorecido por la aplicación de ENERBAC, siendo el tratamiento de 100% el que fue mayor a comparación con el testigo.

REFERENCIAS

[1].Salazar, L., (2011) "Identificación de razas de *Bremia lactucae* y caracterización de variedades de lechuga " en Biblioteca Colegio de Postgraduados campus Montecillo, Texcoco, México, 52 pp.

[2]. Almodóvar, W., (2001) "Clínica al día. Enfermedades de la Lechuga" publicado por el Servicio de extensión agrícola del Colegio Nacional de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Puerto Rico. Pp. 1-3 disponible en http://uprm.edu/agricultura/sea/clinica/ClDiaEnfLechu.pdf [consultado el 12 de mayo de 2015].

[3]. Armenta-Bojórquez, A. D., García-Gutiérrez, C., Camacho-Báez, J. R., Apodaca-Sánchez, M. A., Gerardo-Montoya, L., Nava-Pérez, E., (2010) "Biofertilizantes en el desarrollo agrícola de México" en *Ra Ximhai. Revista de Sociedad, Cultura y Desarrollo Sustentable,* 6 (1). Enero-abril 2010, pp 51-56.

[4]. Prestadora de Servicios Farma S.A. de C.V., (2014) *PLM 2014. Diccionario de Insumos para la Producción Orgánica y manejo integrado de plagas. DIPO.* Cuarta edición, México, D.F., PLM México, S.A. de C.V. pp. 61-62.

[5]. Morales, M., (2007) "Los biofertilizantes. Una alternativa productiva, económica y sustentable" en *Estudios Agrarios. Revista de la Procuraduría Agraria,* 13 (36). Pp. 93-119.

[6]. Servicio Meteorológico Nacional SMN. (s.f.) *Normales Climatológicas por estación.* Disponible en: http://smn.cna.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=179&tmpl=component [consultado el 12 de mayo de 2015].

[7]. Instituto Nacional de Estadística y Geografía INEGI. (s.f.), *Mapa digital de México. Climas y edafología.* Disponible en: http://gaia.inegi.org.mx/mdm6/?v=bGF0OjE5LjI4MTg3LGxvbjotOTkuMTAzNDYsejoxNCxsOmM0MTY= [consultado el 12 de mayo de 2015].

ACARICIDAL EFFECT OF ESSENTIAL OIL FROM *Cuminum cyminum* AGAINST CATTLE TICK *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

[Evaluación del efecto acaricida *in vitro* del aceite esencial de comino (*Cuminum cyminum*) contra la garrapata del bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*]

Estefania Lazcano-Díaz [a*], Eduardo Padilla- Camberos [a+], Moisés Martínez-Velázquez [a], Gustavo Castillo-Herrera [a]

[a] CIATEJ- Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y diseño del Estado de Jalisco. Unidad de Biotecnología Médica y Farmacéutica. Av. Normalistas No. 800, Col. Colinas de la Normal, Cp 44270, Guadalajara, Jal., México.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: epadilla@ciatej.mx

Área del Conocimiento: Control Biológico.

ABSTRACT
Rhipicephalus (Boophilus) microplus ectoparasite commonly known as tick, represents an economic problem due to damage caused in cattle as it is in their skin the decrease in the production of milk and meat, diseases transmission, besides considering costs to their control that generate resistance to these rapidly. The use of natural products is considered an alternative to resistance of chemical products. Due to the need for efficient alternatives with less environmental impact, this study aimed to evaluate the acaricide activity *in vitro* of essential oil of cumin (*Cuminum cyminum*) at different stages of the reproductive cycle of the ticks. The essential oil concentrations were evaluated from 0.31 to 5%. Adult ticks collected in the locality of Terrero township Tonatico in the State of Mexico were treated with these concentrations, until complete their reproductive cycle of 40 days in the adults immersion test, larvae 7 days of hatching were used for larval packet test. Essential oil 5% inhibited adult ticks oviposition in 63.4%, hatching a percentage of 14.0% and tick control of 95.5%, 100% larval mortality was obtained. The results showed the acaricide effect of essential oil of cumin, it is suggested *in vivo* studies to assess the effectiveness of this oil, in order to carry out studies to product development as a alternative to control ticks in cattle.

Keywords: tick control; resistance; alternative; essential oil.

RESUMEN
Rhipicephalus (Boophilus) microplus ectoparásito hematófago comúnmente conocido como garrapata, representa un problema económico por la pérdida de ingresos debido a los daños que provoca en el ganado como lo es en sus pieles, la disminución en la producción de leche y carne, la transmisión de enfermedades, además de los costos de su control considerando que generan una resistencia a estos de manera acelerada. El uso de productos naturales se considera una alternativa a la resistencia de productos químicos. Debido a la necesidad de alternativas eficientes con un menor impacto ambiental, este estudio tuvo como objetivo evaluar la actividad acaricida *in vitro* del aceite esencial de comino (*Cyminum cuminum*) en diferentes etapas del ciclo de la garrapata. Las concentraciones evaluadas del aceite esencial utilizadas fueron 0.31 a 5%. Las garrapatas adultas colectadas en la localidad del Terrero

del municipio de Tonatico en el Estado de México fueron tratadas con estas concentraciones en la prueba de inmersión de adultas hasta completar su ciclo de reproducción de 40 días, se utilizaron larvas de 7 días de eclosionadas para la prueba de paquete de larvas. El aceite esencial de comino al 5% inhibió la oviposición en garrapatas adultas en un 63.4%, un porcentaje de eclosión del 14.0 % y un porcentaje de control del 95.5%, en larvas se obtuvo un 100% de mortalidad. Los resultados mostraron el efecto acaricida del aceite esencial de comino (*Cyminum cuminum*), se sugiere realizar estudios *in vivo* con el fin de evaluar la eficacia de este aceite en el campo, con el objetivo de realizar estudios que permitan el desarrollo de productos como una alternativa para el ganado de control de garrapatas.

Palabras Clave: garrapatas, resistencia, control, aceite esencial.

INTRODUCCIÓN

Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari: Ixodidae) ectoparásito hematófago comúnmente conocido como garrapata, representa un problema económico para la producción de ganado en regiones tropicales y subtropicales del mundo. Esta garrapata provoca pérdida de sangre lo que resulta en reducción de la ganancia de peso y producción de leche, daños en la piel, transmisión de agentes causantes de enfermedades como *Babesia bigemina, B. bovis y Anaplasma marginale* [1,2]. Las pérdidas económicas mundiales se estimaron en 7 mil millones de dólares a nivel mundial y de 1 millón de dólares para América latina [3], se estima que en México producen pérdidas a la ganadería bovina de aproximadamente 48 millones de dólares anuales. Estas pérdidas se podrían ver reducidas por los métodos utilizados para controlar infestaciones por garrapatas, que se basan en el uso intensivo de acaricidas sintéticos. Sin embargo hay informes de un aumento de resistencia en las poblaciones de garrapatas a estos compuestos [4,5].

El uso indiscriminado de acaricidas es uno de los factores clave que han contribuido a esta situación [6], debido a la fuerte presión de selección que elimina a los individuos susceptibles, disminuyendo progresivamente el efecto y elevando los costos de desarrollo de nuevos ixodicidas [7,8]. En el sureste de México se ha reportado que la mayoría de los ranchos estudiados presentaban poblaciones de garrapatas con resistencia múltiple a ixodicidas principalmente multiresistencia a organofosforados piretroides y amidinas (OF-PS-Am) [7]. La resistencia de *R. microplus* a los PS fue la más importante, ya que del 66 al 95 % de los ranchos en el sureste de México presentan garrapatas resistentes a deltametrina, flumetrina y cipermetrina. Se ha reportado en México los primeros casos de *R. microplus* resistente a ivermectina y fipronil [9], y más recientemente la detección de cepas multiresistentes a OFs, AMs y lactonas macrociclicas (LMs) en el Estado de Veracruz [10].

Estos reportes ponen de manifiesto la necesidad de buscar nuevas alternativas de control, para reducir el uso de ixodicidas y retrasar el proceso de selección de poblaciones de garrapatas resistentes a los productos químicos [11].El uso de productos derivados de plantas (PDP) es una alternativa a los productos químicos sintéticos para el control de garrapatas. Los productos naturales se degradan rápidamente en el medio ambiente, la resistencia a estos compuestos se desarrolla a un ritmo más lento en comparación con acaricidas sintéticos [12].

En México se reportó que cuatro plantas tropicales ricas en taninos fueron eficaces en el control de larvas de *R. microplus*, confirmaron la participación de los taninos en el efecto ixodicidas mediante el uso de inhibidores específicos [13].

METODOLOGÍA

Aceite esencial de comino fue obtenido a nivel piloto por destilación por arrastre de vapor, Garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* colectadas en la localidad del Terrero del municipio de Tonatico en el Estado de México. La prueba de inmersión de adultas se realizó de acuerdo a la NOM-ZOO-06-1993 [14].Se utilizó la Prueba de paquete de larvas [15] 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 8.5cm 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% HR durante 24 horas. Las concentraciones evaluadas del aceite de comino 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

En la prueba de inmersión de adultas el aceite esencial de comino redujo en un 68.38±5.34 % la oviposición en la concentración del 5%, observándose un cambio drástico en la concentración al 2.5%, en la cual se inhibió la oviposición en un 20.04%, no teniendo diferencia significativa con las otras concentraciones evaluadas (Fig. 1). El porcentaje de eclosión se vio reducido respecto al control, ya que sólo el 14.03±5% de las larvas eclosionaron con el aceite esencial de comino al 5%; se observa nuevamente un cambio drástico en la concentración al 2.5% ya que aquí eclosionaron el 79.74±9.9% de las larvas, mientras que en el resto de las concentraciones evaluadas no se observaron diferencias significativas (Fig.2). El mayor porcentaje de control que se obtuvo fue de 95.56±0.9 % con el aceite esencial de comino al 5%, mientras que en la concentración del 2.5%, 1.25%, 0.625% y 0.31% de aceite esencial de comino se obtuvo un porcentaje de control del 35.06±5.4, 43.21±7.06, 23.77±0.1, 43.25±2.3% respectivamente (Fig.3). En la prueba de paquete de larvas se obtuvo un 100% de mortalidad en las 5 concentraciones evaluadas (Fig. 4)

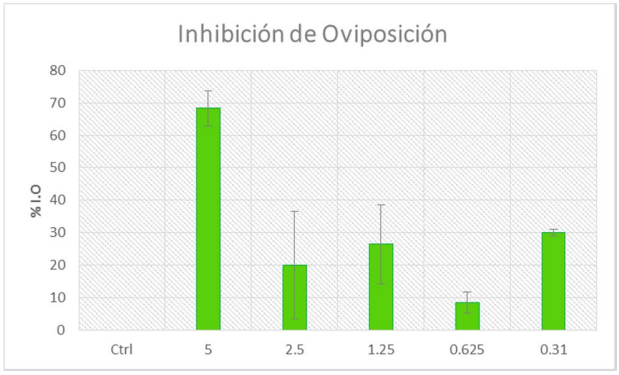


Fig. 1. Porcentaje de inhibición de oviposición en garrapatas adultas tratadas con las diferentes concentraciones del aceite esencial de comino.

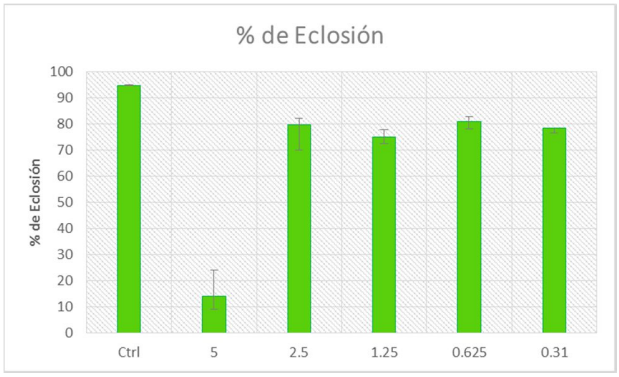


Fig. 2. Porcentaje de eclosión en garrapatas adultas tratadas con las diferentes concentraciones del aceite esencial de comino.

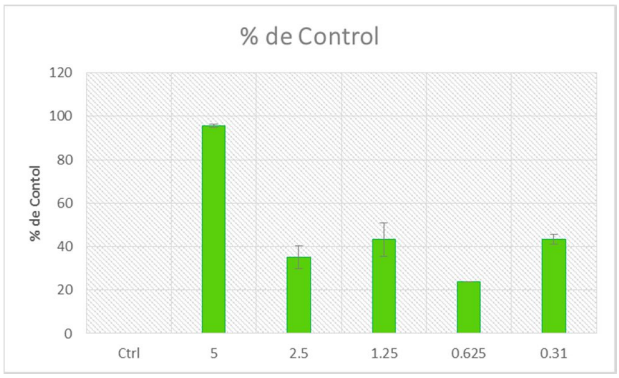


Fig. 3. Porcentaje de control de garrapatas adultas tratadas con las diferentes concentraciones del aceite esencial de comino.

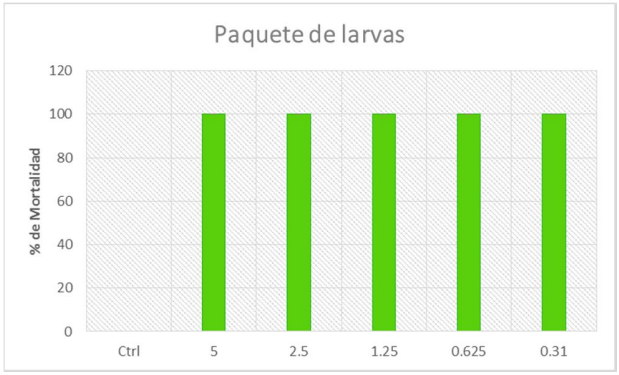


Fig. 4. Porcentaje de mortalidad en larvas de 7 días de eclosionadas tratadas con diferentes concentraciones del aceite esencial de comino.

DISCUSIÓN

Los resultados mostrados nos muestran que los aceites esenciales evaluados tienen actividad acaricida, con porcentaje de mortalidad semejante a los reportados por Chagas *et al*.[16].Los aceites esenciales

de *C. citriodora* y *Eucalyptus staigeriana* mataron al 100% de las garrapatas adultas a una concentración de 10%, mientras que el aceite de *E. globulus* demostró la misma eficacia *in vitro* , pero sólo al doble de la concentración; Contra garrapatas adultas, se observó eficacia de 100% a concentraciones de 25% para *C. citriodora* , 10% para *E. globulus* y 15% para *E. staigeriana*. La comparación de los resultados entre los estudios publicados se complica debido a que diferentes autores han investigado los aceites de diferentes especies de plantas cultivadas en diferentes regiones, es decir, existe una amplia variación o diferencia total en las composiciones.

La evaluación de formulaciones de aceites esenciales amplía el horizonte de la investigación de nuevas fuentes de compuestos bioactivos para el control de parásitos, así como el esclarecimiento de los desafíos para su formulación y aplicación.

CONCLUSIONES

El aceite esencial de *Cyminum cuminum* mostró ser altamente tóxico para garrapatas adultas y larvas de la especie *R. microplus*. Se sugiere evaluar la estabilidad de la actividad acaricida, para poder ser utilizado como alternativa para el control de garrapatas en combinación con otras estrategias, como las vacunas o el manejo integrado de plagas.

REFERENCIAS

[1] Grisi, L., Leite, R.C., Martins, J.R.S., Barros, A.T.M., Andreotti, R, Cançado, P.H.D., et al., 2014. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. Braz. *J. Vet. Parasitol.* 23:15–156.

[2] Lage T.C., Montanari R., Fernandes S.A., Monteiro C.M., Senra T.O., Zeringota V., Matos R., Daemon E.(2015). Chemical composition and acaricidal activity of the essential oil of Baccharis dracunculifolia De Candole (1836) and its constituents nerolidol and limonene on larvae and engorged females of Rhipicephalus microplus (Acari: Ixodidae). *Experimental Parasitology*. 148: 24–29

[3] FAO. 2004. Resistance Management and Integrated Parasite Control in Ruminants: Guidelines. http://www.fao.org/ag/aga.html.

[4] Beverley A.M. (1996) The history of the cattle tick *Boophilus microplus* in Australia and achievements in its control. *Int J Parasitol*. 26:1341–1355. Chagas et al., 2002

[5] Andreotti R, Guerrero F.D., Soares M.A., Barros J.C., Miller R.J., León A.P. (2011) Acaricide resistance of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Bras Parasitol.* 20:127–133

[6] Olivo C.J., Heimerdinger A., Ziech M.F. (2009) Extrato aquoso de fumo em corda no controle do carrapato de bovinos. *Cieˆnc Rural*. 39:1131–1135.

[7] Rodríguez R.I., Alonso M.A., Rodríguez F., Fragoso H., Santamaria V.M., Rosario Cruz (2006) Prevalence and potential risk factors for organophosphate and pyrethroid resistance in *Boophilus microplus* ticks on cattle ranches from the State of Yucatan, Mexico. *Veterinary Parasitology*. 336: 335-342.

[8] Rodríguez R.I., Rivas A.L., Chowell G., Fragoso S.H., Rosario C.R., García Z., Smith S.D, Williams J.J.,Schwager S.J. (2007). Spatial distribution of acaricide proles *Boophilus microplus* (strains susceptible or resistant to acaricides) in south eastern Mexico. *Veterinary Parasitology.* 146: 158-169.

[9] Perez L.C., Rodriguez R.I., Ramirez G.T., Miller R.J. (2010). First report of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* resistant to ivermectin in Mexico. *Veterinary Parasitology.* 168: 165-169.

[10] Fernandez A., Rodriguez R.I., Alonso M.A. (2012). First report of a *Rhipicephalus* microplus tick population multi-resistant to acaricides and ivermectin in the Mexican tropics. Veterinary Parasitology.186: 338-342.

[11] Rodríguez R.I., Rosado J.A., Ojeda M.M., Pérez L.C., Trinidad I, Bolio M.E. (2014) Integrated control of ticks in bovine livestock, *Ecositemas y Recursos Agropecuarios*. 1:295-308.

[12] Thimmappa Shivanandappa and Yallappa Rajashekar. 2014. Mode of Action of Plant-Derived Natural Insecticides. Advances in Plant Biopesticides. Springer India 2014.

[13] Fernandez A., Rodriguez R.I., Alonso M.A. (2012). First report of a *Rhipicephalus* microplus tick population multi-resistant to acaricides and ivermectin in the Mexican tropics. Veterinary Parasitology.186: 338-342

[14] NOM-006-ZOO-1993. Norma Oficial Mexicana requisitos de efectividad biológica para los ixodicidas de uso en bovinos y método de prueba.

[15] Stone, F., and Haydock, P. (1962) A method for measuring the acaricide susceptibility of the cattle *Boophilus microplus* (CAN). Bulletin. Entomology, Vol, 53, p.563-578

[16] Chagas A.C.S., Passos M.W.M., Prates H.T., Leite R.C., Furlong J., Fortes I.C.P. (2002) Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus spp. em Boophilus microplus*. *Braz. J. Vet. Anim. Sci.,* 39 , pp. 247–253

ANTAGONISM OF *Pseudomonas fluorescens* STRAINS AGAINST PATHOGENIC FUNGUS FROM BLUEBERRY

(Antagonismo de cepas de *Pseudomonas fluorescens* contra hongos fitopatógenos de arándano)

Juan Daniel Arellano-Vazquez[a*], Ma. del Carmen Rocha-Granados[a+], Salvador Ochoa-Ascencio[a], Gustavo Santoyo-Pizano[b].

[a]Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez", Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Paseo Lázaro Cárdenas esquina con Berlín, Colonia Viveros, Uruapan, Michoacán, CP60090, México. [b]Centro de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

*Autor que presentó el trabajo.

+Autor para correspondencia: crochagra@hotmail.com

ABSTRACT

Pseudomonas fluorescens strains: UM 16, UM 240 UM UM 256 and 270 were studied in order to evaluate their antagonist effect against three different pathogenic fungus isolated from blueberry roots: *Fusarium* sp., and *Phytophthora cinnamomi*; leaves: *Phomopsis* sp. Tests confrontations under *in vitro* conditions among potato dextrose agar (PDA) culture were taken, to which the bacteria were streaked onto plates in a cross shape, then a segment of mycelium 6mm were deposited each one of the quadrants formed. Furthermore, a bacterial inoculum of each strain beam simultaneously on one side of the petri dish and the other section 6mm mycelial segment of each fungus was inoculated. For both comparisons, the plates were incubated in the dark at 28 °C and the diameter of mycelium was measured each 24 houres for six days. The results showed that all bacterial strains were able to restrict the growth of *Phytophthora cinnamomi*. Contrary to what was observed with *Fusarium* sp. and *Phomopsis* sp, where they fail to restrict growth. Thus, this work shows that *Pseudomonas fluorescens* could be a viable alternative in the biological control of *Phytophthora cinnamomi*, while for other fungus should search alternative control.

Keyword: blueberry, *Pseudomonas fluorensces*, *P. cinnamomi*, *Fusarium* sp. *Phomopsis* sp.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

ANTIFUNGAL EFFECT IN VITRO OF EXTRACTS FROM POMEGRANATE AND JARA METHANOL

(Efecto antifúngico *in vitro* de extractos metanólicos de granada y jara)

Martha Salinas-Sandoval[a], Luis Fernando Ceja-Torres[a*+], Sigifredo López-Díaz[a], Gildardo Rivera-Sánchez[b]

[a] Instituto Politécnico Nacional. CIIDIR UNIDAD MICHOACÁN, Jiquilpan, Michoacán, C.P. 59510. lfceja@ipn.mx
[b] Instituto Politécnico Nacional. Centro de Biotecnología Genómica (CBG), Reynosa, Tamaulipas, C.P. 88710.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: lfceja@ipn.mx, lfceja@latinmail.com

Área del conocimiento: Control Biológico

ABSTRACT
Phytopathogenic fungi are the main cause of crop loss in the Cienega de Chapala region. Its control remains mainly in the use of fungicides. An alternative method that can be sustainable is the biological control using plant extracts. Therefore, the aim of the study was to evaluate the effect of in vitro antifungal activity of pomegranate peel and leaves of jara. Methanol extracts were obtained by maceration during 48 hours at 25°C in darkness and employing distillation under reduced pressure. *Botrytis* and *Rhizoctonia* were isolated from strawberry; *Pestalotiopsis*, *Fusarium* and *Curvularia* from BlackBerry; *Fusarium* and *Pythium* from tomato and *Sclerotium* from onion. These fungi were confronted in vitro with both extracts to determine inhibition of mycelial growth. Bioassays were performed using the technique of casting plate at doses of 50, 100 and 200 µL of each extract and also using a positive control (Tecto 60) and one negative (methanol). The methanol extract of the pomegranate mesoderm inhibited the growth of all the fungi involved in bioassays, except to *Sclerotium rolfsii*. Jara extract inhibited only to *Rhizoctonia solani*. The pomegranate methanolic extract was more effective at a concentration of 200 µL. The qualitative chemical analysis of the extracts revealed the presence of several types of metabolites; flavones and flavonols in both extracts, plus chalcoinas and quinones in pomegranate, as well as alkaloids and sterols in jara.

Keywords: plant extracts, control, Deuteromycetes.

RESUMEN
Los hongos fitopatógenos son la principal causa de pérdidas en cultivos de la región Ciénega de Chapala, su control sigue siendo principalmente, el uso de fungicidas. Una alternativa que puede ser sustentable, es el control biológico mediante la utilización de extractos vegetales, por lo que el objetivo del trabajo fue evaluar el efecto *in vitro* de la actividad antifúngica de cáscara de granada y hojas de jara. Los extractos metanólicos se obtuvieron mediante maceración por 48 horas a 25°C en oscuridad y empleando la destilación bajo presión reducida. *Botrytis* y *Rhizoctonia* fueron aislados de fresa; *Pestalotiopsis*, *Fusarium* y *Curvularia*, de zarzamora; *Fusarium* y *Pythium* de tomate y *Sclerotium* de cebolla. Estos hongos se confrontaron *in vitro* con ambos extractos para determinar inhibición del crecimiento micelial. Los bioensayos se realizaron mediante la técnica de vaciado en placa a dosis de 50, 100 y 200 µL de cada extracto; un control positivo (Tecto 60) y un negativo (metanol). El extracto

metanólico del mesodermo de la granada, inhibió el crecimiento de todos los hongos involucrados en los bioensayos, excepto a *Sclerotium rolfsii*; mientras que el extracto de jara únicamente inhibió a *Rhizoctonia solani*. El extracto metanólico de granada fue más eficaz a la concentración de 200 µL. El análisis químico cualitativo de los extractos reveló la presencia de varios tipos de metabolitos; flavonas y flavonoles en ambos extractos, además chalcoinas y quinonas en granada, así como alcaloides y esteroles, en jara.

Palabras Clave: extractos vegetales, control, Deuteromicetes.

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, los hongos fitopatógenos son la principal causa de pérdidas en la agricultura; ya que ascienden a miles de millones de dólares anualmente. De los diversos microorganismos se sabe que más de 8000 especies de hongos pueden causar enfermedades en las plantas, las cuales pueden ser infectadas por más de una especie [1]. Además, muchos de ellos poseen un riesgo para los consumidores por los metabolitos secundarios que producen [2].

En la actualidad, se han realizado múltiples esfuerzos para controlar las enfermedades de las plantas, mediante el empleo de compuestos químicos sintéticos con efectos fungicidas [3]. Sin embargo, su empleo indiscriminado ha generado problemas considerables, entre los que se incluyen; incremento en los costos de producción, manejo de riesgos, residuos de pesticidas, deterioro y alteraciones del medio ambiente, así como amenazas a la salud humana. Las enfermedades fúngicas también se han vuelto más resistentes a los productos químicos sintéticos actualmente disponibles, por lo que es muy importante que se desarrollen o se identifiquen controles eficaces y amigables con el medio ambiente y el ser humano [4, 5].

Los extractos vegetales, proveen alternativas atractivas con respecto a los fungicidas sintéticos en relación con el control de los hongos fitopatógenos, porque constituyen una fuente rica de químicos bioactivos como son los aceites esenciales, terpenoides, glucosinolatos y quitosano, entre otros. Tal abundancia de compuestos puede ayudar a prevenir la resistencia de los fitopatógenos [6, 7, 8, 9]. Además, son generalmente más seguros que los productos químicos sintéticos porque son rápidamente biodegradados. Por lo tanto, se visualizan los extractos y los metabolitos secundarios, productos potencialmente útiles para la producción de biomoléculas comerciales con propiedades fungicidas [10, 11].

Por lo anterior el objetivo del trabajo fue evaluar el efecto *in vitro* de extractos vegetales sobre algunos hongos patógenos de fresa, zarzamora, tomate y cebolla.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de plantas en estudio y de material vegetativo enfermo. Se colectaron plantas de Jara (*Senecio salignus*) y Granada (*Punica granatum*) en los municipios de Venustiano Carranza y Jiquilpan, Michoacán. La colecta de plantas enfermas del cultivo de fresa, zarzamora, jitomate y cebolla, se realizó en La Sauceda, Los Reyes y Cojumatlán, Michoacán.

Aislamiento y cultivos puros de hongos patógenos. Partes afectadas del fruto, corona y raíz de las plantas colectadas se enjuagaron con agua de la llave, se desinfectaron con NaOCl al 2% y se enjuagaron nuevamente con agua estéril en cuatro ocasiones. Enseguida se secaron en sanitas estériles y se

colocaron en medio de cultivo PDA; finalmente se encubaron a 28°C durante 7 días. Los hongos se purificaron por la técnica de punta de hifa, en agua agar (AA).

Obtención de extractos metanólicos. Estos se prepararon de acuerdo a lo señalado por Quintana-Obregón [12]. Sin embargo la técnica se modificó al hacer uso de plantas frescas, mezclando las hojas de jara y el mesodermo de la granada (100 g de muestra) según el caso, en 300 ml del solvente; se agitó por 15 minutos y se dejó en reposo por 48 horas a 25°C en la oscuridad. Posteriormente se filtró en papel Whatman No. 4. reduciendo el sobrenadante en un rotavapor con vacío (LABCONCO ROTARY EVAPORATOR, LABCONCO CO., USA) entre 45 a 50°C a 150 rpm, de esta manera se obtuvo un concentrado, sin llevar a sequedad [13].

Bioensayo de los extractos metanólicos de Jara y Granada. Las pruebas se realizaron por el método de microdilución, según el protocolo M38-A para hongos filamentosos del NCCLS, ahora Institute for Clinical Laboratory Standard, haciendo modificaciones en las diluciones, debido a que este método está estandarizado para trabajar con compuestos puros por lo que se emplean concentraciones muy bajas. En el caso de los extractos naturales existe una mezcla de compuestos, por lo que se requiere el empleo de concentraciones mayores, utilizando como control negativo el hongo en caldo papa dextrosa (CPD) y control positivo el fungicida Tecto 60. Las concentraciones de los extractos fueron: 50 µl, 100 µl y 200 µl con cada hongo por triplicado. Las placas se dejaron incubar por 48 horas, tomando lecturas de absorbancia a 595 nm. en cada pocillo a las 0, 24 y 48 horas, para observar su desarrollo [14, 15].

Pruebas Cualitativas de los extractos de Jara y Granada. La determinación de compuestos químicos: alcaloides, esteróles, flavonas, flavonoles, chalcoinas y quinonas, se realizaron mediante métodos fitoquímicos colorimetrícos, de acuerdo a la descripción metodológica utilizada por Alarcón y Navarro [16].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación de hongos. Siete géneros de hongos fueron identificados. En el caso de la fresa *Botrytis cinerea* y *Rhizoctonia solani*, de zarzamora *Curvularia sp.*, *Pestalotiopsis sp.* y *Fusarium oxysporum*, de jitomate *Phytium sp. y Fusarium oxysporum*, *y* de cebolla *Sclerotium rolfsii.*

Efecto inhibitorio de extractos vs hongos. El extracto del mesodermo de granada fue el único que ejerció un efecto inhibitorio contra todos los hongos en estudio, excepto contra *S. rolfsii*. En el caso de la jara solo inhibió el crecimiento de *R. solani* (Cuadro 1).

Cuadro 1. Efecto inhibitorio (+) de los extractos de granada y jara contra hongos aislados de fresa, zarzamora, jitomate y cebolla.

Hongos	Extractos Granada	jara
Botrytis cinerea	+	-
Rhizoctonia solani	+	+
Curvularia sp.	+	-
Pestalotiopsis sp.	+	-
Fusarium oxysporum	+	-
Sclerotium rolfsii	-	-

Pythium sp.	+	-

El extracto de granada (200 µL) tuvo un efecto similar al Tecto 60 contra la mayoría de los hongos y a su vez mostró actividad frente a *Curvularia* sp., no así el fungicida sobre este hongo. Una vez medidos los halos de inhibición a 48 horas (Cuadro 2), las cajas se dejaron incubar otras 48 horas y esta actividad persiste a excepción de *Pestaloptiosis sp*., que siguió creciendo. En el caso del extracto de Jara se pudo observar también una inhibición para *Rhizoctonia solani* a 48 horas.

Cuadro 2. Halos de inhibición del extracto de granada contra hongos aislados de fresa, zarzamora, jitomate y cebolla, a 48 de incubación.

Hongos	50 µL	100 µL	200 µL	Metanol	Tecto 60 (1mg/mL)
Botrytis cinerea	1 cm	1.5-1.7 cm	2.3-2.6 cm	-	3 cm
Rhizoctonia solani	1.3-1.4 cm	1.5-1.7 cm	2.2-2.3 cm	-	3.5 cm
Curvularia sp.	0.9-1 cm	1.6-1.7 cm	2-2.3 cm	-	-
Pestalotiopsis sp.	1.2 cm	1.8 cm	2.2 cm	-	2 cm
Fusarium oxysporum	1.2-1.3 cm	1.9-2 cm	2-2.2 cm	-	3 cm
Sclerotium rolfsii Pythium sp.	- 1.5 cm	- 2 cm	- 2.3-2.8	- -	- 3 cm

Identificación de metabolitos secundarios. Mediante pruebas cualitativas se reveló la presencia de seis metabolitos tales como alcaloides, esteroles, flavonas y flavonoles en el extracto de Jara, y alcaloides, flavonas, flavonoles, chalcoinas y quinonas en el extracto de granada. Este contiene una compleja combinación de polifenoles, incluyendo antocianinas y taninos hidrolizables [17]. Otros compuestos encontrados en cáscara de granada con actividad antibacteriana y antifúngica son la castalagina, granatina, catequina, gallocatequina y kemferol o quercetina [18].

CONCLUSIONES

Bajo condiciones *in vitro*, el extracto metanólico de granada inhibió el crecimiento de *Botrytis cinerea* y *Rhizoctonia solani*, aislados del cultivo de fresa; *Curvularia sp.*, *Pestalotiopsis sp.* y *Fusarium oxysporum*, de zarzamora; y *Phytium sp.* aislado de jitomate; lo que indica que dicho extracto, contiene principios activos con efecto fungicida. El extracto metanólico de jara, solo inhibió a *Rhizoctonia solani*.

REFERENCIAS

[1] Rodríguez, G.M.P. (2001). Biodiversidad de los hongos fitopatógenos del suelo de México. Acta Zool. Mex. (1): 53-78.

[2] Fletcher, J., Bender, C., Bodowle, B., Cobb, W.T., Gold, S.E., Ishimaru, C.A. (2006). Plant pathogen forensics capabilities, needs, and recomendations. Microb Mol Biol, (70): 450-471.

[3] Bullerman, N. P. (1988). Mould spoilage and mycotoxin formation in grains as controlled by physical means. International Journal of Food Microbiology, 7 (3): 257-265.

[4] ISHII, H. (2006). Impact of Fungicide Resistance in Plant Pathogens on Crop Disease Control and Agricultural Environment. Japan Agricultural Research Quarterly, 40 (3): 205-211.

[5] Deising, H.B., Reimann S., Pascholati, S.F. (2008). Mechanisms and significance of fungicide resistance. Brazilian Journal Microbiology , 39 (2): 286-295.

[6] Tripathi, P., Dubey, N. (2004). Explotation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruits and vegetables. Postharvest Biology and Technology, 32 (3): 235-245.

[7] Bajpai, V. K., Yoon, J. I., Kang, S. C. (2009). Antifungal potential of essential oil and various organic extracts of Nandina domestica Thunb. against skin infectious fungal pathogens. Applied Microbiology & Biotechnology (Academic Journal), 83 (6): 1127-1133.

[8] Mahlo, S., McGaw, L., Eloff, J. (2010). Antifungal activity of leaf extracts from South African trees against plant pathogens. Crop Protection, 29 (12): 1529-1533.

[9] Song, Q.Y., Qi, W.Y., Li, Z.M., Zhao, J., Chen, J.J., Gao, K. (2011). Antifungal activities of triterpenoids from the roots of Astilbe myriantha Diels. Food Chemistry, 128 (2): 495-499.

[10] Kim, M.K., Choi, G.J., Lee, H.S. (2003). Fungicidal property of Curcuma longa L. rhizome derived curcumin against phytopathogenic fungi in Green house. Journal of Agricultural and Food Chemestry, 51 (6): 1578-1581.

[11] Kumar V.P., Chauhan, N.S., Padh, H., Rahani N. (2006). Search for antibacterial and antifungal agents from selected Indian medicinal Plants. Journal of Ethnopharmacology, 107 (2): 182-188.

[12] Quintana-Obregón, E.A., Plascencia-Jatomea, M., Burgos-Hernández, A., Guerrero-Ruíz, J.C., Parra-Vergara, N.V., Cortez-Rocha, M.O. (2010). Extracto metanólico de *Datura stramonium* para el control *in vitro* e *in vivo* de *Ramularia cercosporelloides*, agente causal de la falsa cenicilla del cártamo (*Carthamus tinctorius*). Revista Mexicana de Micologia, (31): 19-27.

[13] López, M. V., Sánchez, O.M.S., Bonilla, C.C.R., Gallo, P.I. (2006). Evaluación de extractos vegetales para manejo de hongos patógenos en banano y fresa almacenados. Acta Agron, 55 (4): 39-44.

[14] Liu, M., Seidel, V., Katerere, D. R., Gray, A. I. (2007). Colorimetric broth microdilution method for the antifungal screening of plant extracts against yeasts. Methods, 42 (4): 325-329.

[15] Victorio, G. B., Núñez, G. C., Plascencia, A., Mendoza, C.C., Rivera, F.V., Hernández, M. D., Cañaveral, I.I. (2008). Determinación de sensibilidad y CMI de caspofungina en cepas multirresistentes de *Candida albicans* y *Candida tropicalis* mediante la técnica de microdilución. Enfermedades infecciosas y microbiologia, 28 (4): 142-144.

[16] Alarcón, J., Navarro, C. (2012). Determinación de la presencia de algunos compuestos químicos por métodos fitoquímicos colorimetrícos en cinco especies forrajeras. Rev Sist Prod Agroecol, 3 (1): 57-72.

[17] Martin, K.R., Krueger, C.G., Rodríguez, G., Dreher, M., Reed, J.D. (2009). Development of a Novel Standard and New Method for the Quantitative Measurement of Pomegranate Polyphenols. Journal of the Science of Food and Agriculture, (89): 157-162.

[18] Jayaprakasha, G.K., Negi, P.S., Jena, B.S. (2006). Antimicrobial Activities of Pomegranate. In: Seeram, N.P., Schulman, R.N., Heber, D. (eds). Pomegranates: Ancient Roots to Modern Medicine, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp.167-183.

BACTERIAL ISOLATES OBTAINED DURING INFECTION OF THE TICK *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* WITH POTENTIAL USE AS BIO-ACARICIDES

(Aislados bacterianos obtenidos durante la infección de la garrapata del ganado *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* con uso potencial como bio-acaricida)

Bernardo Sachman-Ruiz[a*+], Estefhan Miranda-Miranda, Enrique Reynaud[b] and Raquel Cossio-Bayugar[a].

[a] Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, Colonia Progreso Jiutepec, Morelos, México.
[b] Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: sachman.bernardo@inifap.gob.mx

Área del Conocimiento: Control Biológico.

ABSTRACT.
Rhipicephalus (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae) is causing great economic loss, by the loss of weight in the cattle, and also the transmission of other important diseases such as babesiosis and anaplasmosis. In southeastern Mexico, the acaricide resistance of *R. microplus* is a major problem for the cattle industry, so the research and use of bio-controls, start to be an important option to technological development. Recently we found that approximately 5% of engorged female ticks showed symptoms of bacterial infection. The affected ticks were unable to oviposit and eventually died. Several studies have reported bacterial isolates obtained from exudates of infected ticks, mainly focused on the genus *Staphylococcus.* It was the objective of these work to know the microbiome involve in the infected ticks by ribotiping analyses. We found 62 bacterial isolates that are involved in the disease and/or as part of the microbiome of the tick. *Staphylococcus saprophyticus* is the most commonly isolated with 16; plus 23 isolates that belong to *Staphylococcus* genus; 18 to genus *Enterococcus*; 4 to *Actinobacter*; and 1 to genus *Pseudomonas*. Our study shows that more bacteria specie can be involve in the infection and underlines the importance to asses this interaction to find a formulation of these bacterial isolates that can be useful in the bio-control of the cattle tick.

Keywords: tick; bacteria isolates; infection; bio-control.

Agradecimientos
Al financiamiento de los proyectos No. SIGI: 10325633198 SIGI: 11392133589 No. CONACYT 248049.

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES OF *Diatraea magnifactella* FROM SOIL OF SUGARCANE CROPS OF MORELOS STATE

(Aislamiento e identificación de nematodos entomopatógenas a *Diatraea magnifactella* en cultivos de suelos de caña de azúcar del estado de morelos)

Christian Jesús Flores Bahena[1ab], Ramón Suárez Rodríguez[b], Verónica Obregón Barbosa[b], Laura Patricia Lina García[b], Elba Cristina Villegas Villarreal[ab*+].

[1a] Maestría en Biotecnología' [a]Laboratorio de Estructura-Función e Ingeniería de Proteínas,
[b]Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB), Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Av. Universidad 1001, Cuernavaca, Morelos 62210 México.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: elbav@uaem.mx

Área del Conocimiento: Control Biológico.

ABSTRACT
Diatraea magnifactella (*D. magnifactella*) larvae among other pests are one of the major economic importance affecting sugarcane crops in Morelos. For several decades chemical products have been used to a greater extent to control them, however these compounds have generated damage to human health and the environment, because of that there is a need to seek new alternatives to reduce chemical use to control pest. Soil is a favorable environment to seek for entomopathogenic nematodes (EPNs), in this study the possibility find EPNs from the same soil using first *Galleria mellonella* (*G. mellonella*) larvae as a bait and then *D. magnifactella* was explored after several failed attemps to aisolate EPNS from *D. magnifactella.* Ten samples of soil from different sugar cane guava, tomato, grass and bush soil fields were used to investigate them as a source of EPNs. Soil samples were divided into 500 g with 0.01 mg/mL of fluconazole. Five larvae of *G. mellonella* or *D. magnifactella* were placed as a bait in the soil sample. After 10 days in each type of soil *G. mellonella* larvae gave positive for EPNs but not from *D. magnifactella* larvae. Then EPNs from *G. mellonella* larvae were used to infect *D. magnifactella*, Both *G. mellonella* and *D. magnifactella* larvae at first presented the typical signs of infection an orange color that latter turn on red brick for the first one and a color change from light brown to dark red for the last one. Seven populations of EPNs were isolated only from sugar cane soil and kept for further studies on *G. mellonella* larvae. Koch's postulates were performed to verify that the isolated nematodes were infective to both *G. mellonell*a and *D. magnifactella*, using three nematodes concentration 100, 500 and 1000 EPNS/larvae a 100% of mortality in *G. mellonella* and *D. magnifactella*. However a DL_{50} or CL_{50} value are being determined.

Keyords: Enthomophatogenic Nematodes, *Galleria mellonella, Diatraea magnifactella*.

USE OF BACTERIOPHAGES AS BIOLOGICAL CONTROL AGENTS OF BEAN HALO BLIGHT CAUSED BY *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*

(Uso de bacteriófagos como agentes de control biológico del tizón de halo del frijol causado por *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*)

Rafael de Jesus Mendoza-Gómez[a]*, Evangelina Quiñones-Aguilar[a], Joaquín Qui-Zapata[a], Gabriel Rincón-Enríquez[a+]

[a]Unidad de Biotecnología Vegetal del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A. C. (CIATEJ).

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: grincon@ciatej.mx.

Área del Conocimiento: Control Biológico.

ABSTRACT
The bacterial plant disease etiology is a cause of major economic losses in agriculture and one of the biggest challenges today is its efficient control. In Mexico the importance of beans in food is that it is a great source of protein, mainly concerning lysine. The species *Phaseolus vulgaris* (common bean) is the most important in human nutrition and cultivated from sea level to 2700 m high. The problem is that in bean´s crop is developing bacterial blights with incidence independently or combined: common blight induced by *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Xcp) and halo blight caused by *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Psph). Therefore and based on that bacteriophages, last organisms to be discovered and more ubiquitous in nature, are specific, efficient and do not cause any damage or plant, or the soil, or the surrounding environment, are a viable alternative, friendly to the environment and biological control which together with other phytosanitary measures has confirmed its ability to reduce and control the disease. The aim of this work was isolate the agent that causes halo blight and identification molecularly with the isolate in fact of the bacteriophages can lysates this bacterium. Therefore, this work sought isolation of the causative agent of the disease Psph from the focus of infection in two sampling periods (june and september 2014); was primarily selected the fluorescence of this bacterium when grown on King's medium B low iron (KB); was grown in KB liquid and subsequent frozen -80°C strains most appreciated as possible *Pseudomonas*, we worked with an *in-silico* analysis using the technique of ITS-PCR expansion of inter-ribosomal genes; molecularly identified 16S and 23S for identification to species level. Later he worked with soil samples taken from the same site of infection in the field, and possible bacteriophages were isolated with bactericidal effect and proving its effect by a double-layer in search of zones of inhibition to the possible strains of *Pseudomonas*.

Keywords: *Pseudomonas*, ITS-PCR, halo blight, beans, bacteriophages, biocontrol bacterial diseases.

USE OF *Trichoderma sp.*, ISOLATES FOR BIOLOGICAL CONTROL OF *Alternaria alternata* IN AVOCADO FRUIT (*Persea americana* Mill)

[Uso de cepas de *Trichoderma sp.*, como control biológico de *Alternaria alternata* en fruto de aguacate (*Persea americana* Mill)]

Jaime Alberto Madrigal Pulido *[a+], Olga Avalos García [a], Melesio Gutiérrez Lomelí [a], Carmen Lizette Del Toro Sánchez [a]

[a] Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de la Ciénega. Av. Universidad 1115, Col. Lindavista 47820, Ocotlán, Jalisco, México. Departamento de Ciencias Médicas y de la Vida

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: amadrigal_pulido@yahoo.com

Área del Conocimiento: Control Biológico.

ABSTRACT
Introduction: Mexico is the main producing of avocado fruit, however, this fruit is susceptible to be damage in postharvest for phytophatogenic fungi like *Alternaria alternata*, an alternative to combat this pathogen is the biological control by *Trichoderma* species obtained in cultivations of avocado. Objetive: to evaluate the antagonistic capacity of *Trichoderma* sp. isolated as biological control of the fungi pathogen *Alternaria alternata* of avocado fruit. Methodology: For the analysis of the antagonistic properties of the isolated, one carries out through confrontations between isolated in PDA of the different isolates of *Trichoderma* and *Alternaria alternata*, obtaining the percentage of inhibition. Likewise, it was proven *in vitro* the property of the compounds that *Trichoderma* secretes to inhibit the development of the pathogen, when adding two supernatant concentrations (100 and 200 µl) in solid PDA and placing the pathogen on this. Results: In the confrontations of *Trichoderma* sp. and the pathogen the percentages of inhibition of the phytopathogen were of 76% to 85% of *Alternaria alternata*. Additionally, the 2 supernatant concentrations containing the compounds secreted by *Trichoderma* isolated, they presented a good capacity of inhibition of the growth of *Alternaria alternata* since to the 4th day of test the inhibition of the development was from 70% to 100%. Conclusions: The use of isolated of *Trichoderma* of avocado cultivations against *Alternaria alternata* is a good use alternative as biological control to conserve the avocado fruit in postharvest.

Keywords: Avocado fruit, postharvest, phytopathogen, biological control.

RESUMEN
Introducción: México es el principal productor a nivel mundial de aguacate, sin embargo, el fruto de aguacate es susceptible a sufrir daños en poscosecha por fitopatógenos como *Alternaria alternata*, una alternativa para combatir dicho patógeno lo representa el control biológico mediante aislados de *Trichoderma* sp. obtenidos en cultivos de aguacate. Objetivo: Evaluar la capacidad antagónica de aislados de *Trichoderma* sp. como control biológico del hongo patógeno de fruto de aguacate *Alternaria alternata*. Metodología: El análisis de las propiedades antagónicas de los aislados, se realizó a través de confrontaciones en medio PDA sólido de las distintos aislados de *Trichoderma* y *Alternaria alternata*,

obteniendo el porcentaje de inhibición de *Trichoderma* sobre el patógeno. Así mismo se probó *in vitro* la propiedad de los compuestos que secreta *Trichoderma* para inhibir el desarrollo del patógeno, al agregar dos concentraciones de sobrenadante (100 y 200 µl) en medio PDA sólido y colocando el patógeno sobre dicho medio. Resultados: En las confrontaciones de los aislados de *Trichoderma* sp. se observaron porcentajes de inhibición del fitopatógeno *Alternaria alternata* de 76 % a 85 %. Y además, las 2 concentraciones de sobrenadante conteniendo los compuestos secretados por los aislados de *Trichoderma*, presentaron buena capacidad de inhibición del crecimiento de *Alternaria alternata* ya que al 4to día de prueba la inhibición del desarrollo fue del 70 % al 100 %.Conclusiones: La utilización de aislados de *Trichoderma* de cultivos de aguacate contra *Alternaria alternata* es una buena alternativa de uso como control biológico para conservar el fruto de aguacate en poscosecha.

Palabras Clave: Aguacate, poscosecha, fitopatógenos, control biológico.

INTRODUCCIÓN

México es el principal productor a nivel mundial de aguacate (*Persea americana* Mill), por lo que el cultivo de este fruto y su comercialización constituye una importante actividad económica. El fruto de aguacate es muy apreciado por su alto contenido de aceites, hidratos de carbono, proteínas y vitaminas; además, tiene alto potencial agroindustrial [1]. En México, la superficie ocupada por este cultivo es de 175 939 Ha, con una producción reportada de 1,520,694 Ton, la cual tuvo un valor estimado de 20,715,986 pesos en el 2014; el mayor productor de aguacate es el estado de Michoacán con más del 80 % de la producción nacional [2].

Uno de los problemas que enfrentan los productores de aguacate son las enfermedades generadas por hongos fitopatógenos que atacan al fruto en la etapa poscosecha, ya que afectan su calidad, lo que constituye un problema para su posterior comercialización, sobretodo en la exportación del producto. Sin embargo, la detección de enfermedades durante la cosecha resulta difícil debido a que su manifestación se presenta cuando el fruto comienza su ablandamiento en la maduración, de esta manera, resulta importante para el productor el poder reducir los daños en el fruto causados por la presencia de patógenos en la etapa poscosecha [3].

El hongo *A. alternata* es un fitopatógeno que causa daños a los frutos de aguacate tanto en su aspecto como en su sabor, lo que repercute de manera negativa su comercialización. De forma tradicional el control de los fitopatógenos se ha realizado mediante el uso de fungicidas químicos, los cuales presentan el inconveniente que causan daño a la salud así como contaminación ambiental. Esta situación plantea la necesidad de encontrar alternativas de origen biológico que eviten al productor la aplicación de fungicidas para el control de enfermedades en frutas y vegetales. En este sentido, se menciona que existe una creciente valorización del uso de productos naturales, considerados confiables y seguros para el control de fitopatógenos [4].

En este contexto, se ha observado que los hongos del genero *Trichoderma* poseen características que lo convierten en organismos ecológicamente exitosos, y que se les puede encontrar casi en cualquier ambiente natural [5]. Diversas especies de *Trichoderma* como *T. r*eesei, *T. Harzanium* y *T. viride*, por mencionar algunos, son extensamente utilizadas en la agricultura e industria para la producción de proteínas; además, sustancias aisladas a partir de estas especies son utilizadas como biocontroladores o biopesticidas, bioprotectantes, bioestimuladores o biofertilizantes para una gran variedad de plantas. El

éxito de la acción biocontroladora que *Trichoderma* ejerce sobre el desarrollo de hongos fitopatógenos radica en los distintos mecanismos de acción, siendo estos la competencia por espacio, por nutrientes, el micoparasitismo, la antibiosis y la producción de metabolitos secundarios [6]. Por estas razones, el hongo *Trichoderma* es considerado como un buen organismo para ser utilizado como agente de control biológico de fitopatógenos.

En este trabajo se utilizaron 6 cepas de *Trichoderma* que fueron aisladas de zonas de cultivo de aguacate (de las cuales TAV4 y TAV6 corresponden a *T. virens*, TAT1 y TAT3 a *T. harzianum*, mientras que TAT6 y TAT7 a *T. koningiopsis*), para su utilización como organismos de control biológico del hongo *A. alternata* causante de daños en el fruto de aguacate. Con este propósito, fue probada la capacidad de los aislados de inhibir el crecimiento del patógeno *in vitro*; así mismo, fueron analizadas las propiedades que poseen los compuestos secretados por *Trichoderma* para detener el desarrollo de *A. alternata*.

METODOLOGÍA

Para la evaluación de la capacidad antagónica que ejercen las cepas del hongo *Trichoderma* sp. aisladas de zonas de cultivo de aguacate sobre *A. alternata* se utilizó la técnica de confrontación sugerida por Ibarra-Medina [7] como se describe a continuación: para la confrontación se realizó un cultivo previo de cada una de cepas aisladas y del fitopatógeno (*A. alternata*) en cajas de Petri con medio PDA y se incubaron a 28 ° C durante 5 días. Posteriormente, para la confrontación de las cepas, se tomaron cortes de micelio de 2 mm de diámetro de las cajas de Petri y se colocaron, con una pinza estéril. En nuevas cajas de Petri con medio PDA sólido, el corte de micelio de *Trichoderma* sp. fue colocado en un extremo de la caja de Petri y el corte del hongo fitopatógeno en el extremo opuesto de la caja. Además, como control, se colocaron cortes de micelio individuales de cada una de las cepas analizadas en medio PDA. Estas cajas se dejaron a 28 °C durante 7 días. Para establecer el nivel de inhibición de los aislados de *Trichoderma* sp. sobre *A. alternata*, se midió el crecimiento de micelio de las cepas en las cajas de Petri cada 12 h durante los 7 días, calculando el porcentaje de inhibición del hongo antagonista sobre el fitopatógeno.

Por su parte, el análisis de las propiedades antifúngicas de los compuestos secretados por los aislados de *Trichoderma* sp. se realizó de la siguiente manera: En matraces de 100 ml se colocaron 20 ml de medio PDA líquido, y se inocularon con una concentración de 1×10^7 conidias del aislado de *Trichoderma*, incubándose a 28 °C y a 120 rpm durante 24 h. Al término de este tiempo se agregó 0.2 g de micelio seco de *A. alternata* con el fin de estimular la secreción de los compuestos por parte de *Trichoderma*. Después de 72 h, se centrifugó el contenido del matraz, recuperando el sobrenadante, el cual fue filtrado. El sobrenadante obtenido, se utilizó para la preparación de cajas Petri con medio PDA sólido, agregándole 2 concentraciones del sobrenadante (100 y 200 µl/ml). La inhibición del crecimiento del patógeno fue probada al colocar un corte de 2 mm de micelio del patógeno en el centro de la caja de Petri con el medio PDA sólido conteniendo la concentración del sobrenadante. El porcentaje de inhibición del patógeno mediante los compuestos secretados por los aislados de *Trichoderma*, se estableció al realizar la medición de su crecimiento cada 24 h durante 4 días, comparándolas contra el crecimiento del patógeno solo en medio PDA.

RESULTADOS

Con el fin de analizar la capacidad antagónica que tienen los aislados de *Trichoderma* para controlar el desarrollo de hongo *A. alternata* causante de daños en el fruto de aguacate, se realizaron pruebas *in vitro* mediante la técnica de confrontación durante un periodo de 144 h (7 días) (Figura 1), observándose un incremento del porcentaje de inhibición en el desarrollo del patógeno a partir de las 48 h por parte de todos los aislados, y alcanzando un máximo de inhibición del 97 y 98 % por parte de los aislados TAT6 y TAT7 (*T. harzianum*) respectivamente a las 96 h. Así mismo, el aislado TAT1 (*T. koningiopsis)* alcanzó el 100 % de inhibición del patógeno pero hasta las 144 h.

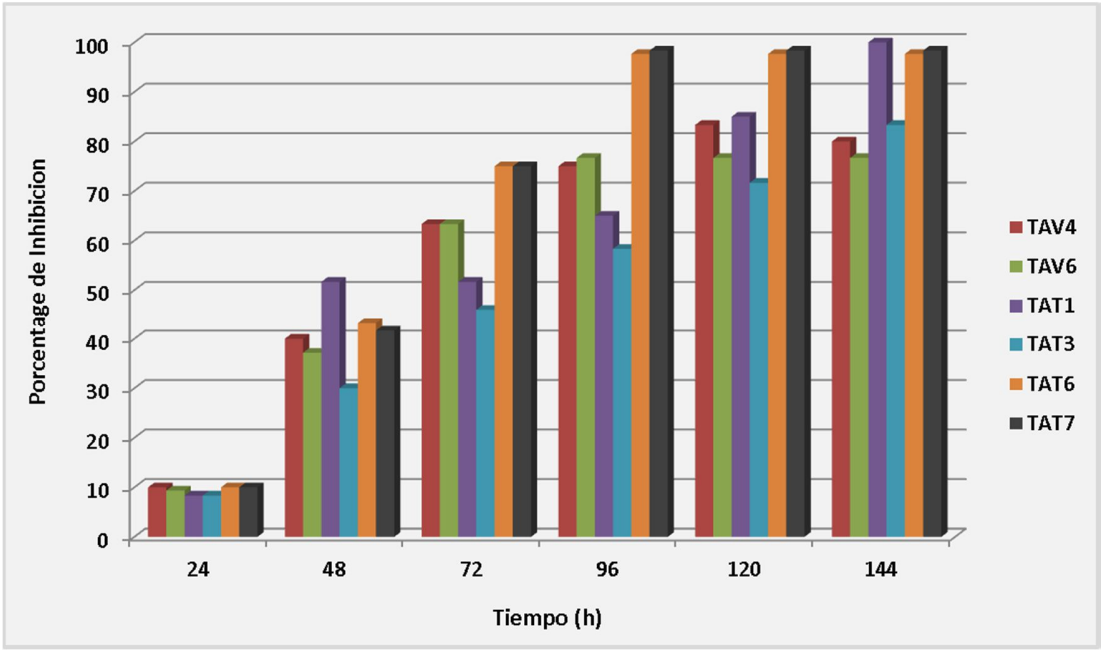


Figura 1. Resultados del análisis *in vitro* de la capacidad de inhibición de los aislados de *Trichoderma* sobre *A. alternata* realizado durante 144 h. TAV4, TAV6: *T. virens*; TAT1, TAT3: *T. koningiopsis*; TAT6, TAT7: *T. harzianum*.

Las cepas de *Trichoderma* utilizan varios mecanismos que le permiten inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos. Entre los mecanismos que podemos mencionar se encuentran el micoparasitismo, la competencia por el espacio mediante una alta velocidad de crecimiento y la secreción de compuestos con actividad antimicótica. En este sentido, se probó si los aislados de zonas aguacateras excretarían compuestos que posean la capacidad para evitar que el fitopatógeno *A. alternata* se desarrolle. Los resultados de los análisis *in vitro* llevados a cabo son presentados en la figura 2, en donde se puede observar que los compuestos secretados por uno de los aislados, TAT6 puede evitar el crecimiento de *A. alternata* en un 83 % en solo 48 h; incrementándose este porcentaje hasta un 94 % a las 96 h; mientras que, los aislados TAT7 y TAV4 alcanzan el 80 % de inhibición del crecimiento del patógeno a las 72 h.

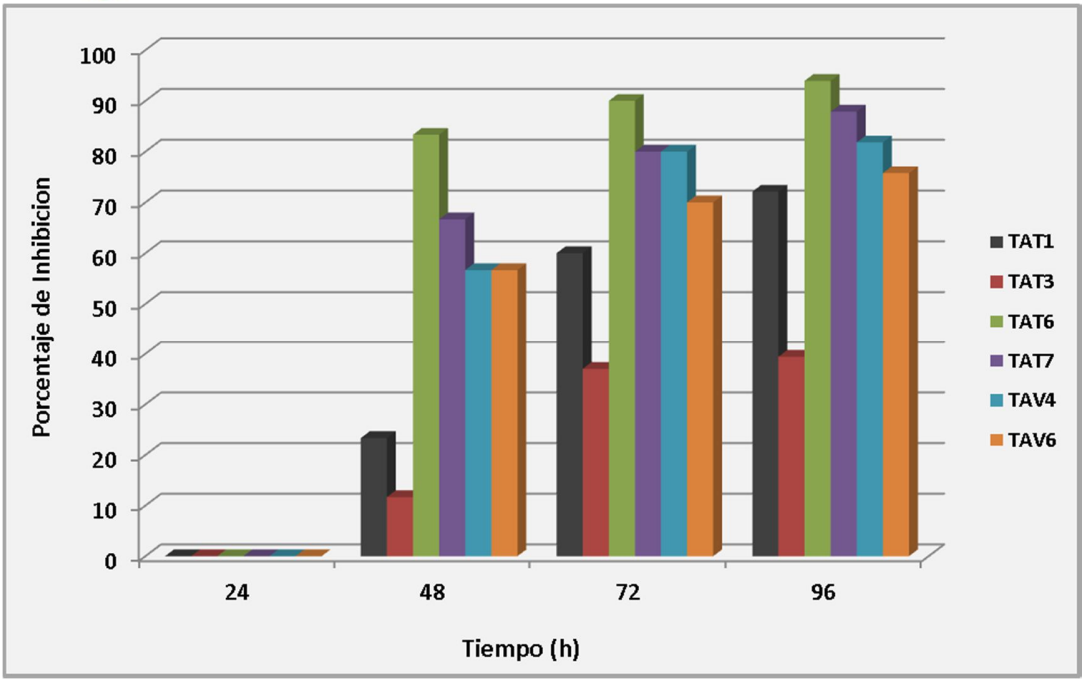


Figura 2. Análisis de la capacidad de inhibición del crecimiento de *A. alternata* de los compuestos secretados durante 96 h por los aislados de *Trichoderma* en medio líquido. Se observa el porcentaje de inhibición de crecimiento que ejercen estos compuestos secretados por los 6 aislados de *Trichoderma*.

DISCUSIONES

El fruto de aguacate es susceptible a ser dañado por el ataque de organismos patógenos como el hongo fitopatógeno *A. alternata* que dañan la calidad del fruto. Las especies del hongo *Trichoderma* pueden ser utilizadas como una alternativa de control biológico de estos patógenos. En este trabajo, las pruebas realizadas *in vitro* nos permitieron observar que los aislados obtenidos de zonas de cultivo de aguacate poseen una buena capacidad para inhibir el desarrollo de *A. alternata*, evitando su desarrollo. Esta inhibición fue, en el caso de los aislados TAT6 y TAT7, de más de un 97 % en solo 4 días (96 h). Así mismo, la prueba de las propiedades antifungicas de las secreciones de los aislados de *Trichoderma* nos mostraron que los compuestos secretados por el aislado TAT6 puede inhibir hasta un 94 % del desarrollo del hongo *A. alternata*, causante de enfermedades en el fruto de aguacate, por lo que la utilización de estas secreciones de este aislado, como inhibidor del desarrollo del patógeno en el fruto, podría representar una buena opción para el producto.

CONCLUSIONES

Existe una creciente preocupación por disminuir la utilización de productos químicos para el control de organismos patógenos causantes de daños en los frutos. Las especies del hongo *Trichoderma* son de los organismos de control biológico más utilizados con este propósito. Los resultados observados en el presente trabajo nos permiten mencionar que la utilización de especies de *Trichoderma* representan

una buena alternativa de origen natural contra el desarrollo de hongos fitopatógenos como *A. alternata* en el fruto de aguacate.

REFERENCIAS

[1] Galindo, T. M., Ogata A. N., Arzate, F. A., (2008), "Some aspects of avocado (*Persea americana* Mill.) diversity and domestication in Mesoamerica", Genetic Resources and Crop Evolution, 55: 441-450.

[2] Servicio de Información Agroalimentaria y pesquera (SIAP). Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). http://www.siap.gob.mx

[3] Tamayo-Molano, P. J., (2007), "Enfermedades del Aguacate", Politécnica, 4: 51-70.

[4] McSpadden, G. B., y Driks, A., (2004), "Overview of the Nature and Application of Biocontrol Microbes: *Bacillus* spp", Phytopathology, 94 (11): 1244.

[5] Monte, E., (2004), "Understanding *Trichoderma*: Between biotechnology and microbial ecology", Int. Microbiol, 4: 1-4.

[6] Infante, D., Martinez, B., Gonzalez, N., Reyes, Y., (2009). "Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatópatogenos", Rev. Protrccion Veg., 24 (1): 14-21.

[7] Ibarra-Medina, V., Ferrera-Cerrato, R., Alarcon, A., (2010). "Aislamiento y selección de cepas de *Trichoderma* antagonistas a *Sclerotia sclerotium* y *Sclerotia minor*, Revista Mexicana de Micología, 31: 53-63.

A POTATO-ISOLATED ENDOPHYTIC BIOFORMULATION AS BIOCONTROL AGENT AGAINST *Rhizoctonia solani, Fusarium oxysporum* AND *Phytophthora infestans*

(Elaboración de una bioformulación de bacterias endófitas de papa (*Solanum tuberosum*) como control biológico contra *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* y *Phytophthora infestans*)

Enrique Tinajero-Cortés[a]*, Julia del Carmen Martínez-Rodríguez[b], Marcela De la Mora-Amutio[b], Tetsuya Ogura[b].

[a] Centro de Investigación en Biotecnología aplicada, CIBA Tlaxcala-IPN, Ex-Hacienda San Juan Molino Carretera Estatal Tecuexcomac-Tepetitla Km 1.5, Tlaxcala C.P. 90700, México
[b] Departamento de Química, Universidad Autónoma de Guadalajara (UAG). Av. Patria 1201, Col. Lomas del Valle, CP 45129, Zapopan, Jalisco, México

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: e.tinajerocortes@gmail.com

Área del Conocimiento: Control biológico.

ABSTRACT
Potato is one of the most important crop worldwide and yet its production is highly susceptible to pathogens attack, mainly by fungi due to the lack of resistant commercial cultivars. Fungal disease control is conducted primarily through chemical pesticides, but due to high levels of environmental contamination, public health problems and resistance to fungicides developed by pathogens, research for alternatives are being explored. Bacterial endophytes have high potential as biocontrol agents because of the wide range of biologically active compounds they produce. In this work 10 healthy looking potato plants were collected from a commercial orchard in Michoacán, México, they were dissected in their different tissues (Leaves, stem, fruits, tubers and roots) and surface disinfected to exclude the epiphytic bacteria. A total of 147 isolates were initially obtained and pre-selected by biochemical trails, gram staining and morphological analysis, leaving 98 strains for *in vitro* direct antagonism assays. Twelve endophytic strains were selected based on their ability to inhibit mycelial growth *in vitro*, and then identified by MALDI/TOF mass spectrometry and 16s RNA gene sequencing. Selected endophytic strains showed fungal inhibition percentages up to 70.6 for *R. solani*, 32.4 for *F. oxysporum* and 43.8 for *P. infestans,* and belong to *Pseudomonas* and *Bacillus* genera. Bacterial compatibility, lipopeptide and siderophores production assays were performed in order to develop a bioformulation for greenhouse assays. We propose the application of an endophytic bacteria bioformulation against three potato fungal pathogens: *Fusarium oxysporum, Rhizoctonia solani and Phytophthora infestans.*

Keywords: Biocontrol, endophytes, potato, fungal pathogens.

BIOLOGICAL CONTROL OF *Cladosporium sp.,* IN PITAHAYA (*Hylocereus* sp.) FRUITS THROUGH OF ISOLATED OF *Trichoderma* sp.

(Control biológico de *Cladosporium sp.* en frutos de Pitahaya (*Hylocereus* sp.) mediante el uso de aislados de *Trichoderma sp*.)

Olga Avalos García*[a], Jaime Alberto Madrigal Pulido[a+], Carmen Lizette Del Toro Sánchez[a], Melesio Gutiérrez Lomelí[a].

[a] Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de la Ciénega. Av. Universidad 1115, Col. Lindavista 47820, Ocotlán, Jalisco, México. Departamento de Ciencias Médicas y de la Vida

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: jamp72@yahoo.com

Área del Conocimiento: Control Biológico.

ABSTRACT
The pitahaya (*Hylocereus* sp.) is a cactaceae that is cultivated in México and several countries, its fruit has a great demand. Among the illnesses that attack to the pitahaya we can mention the fruit decay by the phytopathogen *Cladosporium sp*. what represents economic losses to the producer. Objective: To carry out the evaluation of the antagonistic capacity of isolated of *Trichoderma sp*. as biological control of the pitahaya fruit against the pathogen *Cladosporium sp*. Methodology: The analysis of the antagonistic properties of the isolated was carried out through confrontations in PDA medium of the different *Trichoderma* isolates and the phytopathogen *Cladosporium sp*. obtaining the percentage of inhibition. Additionally, the capacity of the secreted compounds by *Trichoderma* to stop the growth of the phytopathogen, was carried out adding the supernatant obtained from *Trichoderma* to a solid medium and, after that the pathogen was placed on this. Results: In the confrontations of *Trichoderma* with *Cladosporium* sp., a growth inhibition of 68% to 82% was observed. In relation with the compounds secreted after five days of test, it was observed that four of the six isolates have a good antagonistic activity against the phytopatogen (90 to 100% of inhibition). Conclusions: The use of isolated of *Trichoderma* as biological alternative for the control of *Cladosporium* sp. of the pitahaya fruit, is a viable option due to the high capacity to inhibit the development of this pathogen.

Keywords: Pitahaya fruit; biological control.

RESUMEN
La pitahaya (*Hylocereus* sp.) es una cactácea que es cultivada en México y varios países, su fruto tiene una alta demanda. Entre las enfermedades que atacan la pitahaya se puede mencionar la pudrición del fruto por el hongo fitopatógeno *Cladosporium* sp. lo que representa pérdidas económicas al productor. Objetivo: Realizar la evaluación de la capacidad antagónica de aislados de *Trichoderma* sp. como control biológico del hongo patógeno del fruto de la pitahaya *Cladosporium* sp. Metodología: El análisis de las propiedades antagónicas de los aislados, se realizó a través de confrontaciones en medio PDA solido de las distintos aislados de *Trichoderma* y el fitopatógeno *Cladosporium* sp. obteniendo, de esta forma, el porcentaje de inhibición de *Trichoderma* sobre el patógeno. Adicionalmente se probó la capacidad que

tienen los compuestos secretados por *Trichoderma* para detener el crecimiento del fitopatógeno, esto fue realizado agregando el sobrenadante obtenido del crecimiento de Trichoderma en medio líquido a medio PDA sólido, y se colocó el patógeno sobre dicho medio. Resultados: En las confrontaciones de los aislados de *Trichoderma* con *Cladosporium* sp. se observó una inhibición del crecimiento del 68 % en los de menor capacidad antagónica y hasta un 82 % en los que presentaron mayor antagonismo. En cuanto a los compuestos secretados en el sobrenadante, al término de los cuatro días de prueba, se observó que cuatro de los seis aislados tienen una buena actividad antagónica contra el fitopatógeno debido a que inhiben su crecimiento en un porcentaje que va desde 90 al 100 %. Conclusiones: El uso de aislados de *Trichoderma* como alternativa biológica para el control *Cladosporium* sp. patógeno del fruto de pitahaya es una opción viable ya que las cepas de *Trichoderma* probadas presentaron una buena capacidad antagónica para inhibir el desarrollo del patógeno.

Palabras Clave: Pitahaya; fruto; control biológico.

INTRODUCCIÓN

En varios países, como Nicaragua, Guatemala, Israel y México, el cultivo de la pitahaya (*Hylocereus* sp.) se ha convertido en una importante actividad económica. De manera particular, en México el fruto de pitahaya es consumido de manera directa o se utiliza para la elaboración de vino, jugos, yogurt, jalea entre otros [1]. La pulpa de la fruta de pitahaya tiene un alto contenido de azúcares como glucosa y fructosa, y posee licopenos, β-carotenos, vitamina C, además, es rica en fibra. [2][3]. Las características que posee el fruto de pitahaya han incrementado su demanda, y por ende su producción, lo que ha generado un aumento de las zonas en las que plantas de *Hylocereus* sp. son cultivadas, pasando de huertos familiares a grandes zonas de cultivo.

Debido a la composición de los frutos de *Hylocereus* sp. estos son susceptibles al deterioro causado por el ataque de hongos fitopatógenos tales como *Colletotrichum gloeosporioides*, *Bipolaris cactivora*, *Fusarium* sp., *Alternaria* sp. y *Cladosporium* sp. Especies del género *Cladosporium* sp. son mencionados como uno de los causantes de pudrición en frutos de pitahaya [4].

Una de las alternativas para el control de los fitopatógenos del fruto de pitahaya es el uso de microorganismos antagonistas que posean la capacidad de evitar la proliferación de los mencionados organismos causantes de la pudrición de la fruta. Bajo ese contexto, existe una creciente valorización del uso de productos naturales, considerados confiables y seguros para el control de fitopatógenos. De esta manera, los microorganismos antagónicos que son empleados como control biológico pueden proporcionar buenos resultados a mediano y largo plazo. El hongo del género *Trichoderma*, es utilizado ampliamente como control biológico, debido a que ha desarrollado una asombrosa habilidad para interactuar de manera parasítica y simbiótica en diferentes sustratos y organismos vivos, incluyendo plantas y otros microorganismos [5].

El propósito de este trabajo es probar la capacidad *in vitro* de 6 aislados del hongo *Trichoderma* como organismo antagónico del hongo patógeno de la fruta de la pitahaya *Cladosporium* sp. Siendo los aislados pertenecientes a las especies a *T. virens* (TAV4 y TAV6), *T. harzianum* (TAT1 y TAT3) y *T. koningiopsis* (TAT6 y TAT7).

METODOLOGÍA

Con el fin de analizar la capacidad que poseen los aislados de *Trichoderma* como antagonistas de *Cladosporium* sp. se llevó a cabo el análisis *In vitro* de la inhibición que éstas ejercen sobre el patógeno de la fruta de pitahaya. Para este propósito fue utilizada la técnica de confrontación, siguiendo la metodología mencionada por Ibarra-Medina y col. [6] como se describe a continuación. De manera inicial se inocularon las cepas en cajas petri con medio sólido PDA y se incubaron a 28 °C. De estas cajas fueron realizados cortes de micelio de 2 mm de diámetro, con una asa estéril, y se trasladó el corte de micelio de *Trichoderma* a una nueva caja petri con medio PDA, colocándolo en un extremo de la caja. Al extremo contrario fue puesto el corte de micelio del fitopatógeno. Los controles fueron establecidos al poner por separado en cajas de petri con medio PDA cortes individuales de micelio de cada una de las cepas (aislados de *Trichoderma* y *Cladosporium* sp.). Las cajas fueron incubadas a 28 °C durante 7 días. Para establecer el nivel de inhibición de los aislados de *Trichoderma* sp. sobre *Cladosporium* sp. fue medido el crecimiento de micelio de las cepas en las cajas de petri cada 24 h, durante un periodo de 7 días, y se estableció el porcentaje de inhibición que ejerce del hongo antagonista sobre el fitopatógeno

Para llevar a cabo el análisis de las propiedades antagónicas de los compuestos secretados por los aislados de *Trichoderma* sp. en contra de *Cladosporium* sp. se utilizó la siguiente metodología: 20 ml de medio PDA líquido, contenido en matraces de 100 ml fueron inoculados con una concentración de 1 x 10^7 conidias del aislado de *Trichoderma*, incubándose a 28 °C y 120 rpm por 24 h. Posteriormente se agregaron 0.2 g de micelio seco de *Cladosporium* sp. con el fin de estimular la secreción de los compuestos por parte de *Trichoderma*. Una vez transcurridas 72 h, se centrifugó el contenido del matraz, recuperando el sobrenadante, y se realizó un filtrado. El sobrenadante filtrado fue utilizado para preparar cajas Petri con medio PDA sólido, a dos concentraciones 100 y 200 µl/ml. La propiedad de inhibir el crecimiento del patógeno por parte de los compuestos excretados por *Trichoderma* fue probada al colocar en el centro de la caja un corte de 2 mm de micelio del patógeno. El porcentaje de inhibición del desarrollo del patógeno se estableció al realizar la medición de su crecimiento cada 24 h durante 4 días, comparándolas contra el crecimiento del patógeno en medio PDA preparado sin presencia de los compuestos.

RESULTADOS

Por medio de confrontaciones en medio PDA se llevó a cabo la prueba de la capacidad inhibitoria de los 6 aislados de *Trichoderma* sobre el hongo *Cladosporium* sp. causante de deterioro en los frutos de la pitahaya. En la figura 1 se pueden observar los resultados obtenidos de estas pruebas, siendo el aislado TAT6 el que presentó las mejores características de inhibición contra *Cladosporium* sp. ya que a las 96 h de iniciada la prueba fue capaz de evitar el crecimiento de hongo patógeno en un 80 % llegando hasta un 83 % de inhibición del crecimiento a las 120 h. Por su parte TAT7 y TAV6 fueron los siguientes aislados que presentan una buena capacidad de inhibición del crecimiento de *Cladosporium* sp. con 73 y 76 % respectivamente, pero este porcentaje lo alcanzan a las 120 h de iniciada la confrontación. El resto de los aislados presentan una inhibición del crecimiento de *Cladosporium* sp. menor al 70 %, y dos de ellas TAT3 y TAT1 llegan a 75 y 81 % de capacidad de inhibición solo hasta las 144 h (figura 1).

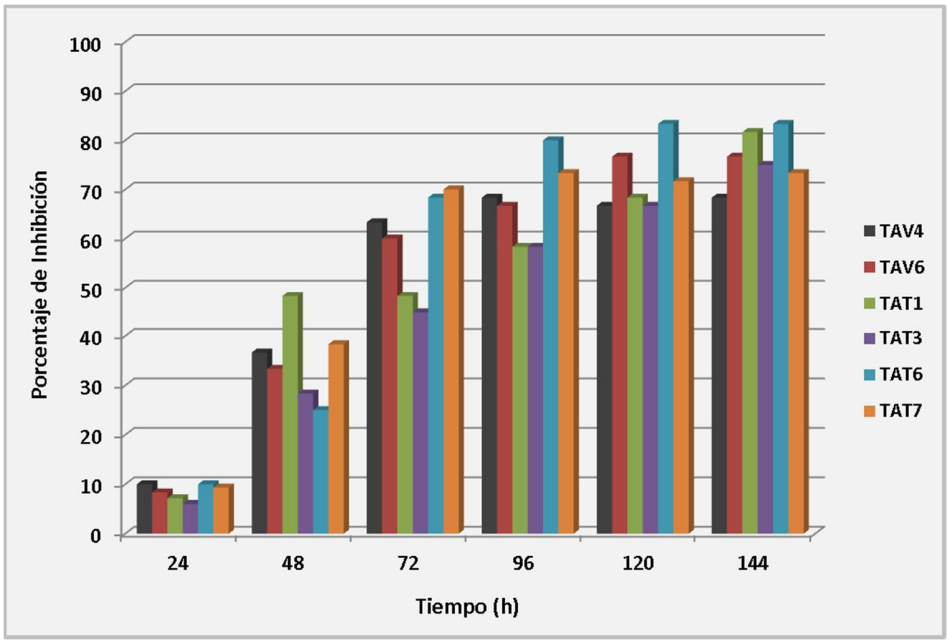


Figura 1. Resultados de la confrontación *in vitro* de los 6 aislados de *Trichoderma* y *Cladosporium* sp. durante 144 h. Los aislados corresponden a: *T. virens* (TAV4, TAV6); *T. koningiopsis* (TAT1, TAT3); *T. harzianum* (TAT6, TAT7).

En la figura 2 se pueden observar los resultados del análisis de las propiedades para detener el desarrollo de *Cladosporium* sp. que presentan los compuestos secretados por los aislados de *Trichoderma*. En ella se observa que 3 de los aislados (TAT6, TAV4 y TAV6) evitan el desarrollo de *Cladosporium* sp. en un 87 % a 48 h de iniciada la prueba, y que el aislado TAT7 lo hace en un 74 % en el mismo periodo de tiempo, mientras que, en el caso de los dos aislados restantes la inhibición del crecimiento es menor a 40 %. Cabe destacar, que si bien, los compuestos secretados por los 4 aislados que presentaron los mejores resultados, no detienen por completo el desarrollo de *Cladosporium* sp. si lograron evitar su proliferación durante las 96 h que duró la prueba.

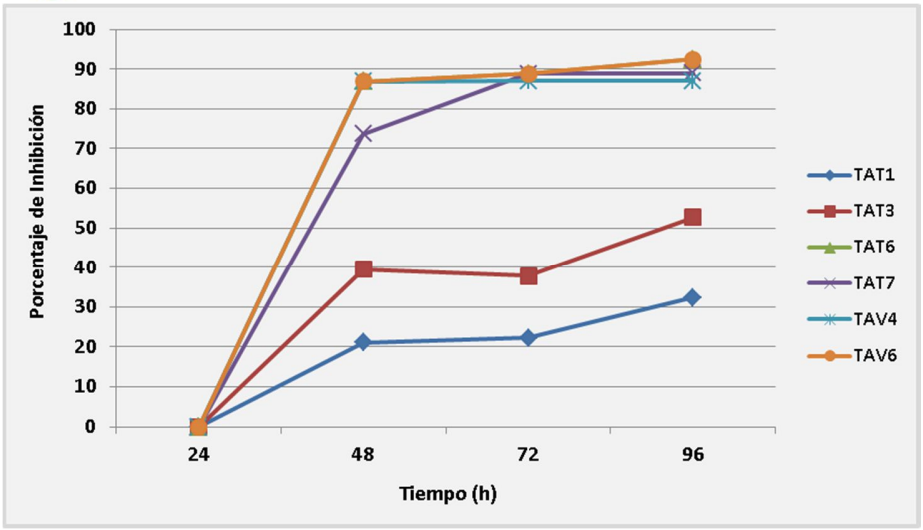


Figura 2. Propiedades inhibitorias sobre el fitopatógeno *Cladosporium* sp. de los compuestos secretados por los aislados de *Trichoderma*. Porcentaje de inhibición de los compuestos secretados por los 6 aislados de *Trichoderma* sobre el fitopatógeno del fruto de pitahaya *Cladosporium* sp.

DISCUSIONES

De los 6 aislados del hongo *Trichoderma* probados para conocer si poseen la capacidad para evitar el crecimiento del patógeno del fruto de Pitahaya *Cladosporium* sp. se observa que el aislado TAT6, correspondiente a *T. harzianum,* logra inhibir el crecimiento de este patógeno en un menor tiempo (96 h) que el resto de los aislados, lo que podría ser ventajoso, en el caso de ser usado por un productor, debido a que lo ayudaría a evitar daños en los frutos de la Pitahaya, en un menor tiempo con lo que las pérdidas económicas derivadas de la proliferación de *Cladosporium* sp. en los frutos serían menores.

CONCLUSIONES

Los aislados de *Trichoderma* probados en este trabajo presentaron una buena capacidad antagónica en contra del hongo causante de daños a los frutos de pitahaya *Cladosporium* sp., y podrían representar una alternativa biológica para ser utilizados en el manejo poscosecha de este fruto.

REFERENCIAS

[1] Herbach, K. M., Rohe, M., Stintzing, F.C., Carle, R., (2006), "Structural and chromatic stability of purple pitaya (*Hylocereus polyrhizus* [Weber] Britton & Rose) betacyanins as affected by the juice matrix and selected additives", Food Research International, 39: 667-677.

[2] Wichienchot, S., Jatupornpipat, M., Rastall, R. A., (2010), "Oligosaccharides of pitaya (dragon fruit) flesh and their prebiotic properties", Food Chemistry, 120 (3): 850-857.

[3] Jaafa, R. A., Rahman, A. R., Mahmod, N. Z., Vasudeven, R., (2009), "Proximate analysis of dragon fruit (*Hylecereus polyhizus*) ", American Journal of Applied Sciences, 6: 1341-1346.

[4] Valencia-Botin, A. J., Kokubu, H., Rubalcaba, R. D., (2013), "A brief overview on pitahaya (*Hylocereus* spp.) diseases", J. PACD, 15: 42-48.

[5] McSpadden, G. B., Driks, A., (2003), "Overview of the Nature and Application of Biocontrol Microbes: *Bacillus* spp. ", Phytopathology, 94 (11): 1244.

[6] Ibarra-Medina, V., Ferrera-Cerrato, R., Alarcon, A., (2010), "Aislamiento y selección de cepas de *Trichoderma* antagonistas a *Sclerotia sclerotium* y *Sclerotia minor*", Revista Mexicana de Micología, 31: 53-63.

CONTROL *in vitro* OF *Rhizoctonia sp.* WITH *Bacillus sp*. VOLATILE

(Control *in vitro* de *Rhizoctonia sp.* con volátiles de *Bacillus sp*.)

Jesús Rocha Ramírez [a]*, Guadalupe Oyoque Salcedo [b+], María Valentina Angoa Pérez, Hortencia G. Mena Violante[b], Ernesto Oregel Zamudio[b], Aida Isabel Leal Robles[a].

[a] Universidad de La Ciénega del Estado de Michoacán de Ocampo. Avenida Universidad Número 3000, Col. Lomas de la Universidad. CP 59000, Sahuayo, Michoacán.
[b] Instituto Politécnico Nacional, CIIDIR Unidad Michoacán. Justo sierra #28 col. Centro, CP 59519 Jiquilpan, Mich.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: goyoque@hotmail.com

Área del Conocimiento: Control Biológico.

ABSTRACT
Rhizoctonia is an agriculturally important fungal pathogen that causes rot in tubers, bulbs and other plant organs. Antagonists as *Bacillus subtilis* or *Bacillus pumilus* have recently been used to control of disease. One mechanism of action by antagonists used for controlling fungi is the antibiosis generated by bacterial volatile emissions. Examples of these compounds are: 1) The ammonia produced by *Enterobacter cloacae* against *Pythium ultimum, Rhizoctonia solani* and *Verticillium dahliae;* 2) The alkyl pyrones produced by *Trichoderma harzianum* against *R. solani*. The objective was to evaluate in vitro, the control of a strain of *Rhizoctonia* sp. with four *Bacillus* sp. strains using three methods: by direct confrontation, with bacterial extracts and volatile: For this, *Rhizoctonia* sp. was isolated from potato and tested for their pathogenicity, after that, 1) were placed to the respective *Bacillus subtilis* strain in one side of Petri dish with Potato Dextrose Agar medium (PDA) and a disc with *Rhizoctonia* sp. in the opposed side; 2) test of confrontation with bacterial extract: in this case was placed in the center of the plate with PDA, a disk with fungus and in the periphery were placed filter paper disks soaked with bacterial extract; 3) Test of confrontation with bacterial volatile: the bacteria were plated in a base of the Petri dish with PDA, in another Petri dish base with PDA were place the fungus, both were joined with plastic. As results, were obtained 9 isolates of *Rhizoctonia* sp. one of them called R7, were pathogenic from potato tuber and bean plant. With direct confrontation, R7 was inhibited with the four *B. subtilis* strains. With the bacterial extracts was no inhibition of the fungus were observed. Finally, R7 was inhibited with bacterial volatile from the four strains evaluated, especially with B3 (76.45%). In conclusion, greater control of *Rhizoctonia* sp. was obtained with volatile produced by *Bacillus* sp. strain B3.

Keywords: Control, *Rhizoctonia* sp. volatile, *Bacillus* sp.

RESUMEN
Rhizoctonia es un hongo patógeno de importancia agrícola que causa pudriciones en tubérculos, bulbos y otros órganos de las plantas. Recientemente se han utilizado antagonistas como *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* para su control. Uno de los mecanismos de acción utilizado por antagonistas para el

control de hongos es la antibiosis generada por la emisión de volátiles bacterianos. Como ejemplo: 1) el amonio producido *Enterobacter cloaca*e en contra de *Pythium ultimun*, R*hizoctonia solani* y *Verticillium dahliae*; 2) el alquilo pironas producido por *Trichoderma harzianum* en contra de *R. solani*. El objetivo del trabajo fue evaluar *in vitro* el control de *Rhizoctonia* sp. con cuatro cepas de *Bacillus* sp. utilizando tres metodologías: mediante la confrontación directa, con extractos y con volátiles bacterianos. Para esto, se aisló *Rhizoctonia* sp. de papa y se realizaron pruebas de patogenicidad. 1) En la confrontación directa, se colocó en un lado del medio Papa Dextrosa Agar (PDA) un disco con hongo y en oposición se sembró la cepa de *Bacillus* sp. 2) En la prueba de confrontación con extracto bacteriano, se colocó en el centro del medio PDA un disco con hongo y en la periferia papel filtro remojado con extracto bacteriano. 3) En la prueba de confrontación con volátiles bacterianos, se sembró la bacteria en PDA contenido en una base de caja Petri y en otra al hongo, ambas se adhirieron con plástico. Como resultados se obtuvieron 9 aislados de *Rhizoctonia*, el denominado R7 fue patógeno de tubérculo de papa y planta de frijol. Con la confrontación directa, R7 fue inhibido con las 4 bacterias. En la confrontación con los extractos bacterianos no hubo inhibición del hongo. En la confrontación con los volátiles bacterianos, R7 fue inhibido con las 4 bacterias, especialmente la B3 (76.45%). En conclusión, el mayor control de *Rhizoctonia* sp. se obtuvo con los volátiles de la cepa de *Bacillus* sp. B3.

Palabras Clave: Control, *Rhizoctonia* sp. volátiles, *Bacillus* sp.

INTRODUCCIÓN

El uso de agroquímicos para el control plagas y enfermedades en los cultivos es cada día mayor, según Badii y Garza-Almanza [1] las plagas se están tornando más resistentes con el paso del tiempo. Uno de los hongos de mayor importancia económicamente a nivel mundial es *Rhizoctonia* debido a las enfermedades que ocasiona [2]. Afectan principalmente a hortalizas y plantas florales, tiene la capacidad de infectar a la planta a través de cualquier órgano que este en contacto con las hifas germinadas de los esclerocios que son diseminados por el viento, la lluvia, con herramientas o cualquier otro objeto que trasporte tierra contaminada. Ya sea que infecte la raíz, tallo u hojas, este hongo utiliza enzimas que degradan la cutícula y la pared celular. Los síntomas más comunes que se presentan en la mayoría de las plántulas son el ahogamiento y la pudrición de raíz, así como la pudrición y la cancrosis del tallo de las plantas adultas y en proceso de crecimiento. Sin embargo, en algunos hospedantes, *Rhizoctonia* también causa la pudrición de órganos vegetales almacenados, como los tizones o manchas del follaje, especialmente los que se encuentra cerca del suelo [3-5]. Su control principalmente es por químicos, algunos utilizados son: Pentacloronitrobenceno (PCNB), Carboxin, Benomyl y Ethazol convinado con PCNB o metil tiofanato [3]. Su uso impacta negativamente al ambiente, contaminando el agua, el aire o el suelo, además de dañar las especies que habiten en donde son aplicados [6]. Como alternativa está el uso del control biológico, definido como la represión de actividades dañinas de un organismo por otro u otros [7]. Los mecanismos que utilizan algunos microorganismos para el control de otros, son diversos, tales como: inducción de resistencia sistémica, hipovirulencia, competencia de nutrientes, parasitismo o producción de enzimas líticas o fenoles y antibiosis. Recientemente se ha demostrado que los volátiles producidos por bacterias pueden influenciar a otros organismos, como invertebrados, plantas y hongos (Kai, *et al*., 2009; Wenke *et al*., 2010) en [8]. De acuerdo con Weise *et al*., en [8] la producción de volátiles por la bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria* 85-10, inhibió el desarrollo de hongos como *Aspergillus nidulans* un 85%, *Fusarium solani* un 14% y especialmente ha tenido mayor control sobre el hongo *Rhizoctonia solani* con un 98%. Zou *et al*., [9] analizaron 1018 bacterias seleccionadas al azar y obtuvieron que el 32% producían volátiles

fungistáticos. Algunos compuestos volátiles producidos por bacterias que controlan a otros microorganismos son, amoniaco producido por Enterobacter cloacae para el control de *P. ultimum, R. solani y V. dahliae*, cianuro de hidrógeno producido por *P. fuorescens* para el control de *T. basicola*. El género *Bacillus* muestra antagonismo hacia hongos fitopatógenos como *Fusarium oxysporum* [10] y *F. graminearum* [11], *Neurospora sitophila* [12], *Alternaria mali*, *Penicillium digitatum* [13], *Phytophthora cinnanomi*, *Phythium ultimun*, *Rosellinia necatrix*, *Sclerotium rolfsii* [14] y *Rhizoctonia solani* [15, 16] por mencionar algunos. La especie de *Bacillus subtilis* producen antibióticos como iturina A, surfactina, fengicina, micosubtilina, bacilomicina [14, 17], que son sintetizados y excretados con el objetivo de eliminar la competencia que pueda existir en su habitad [18]. Aun es poco el conocimiento de especies del genero *Bacillus* que inhiben el crecimiento de hongos por la producción de volátiles y de los compuestos involucrados. Por tal motivo, el objetivo del trabajo fue evaluar *in vitro* el control de *Rhizoctonia* sp. con 4 cepas de *Bacillus* sp. utilizando 3 metodologías: mediante la confrontación directa, con extractos y volátiles bacterianos, como una primera parte del trabajo para continuar a futuro con la identificación de los compuestos involucrados en la inhibición hacia *Rhizoctonia*.

MATERIALES Y MÉTODOS

AISLAMIENTO DE *Rhizoctonia* sp.

Para el aislamiento de *Rhizoctonia* sp. se utilizaron papas de la variedad alfa que contenían esclerocios característicos por la presencia de *Rhizoctonia*. Se tomaron trozos de 0.5 cm^2 con parte dañada y sana, se aseptizaron con jabón de polvo, en seguida y bajo condiciones estériles, se aseptizaron con hipoclorito de sodio al 3% por 1 min, seguido de 4 enjuagues con agua destilada estéril. Se eliminó el exceso de agua con toallas estériles de papel. Posteriormente se colocaron los trozos sobre medio PDA y llevaron a incubación de 25 °C hasta la aparición del micelio característico por la presencia de *Rhizoctonia*. El cultivo se purifico con corte de hifa. La conservación del hongo se mantuvo a 4 °C.

PRUEBA DE PATOGENICIDAD DE *Rhizoctonia* sp.

Para ésta prueba se utilizó planta de frijol peruano *in vitro* con 2 hojas verdaderas que fueron inoculadas con un disco de 0.3 cm^2 de agar con micelio de *Rhizoctonia* sp. al pie del tallo. Las plantas inoculadas se incubaron a 25 °C hasta observar daño por la presencia del hongo. Se realizaron 3 repeticiones por cada *Rhizoctonia* sp. aisladas.

Para la prueba de patogenicidad en tubérculo de papa, se aseptizo con hipoclorito de sodio al 3% tubérculo de papa bajo condiciones estériles con posteriores 3 enjuagues y secado con toallas de papel estériles. Después, se cortaron trozos de aproximadamente 0.5 cm de grosor y se pusieron dentro de las cajas Petri estériles. En seguida se inoculo en el centro del trozo del tubérculo un disco de 0.3cm^2 de agar con micelio de *Rhizoctonia* sp. dejando a incubar a 25 °C hasta observar daño por la presencia del hongo. Se realizaron 3 repeticiones por cada *Rhizoctonia* sp. aisladas.

CONFRONTACIÓN DIRECTA DE *Rhizoctonia* sp. CON *Bacillus* sp.

En un costado de la caja Petri con medio PDA se inoculo un trozo de 0.3 cm^2 agar con micelio de *Rhizoctonia* sp. Después, en otro extremo se sembró sólo una asada de *Bacillus* sp. a una distancia de aproximadamente a 5 cm del inoculo de *Rhizoctonia* sp. Posteriormente, se dejaron a incubación de 25 °C por 2 días. Se realizaron 3 repeticiones por cada *Rhizoctonia* sp. identificada como patógenas. Como control se utilizaron tres cajas Petri con PDA donde se inoculo el hongo.

CONFRONTACIÓN DE *Rhizoctonia* sp. CON EXTRACTOS DE *Bacillus* sp.

Para esta prueba se sembró en medio Papa Dextrosa Infusión (PDI) cada una de las cepas de *Bacillus* sp. se incubaron a 25 °C por 24 h con agitación constante a 200 vaivenes/min. Después cada una de las suspensiones bacterianas se centrifugo a 12 000 rpm durante 10 min. Para eliminar completamente las células bacterianas, se filtró el centrifugado a través de membrana estéril de 0.22µm. Una vez obtenido el extracto, se remojó un trozó de papel filtro estéril de 0.5 cm de diámetro y después se colocó sobre medio PDA a una distancia de aproximadamente a 2 cm del inoculo *Rhizoctonia* sp. (0.3 cm^2 agar con micelio). Se realizaron 3 repeticiones por cada *Rhizoctonia* sp. identificada como patógena. Como control se utilizaron tres cajas Petri con PDA donde se inoculo el hongo.

CONFRONTACIÓN DE *Rhizoctonia* sp. CON VOLÁTILES DE *Bacillus* sp.

Para esta prueba se coló un trozo de 0.3 cm^2 agar con micelio de *Rhizoctonia* sp. en el centro de la base de una caja Petri con PDA. Por otra parte, en otra base de la caja Petri con PDA se sembró la cepa de *Bacillus* sp. Después, ambas cajas se unieron con plástico adherente y dejaron en incubación a 25 °C por 3 días. Se realizaron 3 repeticiones por cada una de la *Rhizoctonia* sp. identificada como patógena. Se midió el diámetro de crecimiento del hongo a los 7 días de confrontación y como control se utilizaron tres cajas Petri con PDA donde se inoculo el hongo. El % de inhibición de *Rhizoctonia* sp. se determinó con la siguiente ecuación. $IR(\%) = \frac{(DCC-DCR)}{DCC} X\ 100$ IR = Inhibición de *Rhizoctonia* sp. DCC = Diámetro de Crecimiento de Control. DCR = Diámetro de Crecimiento de *Rhizoctonia* sp.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante una prueba de varianza a un nivel de significancia del 5%. La comparación de medias se hizo mediante la prueba Tuckey con el programa SAS para Windows V9.

RESULTADOS

AISLAMIENTO DE *Rhizoctonia* sp.

Se logró obtener 9 aislados de *Rhizoctonia* sp. de tubérculo de papa. Las características para su selección fueron la coloración café del micelio, bifurcaciones laterales desarrollas en ángulos casi rectos, formación de septos en la bifurcación cerca al punto de origen.

PRUEBA DE PATOGENICIDAD DE *Rhizoctonia* sp.

En planta de frijol y tubérculo de papa solo el aislado de *Rhizoctonia* sp. denominado R7 hizo lesiones en todas las repeticiones y fue después de 10 días.

CONFRONTACIÓN DIRECTA DE *Rhizoctonia* sp. CON *Bacillus* sp.

Solo se utilizó el aislado R7 ya que fue el patógeno. En esta prueba el hongo fue inhibido por las 4 cepas (B1, B2, B3 y B4) de *Bacillus* sp. utilizadas (Figura 1a).

CONFRONTACIÓN DE *Rhizoctonia* sp. CON EXTRACTOS DE *Bacillus* sp.
Con esta prueba no se observó inhibición del aislado R7 con los extractos de las 4 bacterias utilizadas, el crecimiento de *Rhizoctonia* fue igual que el del control (Figura 1b).

CONFRONTACIÓN DE *Rhizoctonia* sp. CON VOLÁTILES DE *Bacillus* sp.
Con esta prueba se logró obtener control significativo de R7 con los volátiles emitidos por las 4 bacterias (Figura 1c) en comparación con el control. Con la bacteria B3 se obtuvo significativamente mayor inhibición del crecimiento del hongo (76.45 %) y con la bacteria B4 se obtuvo menor control (34.13 %) del hongo en comparación con las otras 3 bacterias (Figura 1d).

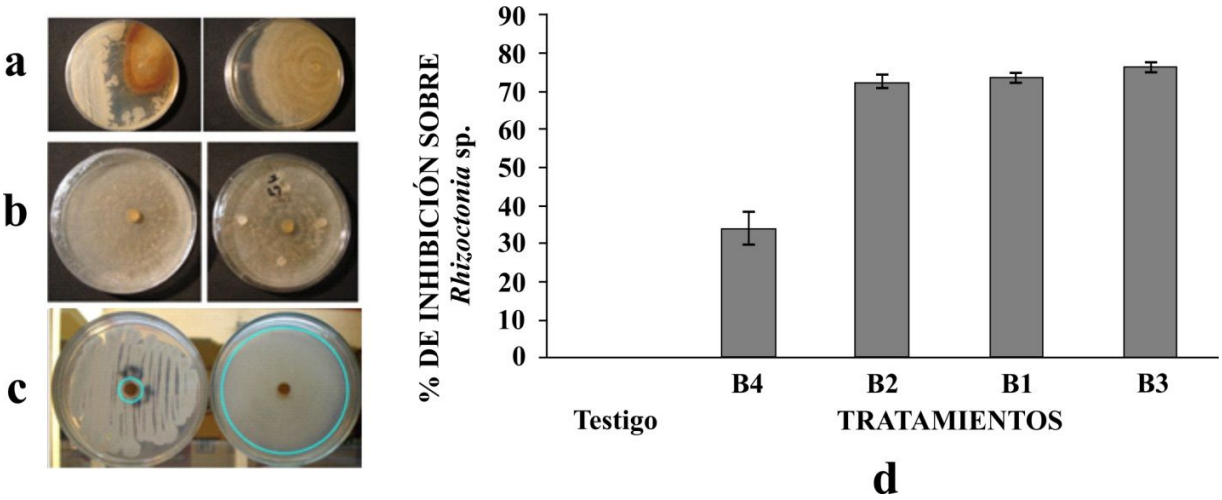


Figura 1. Confrontación e inhibición de *Rhizoctonia* sp. con *Bacillus* sp. a) Confrontación directa, b) confrontación con extractos, c) confrontación con volátiles y d) inhibición de *Rhizoctonia* sp. con volátiles de las 4 cepas de *Bacillus* sp.

DISCUSIÓN
En la confrontación directa se pudo observar que la bacteria formaba un halo de inhibición e impedía que el hongo siguiera desarrollándose en el medio de cultivo, estos resultados coinciden con los ya reportados de otros autores, tal es el caso de Cazorla *et al.* [14] quienes indican que *Bacillus subtilis* ha mostrado capacidad de inhibir el crecimiento de hongos del suelo, tales como *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora cinnanomi*, *Phythium ultimun*, *Rosellinia necatrix*, *Sclerotium rolfsii* por la producción de enzimas hidrolíticas y lipopeptidos. Basurto-Cadena *et al.*, [19] mencionan el control de *Rhizoctonia solani* con *Bacillus subtilis* e interpretan que el mecanismo de acción que probablemente la bacteria realizo fue por antibiosis debido a que las hifas de los hongos presentaban deformaciones y colapso. Por otra parte Asaka y Shoda [20] identificaron que los antibióticos como iturina A y surfactina producidos por la bacteria *Bacillus subtilis* están involucrados en el control de *Rhizoctonia solani*. En la prueba de confrontación del hongo con los extractos de *Bacillus* sp. no se obtuvo control de *Rhizoctonia* sp. Es conocido que *Bacillus* spp. producen antibióticos como la bacitracina, polimixina, tiromicina, gramicidina y circulina y además también producen enzimas hidrolíticas que pueden inhibir el crecimiento de hongos (Butt, *et al.*, 1999) en [21] pero no es sabido si es necesario que exista interacción entre los microorganismos (antagonista y patógeno) para que el microorganismo que

controla generé compuestos inhibitorios. En esta prueba no hubo acercamiento del hongo durante el crecimiento de las bacterias por lo que tal vez, no se generaron los compuestos que inhiben al hongo. Esto se supone porque con la confrontación directa y con volátiles de las bacterias se dio control del hongo y coincide que en ambas pruebas hubo acercamiento de los microorganismos. Para aclarar dicho supuesto es necesario realizar las pruebas pertinentes.

Con la prueba utilizando volátiles de *Bacillus* sp. se obtuvo el mayor control (hasta un 76.45 %) de *Rhizoctonia* sp. Los resultados coinciden con lo obtenido por otros autores como Fernando *et al*. [22] donde identificaron a las bacterias *Pseudomonas chlororaphis*, *P. fluorescens* y *P. aurantiaca* como productoras de compuestos volátiles, que tienen la capacidad de inhibir la germinación de la ascospora hasta un 100 % y el crecimiento micelial en 100 % para *P. chlororaphis* y *P. aurantiaca* mientras que *P. fluorescens* el 50% sobre el hongo *Sclerotinia sclerotiorum*. Zou *et al*. [9] con volátiles de varias especies de *Bacillus* inhibieron el crecimiento del micelio de *Paecilomyces lilacinus* y *Pochonia chlamydosporia*, encontrando compuestos bioactivos como acetamida, 1-butanamina, metanamina, fenilacetaldehído y 1-deceno.

CONCLUSION

Se logró el control de *Rhizoctonia* sp. mediante la confrontación directa y con volátiles de las bacterias de *Bacillus* sp. El mayor control de *Rhizoctonia* sp. se obtuvo (76.45 %) con los volátiles de las cepas de *Bacillus* sp. B3.

REFERENCIAS

[1]Badii, M.H., Garza-Almanza, V. (2007) "Resistencia en Insectos, Plantas y Microorganismos", CULCyT, Año 4 (18): 9-25.

[2]Baird, R.E. (2003). "Fleshy and Other Basidiomycetes", in Plant Pathology, (Trigiano, R.N., Windham, M.T., Windham, A.S., Eds). Taylor & Francis: Boca Raton, Florida., 286-299.

[3]Agrios, G.N. (2004). Plant Pathology. (5ta Ed.). San Diego, CA.: Dana Dreibelbis,593-599

[4]González-García, M. (2008) "Reseña de "Aspectos de sistemática y biología del complejo Rhizoctonia"", Fitosanidad, 12: 147-159.

[5]Lehtonen, M.J. (2009). *Rhizoctonia solani* as a potato pathogen - variation of isolates in finland and host response. (Viikki Graduate School in Molecular Biosciences, University of Helsinki Finland): 81.

[6]INECC (2014) "Características físicoquímicas de los plaguicidas y su transporte en el ambiente", México, D.F.

[7]Pal, K.K., McSpadden-Gardener, B. (2006) "Biological Control of Plant Pathogens", The Plant Health Instructor: 1-25.

[8]Weise, T.*, et al.* (2012) "Volatile organic compounds produced by the phytopathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* 85-10", Beilstein Journal of Organic Chemestry, 8: 579-596.

[9]Zou, C.-S., *et al.* (2007) "Possible contributions of volatile-producing bacteria to soil fungistasis", Soil Biology & Biochemistry, 39: 2371-2379.

[10]Akram, W., Anjum, T. (2011) "Quantitative Changes in Defense System of Tomato Induced By Two Strains of *Bacillus* against *Fusarium* Wilt", Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences ISSN, 1 (3): 7-13.

[11]Gong, A.-D., *et al.* (2015) "Antagonistic Mechanism of Iturin A and Plipastatin A from *Bacillus amyloliquefaciens* S76-3 from Wheat Spikes against *Fusarium graminearum*", PLoS ONE, 10 (2): 1-18.

[12]Liu, C., *et al.* (2015) "Biocontrol activity of *Bacillus subtilis* isolated from *Agaricus bisporus* mushroom compost against pathogenic fungi", J. Agric. Food Chem., [Epub ahead of print].

[13]Han, J.S., *et al.* (2005) "Biological control agent of common scab disease by antagonistic strain *Bacillus* sp. sunhua", Journal of Applied Microbiology, 99: 213-221.

[14]Cazorla, F.M., *et al.* (2007) "Isolation and characterization of antagonistic *Bacillus subtilis* strains from the avocado rhizoplane displaying biocontrol activity", Journal of Applied Microbiology, 103 (5): 1950-1959.

[15]Kröber, M., *et al.* (2014) "Effect of the strain *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 on the microbial community in the rhizosphere of lettuce under field conditions analyzed by whole metagenome sequencing", Front. Microbiol., 5 (252): 1-16.

[16]Chowdhury, S.P., *et al.* (2015) "Cyclic lipopeptides of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. plantarum colonizing the lettuce rhizosphere enhance plant defence responses towards the bottom rot pathogen *Rhizoctonia solani*", Molecular Plant-Microbe Interactions, [Epub ahead of print].

[17]Mejía-Farfán, M.L. (2008). Evaluación del efecto de la relación carbono nitrógeno y el nivel de oxígeno disuelto sobre la producción de biosurfactantes a partir de *Bacillus subtilis*. (Maestria en Tecnología Avanzada, Instituto Politécnico Nacional): 72.

[18]Tejera-Hernández, B., Rojas-Bandía, M.M., Heydrich-Pérez, M. (2011) "Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos", Revista CENIC. Ciencias Biológicas, 42 (3): 131-138.

[19]Basurto-Cadena, M.G., *et al.* (2006) *Estudio de la actividad antagonista in vitro de Bacillus subtilis frente a los hongos patogenos de fresón Fusarium verticilliodes y Rhizoctonia solani*, Instituto de Ciencia Agrícolas, Universidad de Guanajuato e Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universidad Politécnica de Valencia.

[20]Asaka, O., Shoda, M. (1996) "Biocontrol of *Rhizoctonia solani* Damping-off of Tomato with *Bacillus subtilis* RB14", Applied and Environmental Microbiology, 62 (11): 4081-4085.

[21]Castillo-Rodríguez, O. (2011). Nutrición y *Bacillus subtilis* en el control de marchitamiento por *Fusarium* spp. en tomatillo (*Physalis ixocarpa* B.) en Sinaloa. (Maestría en Recursos Naturales y Medio Ambiente, CIIDIR Unidad Sinaloa): 89.

[22]Fernando, W.G.D., *et al.* (2005) "Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol", Soil Biology & Biochemistry, 37: 955-964.

ISOLATION OF YEASTS WITH ANTAGONISTIC ACTIVITY AGAINST PHATHOGENIC FUNGI OF CITRUS

(Aislamiento de levaduras antagonistas de hongos patógenos de cítricos)

Adriana Pérez Díaz[a], Karla Nallely Rivera Hernández[a], Maria del Sugeyrol Villa Ramirez[a] y Miguel Angel Plascencia Espinosa[a*+]

[a]Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada del Instituto Politécnico Nacional.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: mplascencia@ipn.mx, maplaes@hotmail.com

Área del Conocimiento: Control Biológico.

ABSTRACT
The citrics are the most important fruit species in Mexico, ranked as first nationally in total production. Within the biotic problems affecting citrus production, the more common are the diseases caused by fungi. Currently, control of post-harvest diseases is carried out by using chemical fungicides, however, given the growing concern about the development of resistance by pathogens, and environmental impact they generate, there is great interest in using alternative products to chemical fungicides, with similar standards of effectiveness and price. Biological control using antagonistic microorganisms of fungal pathogens as epiphytic yeast of leaves and fruits, represent an alternative to the use of chemical fungicides. The objective of this work was to isolate yeasts from the surface of leaves and fruits and analyze their antagonistic activity in vitro and in vivo against *Colletotrichum gloeosporioides*, which is the fungus causing anthracnose on citrus. First isolation of epiphytic yeasts from different leaves and fruits was performed. The antagonism tests were performed in vitro by confrontation in dual cultures (antagonist-pathogen), using the isolated yeasts against *C. gloeosporioides*. Four different culture media were evaluated for the in vitro tests and 4 yeasts strains were selected based on the formation of zones of inhibition. Candida oleophila Y-18845 was used as a positive control. All tested strains inhibited by 100% the radial growth of *C. gloeosporioides*, being CIF-L4 the yeast strain which exerted the greater inhibition effect. The analysis made in lemons confirmed the ability of the five isolates to inhibit the growth of *C. gloeosporioides*. In conclusion, 5 new yeasts with antagonistic activity against fungal pathogen of citrus were isolated. This work represents the first step in selecting strains rationally to be used effectively in the biological control of *C. gloeosporioides* which causes post-harvest anthracnose on citrus.

Keywords: Anthracnose, Biocontrol; Yeasts; Citrics.

STRATEGIC DEFENSE OF PLANTS BY SECRETION OF PROMOTER-INHIBITOR COMPLEX OVER ENDOPHYTES AND PATHOGENS EVALUATED IN AGAVE (*Agave tequilana* Weber var. Azul) AND POTATO (*Solanum tuberosum*)

[Defensa estratégica de plantas mediante la secreción del complejo promotor-inhibidor de endófitos y patógenos evaluado en agave (*Agave tequilana* Weber var. *Azul*) y papa (*Solanum tuberosum*)]

María Arias Mendoza[a+], Alejandra Vázquez Camacho[b]*, Marcela De la Mora Amutio[b], Julia Martínez del Carmen[b], Tetsuya Ogura[b].

[a] Centro Universitario Uteg Campus Héroes *Ferrocarrileros* No. 1325 Esq. Washington y Dr. R. Michel, Col. La Aurora, Guadalajara, Jalisco Teléfono: 1078-8000.
[b] Universidad Autónoma de Guadalajara, Departamento de Química, Instituto de Ciencias Exactas y Terrestres (ICET), Universidad Autónoma de Guadalajara (UAG). Av. Patria 1201, Col. Lomas del Valle, CP 45129, Zapopan, Jalisco, México

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: juliam@edu.uag.mx

Área Temática: Control Biológico.

ABSTRACT
From germination to maturity, plants require strategies that allow in one hand, the colonization of their tissues by beneficial endophytes, and on the other, and colonization control of these endophytes and fend off pathogens. These strategies consist mainly in the synthesis of compounds able to promote and inhibit microbial activity. Although all groups of plants have a defense system based on these compounds, resistance to pests and diseases has been based on various factors such as genotype, phenotype, type of climate, soil, plant density, lifetime, among others. Our results have shown that different extracts of blue agave and potato plants have a microbial inhibitory and growth promoter effect. For visualization of the activity of these plant compounds over microbial activity, we use a technique called bio autography, which combines thin layer chromatography (TLC) with 3-(4,5-dimethyltiazol-2-yl)-2, 5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT). Bacterial activity in reduces MTT (yellow) to Formazan generating a blue-violet color on the plate. Thus, fractions with inhibitory activity show a lighter color than the background of the plate and promoter fractions show more intense bands than the plate background. Our results so far indicate the presence of active compounds from potato and agave that selectively inhibit or promote the growth of pathogens and endophytes respectively.

Keywords: Endophytes, microbial Growth, Agave, Potato.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

TRICALCIUM PHOSPHATE SOLUBILIZATION ABILITY OF FUNGI MICROORGANISMS GROWN IN LIGNOCELLULOSE MATERIALS IN THE PRESENCE OF ALUMINIUM

(Habilidad de solubilización de fosfato tricálcico por microorganismos crecidos en materiales lignocelulósicos en presencia de aluminio)

Liliana Angelica Cruz-De-Julian[a], José Roberto Zúñiga- Silva[b*+], Refugio Rodríguez-Vázquez[b], Enriqueta Amora-Lazcano[a].

[a] Escuela Nacional de Ciencias Biologicas, Instituto Politécnico Nacional
[b] Departamento de Biotecnología y Bioingeniería; Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: zuniga_jr@me.com

Área del Conocimiento: Ecotoxicología

ABSTRACT
Phosphorus is essential for the development of plants, however it is not easily assimilated due to the formation of insoluble compounds with calcium, iron or aluminium; agro-industrial wastes represent an alternative for the use of fertilizers, especially as a support for the development of microorganisms with ability to solubilize phosphates. 27 microbial isolates were obtained from green coffee beans, 17 of these showed tricalcium phosphate solubilization ability in Pikowskaya solid medium; so the aim of this study was determining the contribution of microorganisms associated to green coffee beans on the phosphate solubilization, in order to assess their potential use as a biofertilizer. Through a dose – response assay, the effect of aluminum ($Al_2(SO_4)_3$addition) on phosphate solubilization was determined. Based on statistical analysis, using the software SAS, version 9.2, where a minimal inhibition concentration (MIC_{50}) was determined, this analysis allowed the selection of two-isolated C4T1DAI (*Aspergillus* mold) and C5T2DPI (Gram negative rod) and those, which maintain a greater potential for phosphate solubilization in the presence of aluminium. The activity of acid phosphatase enzyme was determined in Pikowskaya liquid medium; meanwhile the organic acids production was quantified by HPLC using a column HPX 87H Aminex. Aluminium supplementation in the culture medium was selected based on the MIC_{50} of each isolate. In the presence of aluminium, the isolate C4T1DAI decreases significantly ($p= 0.0001$) their solubilization ability and acid phosphatase activity; the solubilization in the isolated C5T2DP was not affected significantly through seven days of incubation, however the acid phosphatase activity was significantly increased in aluminium presence; the oxalic acid, citric acid and tartaric acid were detected in liquid cultures without metal, and with aluminium only oxalic acid was detected. Tested isolates showed some degree of tolerance to aluminium, however more research is necessary to evaluate these strains as possible biofertilizers.

Keywords: Agro-industrial waste, Biofertilizers, Organic acids, Phosphatase activity.

BIOINSECTICIDE EFFECT OF ETHANOLIC EXTRACT OF YOUNG AND MATURE LEAVES OF CASTOR OIL PLANT (*Ricinus communis* L.) ON WHITEFLY IN TOMATO

(Efecto bioinsecticida de extracto etanólico de hojas jóvenes y maduras de higuerilla (*Ricinus communis* L.) sobre mosca blanca en tomate)

Luis Patricio Guevara Acevedo*[+a], Enrique Andrio Enriquez[a], Davino Pérez Mendoza[a], Silvano Ochoa Galaz[a], Julio Cesar León Vargas, Raúl René Robles Lacayo[a], José Eduardo Ruíz Escobar[a]

[a] Instituto Tecnológico de Roque. Departamento de Ciencias Agropecuarias

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: lpguevara@itroque.edu.mx

Área del Conocimiento: Ecotoxicología.

ABSTRACT
Whitefly (*Bemisia tabaci* L.) is one of the most important pests that causes the mayor losses in tomato planting, its control is based on synthetic products mainly, and this causes environmental issues, resistance and food residues. A viable alternative to control this insect is the use of vegetable extract like castor oil plant (*Ricinus communis* L.), there are no reports of the effect of extract leaves at different stages of development. Because of that, the objective of this investigation was to evaluate the bioinsecticide effect of two vegetable extracts made of young and mature leaves of castor oil plant on the whitefly second instar nymph (*B. tabaci*); young and mature leaves of castor oil plant were cut from Instituto Tecnologico de Roque located at 20°31' N and 100°45' W and 1750 meters above sea level, leaves were cut in 2 cm pieces and placed for 15 days in glass jars with 80% alcohol for distillation later, concentrations of 30, 20 y 10 % (v/v) were prepared with each distillate adding Inex® as adherent; a bioessay by immersion was used for evaluation in a completely random design with 10 repetitions and an absolute check made of adherent with water, clean and free of plagues of the medium stratum saladette tomato leaves were selected, 20 second instar nymphs were placed at the underside of that leaves. After 30 min, leaves were submerged for 5 s in evaluated concentrations. Mortality was determined at 24, 48, 72 and 120 h of exposure. Mortality caused for different extract concentrations was corrected by mortality at absolute check with Abbot formula. Corrected mortality results were submitted to a variance analysis and a multiple mean comparison with Tukey test at $\alpha = 0.05$ significance level. Results show that there were no significant differences between the two kinds of extracts, with 81 and 78% at 120 h exposure of young and mature leaves respectively.

Keywords: Extracts, castor oil plant, young leaves, mature leaves, whitefly.

EFFECT OF ALKALOIDS QUINOLIZIDINE SEEDS OF *Lupinus campestris* ON *Aedes aegypti*

(Efectos de los alcaloides quinolizidínicos de semillas de *Lupinus campestris* sobre *Aedes aegypti*)

Raúl Simeón Michi Flores[a]*, Rodolfo Figueroa Brito[a], Kalina Bermúdez Torres[a+]

[a] Centro de Desarrollo de Productos Bióticos – IPN, carretera Yautepec – Jojutla, Km. 6, Calle CEPROBI, No. 8, Colonia San Isidro, Yautepec, Morelos, México. C. P. 62731, apartado postal 24.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: kbermudes@ipn.mx

Área del Conocimiento: Ecotoxicología.

ABSTRACT
Aedes aegypti is a health problem being a vector of several diseases such as dengue fever, dengue hemorrhagic fever, yellow fever and chikungunya virus. This vector is controlled by physical and chemical methods, however, the excessive use of chemicals, the resistance sample vector, so there is the need for new control strategies. The use of (MS) secondary metabolites as a tool to control and prevent insect attack. It is reported that the alkaloids have *Erythrina american* larvicidal activity. Lupinus, belonging to Fabaceae, present quinolizidine alkaloids (QA). Our group has shown that these secondary metabolites have inscticidal effect on larvae of *Spodoptera frugiperda*. The aim of this study is to evaluate the biological effect presented by QA in *Lupinus campestris* on larvae of *Aedes aegypti*. QA extracts of L. campestris different organs were evaluated by HPTLC. The extract, which showed the greatest number of bands was evaluated at different concentrations (75, 100, 250, 500 ppm) in the first and third instar larvae of A. aegypti. The results showed that the seed extract presented the highest number of band. In the first stage, the extract EAQ75 EAQ250 and were more active presenting a 71.66% and 70% mortality. Sparteine also has the same active concentrations (71.66% and 76.66% mortality). In the third stage it was observed that the most active extract concentrations were EAQ100 and EAQ75 (90 to 100% mortality). In the third stage it was observed that the most active extract concentrations were EAQ100 and EAQ75 (90 to 100% mortality). The results of this study suggest that the AQ are an alternative for the control of *Aedes aegypti*.

Keywords: *Aedes aegypti*; quinolizidine alkaloids; *Lupinus campestris*; diseases.

RESUMEN
Aedes aegypti es un problema de salud por ser un vector de varias enfermedades como el dengue, la fiebre hemorrágica del dengue, la fiebre amarilla y el virus de chikungunya. Este vector se controlado mediante métodos físicos y químicos, sin embargo el uso excesivo de productos químicos genera resistencia, por lo que existe la necesidad de nuevas estrategias de control. El uso de metabolitos secundarios (**MS**) es una herramienta para controlar y prevenir el ataque de insectos. Se ha informado de que los alcaloides de *Erythrina americana* tienen actividad larvicida. Lupinus, perteneciente a Fabaceae, esta produce alcaloides quinolizidínicos (**AQ**) como una estrategia de defensa contra los herbívoros. Nuestro grupo ha demostrado que los **AQ** tiene efecto insecticida sobre larvas de

Spodoptera frugiperda. El objetivo de este estudio es evaluar el efecto biológico de los AQ de *Lupinus campestris* sobre larvas de *Aedes aegypti*. Los extractos de *L. campestris* de diferentes órganos fueron evaluados por HPTLC. El extracto, que mostró el mayor número de bandas, se evaluó a diferentes concentraciones: 75 ppm, 100 ppm, 250 ppm y 500 ppm en la primer y tercer estadio las larvas de *A. aegypti*. Los resultados mostraron que el extracto de semilla presentó el mayor número de bandas. En la primer estadio etapa, el extracto EAQ75 y EAQ250 eran más activos por presentar 71,66% y el 70% de mortalidad. Esparteína mostró los mismos resultados en las mismas concentraciones (71,66% y 76,66% de mortalidad). En la tercer estadio, se observó que las concentraciones de extracto más activos fueron EAQ100 y EAQ75 (90 a 100% de mortalidad). Los resultados de este estudio sugieren que el control de calidad son una alternativa para el control de *Aedes aegypti*.

Palabras Clave: Aedes aegypti; alcaloides quinolizidínicos; *Lupinus campestris*; enfermedades.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad la transmisión de enfermedades por vectores constituye un problema de salud, siendo la consecuencia el desarrollo dinámico entre los insectos vectores, los profundos cambios ecológicos y la conducta humana. *Aedes aegypti* es transmisor de enfermedades como chikungunya (CHIKV), fiebre amarilla, dengue clásico y dengue hemorrágico. El ciclo de vida de este insecto tiene una duración de 12 a 17 días en 25 a 29 °C, los huevecillos siendo capaces de resistir a temperaturas superiores de 30 °C [2]. En los últimos años la transmisión de enfermedades por *A. aegypti* ha incrementado causado muertes y artritis en pacientes de edad avanzada, niños y pacientes con problemas cardiovasculares ó diabetes [3 y 4]. El control de estas poblaciones se ha realizado mediante campañas de saneamiento y abatizaciones, pero los compuestos químicos han ocasionado contaminación al medio ambiente y el insecto ha mostrado resistencia a ellos [5 y 6]. El Temefos® es un larvicida que actualmente es utilizado para el control de este vector en México y otras partes del mundo, este larvicida presenta residualidad de 90 días en agua estancada y 20 días en agua en movimiento [7 y 8]. Para disminuir el uso de insecticidas químicos, se han investigado nuevas estrategias, una de ellas el uso de metabolitos secundarios con actividad insecticida sobre *A. aegypti*. De Omena[9] reportó que alcaloides de corteza de *Erythrina mulungu* (Fabaceae) presentaron actividad insecticida sobre larvas del cuarto instar de *A. aegypti*. En el 2011, Salazar [10] observó que los extractos de semillas de *Erythrina herbacea* L. (Fabaceae) presentaron efectos tóxicos contra larvas del cuarto instar de este mosquito, los alcaloides quinolizidínicos (**AQ)** de *Lupinus campestris* (Fabaceae) se observó que presentan efecto insecticida sobre *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) [11]. El objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad insecticida de los extractos de semillas de *L. campestris* y esparteína sobre larvas de *A. aegypti.*

METODOLOGÍA

Este trabajo se realizó en dos etapas; la parte fitoquímica, la cual consistió en la extracción de alcaloides quinolizidínicos **AQ** y una segunda etapa, consistió en la evaluación de la actividad tóxica que presentan los **AQ** en larvas del primer y tercer instar de *A. aegypti.*

Las plantas fueron colectadas en el Parque Nacional Izta - Popo a 1850 msnm, se separaron los órganos secándolos a 30 °C, posteriormente se realizó la extracción [12]. La determinación de la presencia de los

AQ en los distintos órganos de *L. campestris* se realizó por medio de HPTLC, utilizando como fase estacionaria placa de sílice gel 60 F254 y como fase móvil una mezcla de dietilamina – ciclo hexano (70:30), como estándar se utilizó esparteína y como agente revelador el reactivo de Dragendorff para la detección de alcaloides.

Se realizó un pie de cría siguiendo la metodología de Pérez [13]**,** posteriormente se realizó la evaluación del efecto de los **AQ** en larvas del primer y tercer instar de *A. aegypti*. Para ello se evaluaron cuatro tratamientos Temefos®, esparteína, extracto de semilla a cuatro concentraciones (500 ppm, 250 ppm, 100 ppm, 75 ppm y agua como testigo), en vasos con 20 mL de agua y 20 larvas *A. aegypti*; agregándoles 1 mL de cada tratamiento, cada bioensayo se realizó por triplicado. Se evaluó mortalidad cada 24 horas a partir de que se inició el bioensayo.

RESULTADOS

Los distintos órganos de *L. campestris* mostraron un comportamiento muy diferente cada uno. Los extractos de hoja, flor y semilla su perfiles son similares, sin embargo el extracto de raíz no presenta **AQ**, el extracto que muestra mayor intensidad de bandas fue el extracto de semillas. Reyes [14] reportó que en extractos de plántulas *in vitro* de *Lupinus campestris* inducidas con metil jasmonato evaluadas en TLC con la fase móvil cloroformo: metanol: hidróxido de amonio (85:15:1) presento tres bandas que alcaloides quinolizidínicos, mientras que en nuestros extractos de semillas de planta silvestre de *Lupinus campestris* presentó siete bandas, usando una fase móvil dietilamina: hexano (70:30). Esto sugiero que la fase móvil que presenta mejor separación de cada **AQ** es la dietilameina y hexano. Pero el rendimiento del extracto de semilla fue de 39,5 mg por gramo de muestra, siendo superior al rendimiento al que reporta Reyes [14]. Como se puede observar en la figura 1 el perfil cromatográfico del conjunto de órganos de una planta silvestre de *Lupinus campestris* y la esparteína (estándar).

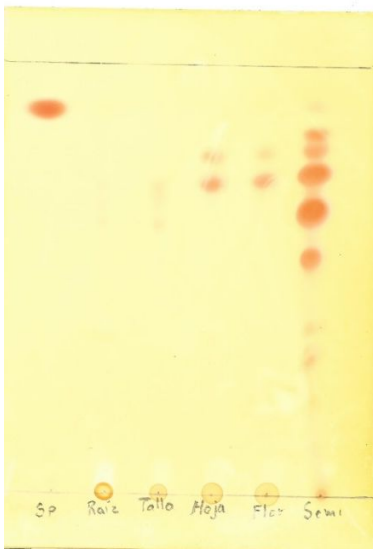


Figura 1. TLC de los extractos de los diferentes órganos de las plantas de *Lupinus campestris.*

El extracto de **AQ** de semillas tienen efecto larvicida en larvas del primer instar. Los tratamientos más activos fueron EAQ75 y EAQ250, presentando una mortalidad del 71.66 y 70%, respectivamente. Las concentraciones de esparteína que presentaron una mayor actividad fueron SP250 y SP75 con una mortalidad del 76.66 y 71.66%, respectivamente. Las concentraciones de Temefos® presentaron una mortalidad mayor al 80%, pero también es afectado el cambio es muda. En la figura 2 se ilustra el comportamiento de cada uno de los tratamientos con respecto a la mortalidad.

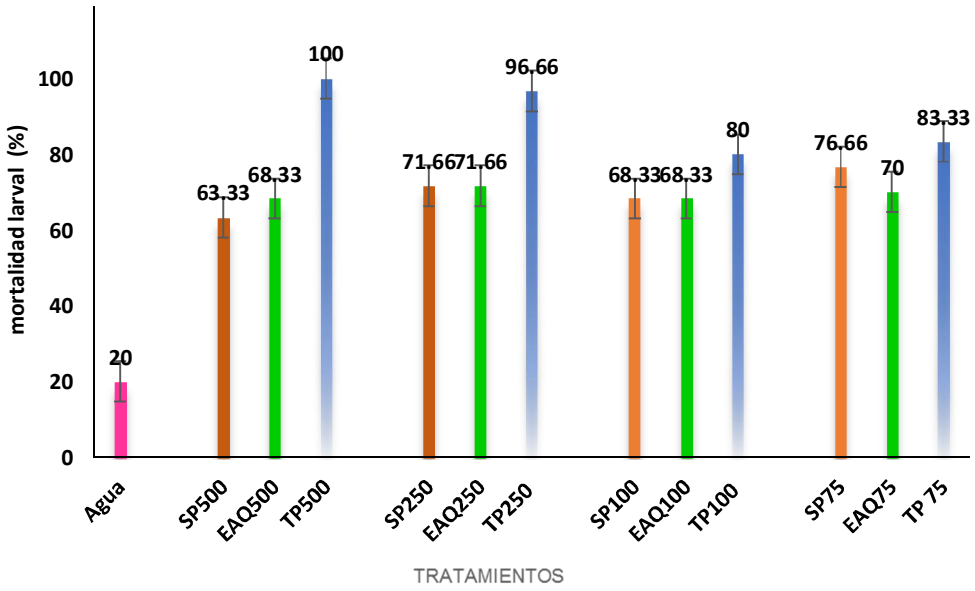


Figura 2. Mortalidad de larvas del primer instar de *Aedes aegypti* tratadas con extracto de semilla de *Lupinus campestris* (EA), esparteína (SP) y Temefos (TP). Las concentraciones que se evaluaron fueron:

En larvas del tercer instar se observó el extractos de **AQ** presento efecto larvicida. El tratamiento EAQ100 causó sobre las larvas de este instar una mortalidad del 100%, mientras que EAQ75 causó 90% de mortalidad, muy similar al efecto de Temefos®. En cuanto a los tratamiento con esparteína, los más activos fueron SP250 y SP75, teniendo una mortalidad del 76.66 y 96.66%, respectivamente. Temefos® presentó mayor mortalidad en TP75, TP250 y TP500 con una mortalidad del 73.33 y 100%. Los resultados sugieren que el tercer instar presenta una mayor sensibilidad al extracto de AQ. A continuación en la figura 3 se observa la actividad de cada tratamiento en larvas de $L_{3.}$

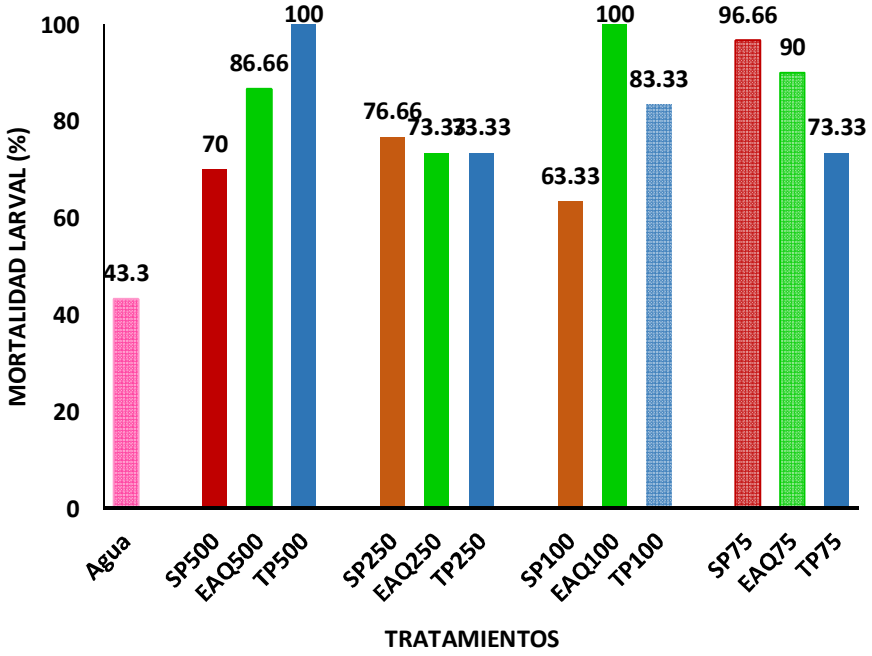


Figura 3. Mortalidad de larvas del tercer instar de *Aedes aegypti* tratadas con extracto de semilla de *Lupinus campestris* (EA), esparteína (SP) y Temefos (TP). Las concentraciones que se evaluaron fueron:

CONCLUSIONES

1) El Temefos® sigue siendo efectivo para el control de larvas del primer instar de *A. aegypti* a grandes concentraciones, pero ya lo insectos se ha observado resistencia en larvas del tercer instar.

2) El extracto de alcaloides quinolizidínicos es una alternativa para el control de larvas del tercer instar de *Aedes aegypti*, ya que presenta mayor mortalidad, así mismo se ve afecto el ciclo de vida de este insecto, pudiéndose afectar las hormonas de la muda.

REFERENCIAS

[1] Goddard, D. 2003. Physiciam's guide to arthropods of medical importance. 4 edition. CRC Press. Boca Raton. Florida. p. 494.

[2] Eldridge F. 2005. *Mosquitoes, the Culicidae*. pp: 95–111. In: Biology of disease vectors. W. C. Marquardt (ed.). 2ªedition. Elsevier Academia Press. New York, N. Y.

[3] Ravi K., Bhavani K., Sita P., Rajeswara R., Janardhan R. 2006. Composition and larvicidal activity of leaves and at emesencial oils of Chloroxylonswietenia DC against *Aedes aegpti* and Anopheles stephensi. Bioresource Technology. 97: 2481–2484.

[4] Jaffar C., Das T., Jasques J., Krejbich P., Dezizot M., Ribera A., Roques P., Gasque P. 2009. Chikungunya vírus takes centre stage in virally induced arthritis possible cellular and molecular to pathogenesis. Microbes and infection. 11: 1206 – 12018.

[5] Gómez H. 1991. El dengue en las Américas. Un problema de salud regional. Salud Pública de México. 33: pp. 347–355.

[6] Ibáñez S., Gómez H. 1995. Los vectores del dengue en México: una revisión crítica. Salud Pública en México. 37: 53–63.

[7] Palomino M., Solari L.., León W., Vega R., Vergaray M., Cubillas L., Mosqueda R., García N. 2006. Evaluación del efecto residual del temefos en larvas de *Aedes aegypti* en Lima Perú. Revista Perú Medica Experimental Salud Pública. 23(3); 158 – 162.

[8] Bisset A., Rodríguez M., San Martín L., Romero E., Montoya R. 2009. Evaluación de la resistencia a insecticidas de una cepa de *Aedes aegypti* de El Salvador. Panamá Salud Publica, 26: 229–2234.

[9] De Omega C., Navarro F., De Paula E., Luna S., Ferreira de la R., Sant G. 2007. Larvicidal activity against *Aedes aegypti* of some Brazilian medicinal plant. Bioresource Technology. 98: 2549–2556

[10] Salazar Aguilar S. 2010. Alcaloides de pemoche (*Erythrina herbácea* L.) como larvicidas contra el mosquito de la fiebre amarilla (*Aedes aegypti* L.). Tesis de maestría. Colegio de Posgraduados. pp. 15 – 17.

[11] Bermúdez K., Martínez J., Figueroa R., Wink M., Legal L. 2009. Activity of quinolizidine alkaloids from three Mexican Lupinus against the Lepidoptera crop pest *Spodoptera frugiperda*. Biocontrol. 54(3): 459-466.

[12] Wink M., Meibner C., Witte L. 1995. Patters of quinolizidine alkaloids in 56 species of the genus Lupinus. Journal Phytochemistry, 38(1): pp. 139–153.

[13] Pérez R., Rodríguez C., Lara R., Montes R., Ramírez G. 2004. Toxicidad de aceites, esencias y extractos vegetales en larvas de mosquito *Culex quinquefasciatus* SAY (Diptera: Culicidae). Acta Zoológica Mexicana. 20(1):141-152

[14] Reyes – Izquierdo L. 2013. Efecto biológico de cultivos in vitro de *Lupinus campestris* inducidas con metiljasmonato sobre *Spodoptera frugiperda*. Tesis de maestría. CeProBi–IPN. pp. 3–25.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

EVALUATION OF DIFFERENT SOURCES OF ORGANIC MATTER ON *Eisenia fetida* (Annelida: Lumbricidade) GROWTH

[Evaluación de diferentes fuentes de materia orgánica sobre el cercimiento DE *Eisenia fetida* (Annelida: Lumbricidade)]

Esteban Gottfried Burguett[a], Desiree Guzmán Gómez[a], Laura L. Ramírez Godínez[a], Violeta B. Castañeda Robles[a], K. Paola Martínez Viramontes[a], José Luis Zavala Aguirre[b+].

[a] Escuela de Biología. Universidad Autónoma de Guadalajara.

[b] Laboratorio de Hidrobiología y Ecotoxicología Acuática. Universidad Autónoma de Guadalajara.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: joseluis.zavala@mail.uag.mx

Área del Conocimiento: Ecotoxicología.

ABSTRACT
Earthworm (*Eisenia fetida*) is used to evaluate the effects of toxic agents in the soil, by toxicity bioassays. Earthworms produced in livestock manures show variable responses to the exposure to toxic agents due to vermicide dosage to the livestock which is excreted in the dregs. The artificial substrate with Peat-moss (*Sphagnum*) proposed in the standard techniques for the *Eisenia fetida* management produces chronic effects shown as weight loss due to the fungicide used to avoid mycelial development of seeds sprout. The objective is the production of *Eisenia fetida* under laboratory conditions using OCDE's substrate but with different sources of organic matter for the organisms to show stable response during the ecotoxicological tests. Each experimental group consisted in 10 organisms previously weighted and randomly distributed and placed in individual codified vials in which were added 10 grams of artificial substrate generated from the mix of clay (20%), sand (70%) and different sources of organic matter (OM) (10%). Distillate water was added to obtain a malleable consistence using between 5 and 10%. Control group with 10% OM; Low group with 28% OM; Medium group with 81.6% OM; High group with 100% OM. These previous groups used peat-moss as energy source. Oak group with 10% of dried leaves of *Quercus recinosa*; three groups with wheat bran (All-Bran) with different concentrations: Low All-Bran (10%); Medium All-Bran (28%) and High All-Bran (81.6%). The initial and final weights of surviving organisms were registered. The bioassay last for 14 days with daily observations. All groups with peat-moss as energy source showed loss of weight directly related with OM%. Groups with All-bran had 100% mortality and mycelial development. Only at oak group weight gain was observed. It is recommended to evaluate different concentration of oak leaves same as non-processed wheat bran to verify the weight gain without mycelial development.

Keywords: *Eisenia fetida*; Artificial substrate; Ecotoxicology; Organic matter.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

STUDY OF THE PRECIPITATION OF RICIN OBTAINED FROM CASTOR SEEDS WITH POLYPHENOLS EXTRACTED FROM GRAPE

(Estudio de la precipitación de ricina obtenida de las semillas de Higuerilla con polifenoles extraidos del orujo de uva)

Nubia Ivette Amaya Olivas[a]*, Juan Guillermo Ayala Soto[a], David Chávez Flores[a], Erika Salas Muñoz[a], León Raúl Hernández Ochoa[a]

[a] Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Ciencias Químicas

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: amaya.olivas@gmail.com

Área del Conocimiento: Ecotoxicología

ABSTRACT
Ricinus communis L. (castor) belongs to the subfamily Acalyphoideae comprising a total of 22 subspecies. Castor seed well known, contains about 48% oil, the rest belongs to the weight of solid residue, and has a protein content of 34-36%. For removal of ricin different authors mention the use of treatments with ammonia, caustic soda, lime and heat, in this study precipitation using ricin arises extracted from grape polyphenols, that because of those reported to or polyphenols interactions between food and salivary proteins. To carry out this study ricin castor seed extracted previously degreased using a solution of sodium chloride acidified with acetic acid with continued stirring for 6 hours and then filter paper filter, polyphenols extracted from grape by ultrasound and acetone, acidified water with 1% acetic acid, methanol (51:34:15) (v / v / v) for 30 minutes and then filtered, subsequently said mixture is broken evaporation to dryness and taken up in a mixture of acid water, methanol (50:50) (v/v), these extracts were placed in a beaker at different concentrations (50:50, 60:40, 70:30) being the most amount of ricin and each concentration at different contact times (1, 2 and 3 days), the protein was quantified by the Lowry method, the results were a decrease in protein content with the lowest concentration used in the different days of contact and as a check for evidence of allergenicity and toxicity in which there were no deaths in rats and mice where a median lethal dose of greater samples to 2000mg / kg was obtained.

Keywords: ricin, polyphenols, interaction.

GENOTOXICITY EVALUATION IN URBAN AND HAZARDOUS SOLID WASTE COLLECTORS WITH MICRONUCLEUS TEST

(Evaluación de genotóxicidad en recolectores de residuos sólidos urbanos y peligrosos con la prueba de micronúcleos)

Livier Nataly Medrano Sánchez[a]*, Guadalupe Zavala Cerna[b], Olivia Torres Bugarin[b+]

[a] School of Medicine, Universidad Autónoma de Guadalajara.
[b] Profesor investigador; School of Medicine, Universidad Autónoma de Guadalajara.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: oliviatorres@hotmail.com

Área del Conocimiento: Ecotoxicología.

ABSTRACT
In addition to the benefits of new technologies goes the production of lots of urban and hazardous solid waste. It is a global problem, but affects more to waste collectors because they are exposed directly and immediately to agents that could be genotoxic, so it is imperative to do new studies to evaluate the possible genotoxicity in these people and propose more protection methods that sometimes are not used or are not sufficient [1]. The objective is determine frequency of micronucleated cells (MNC) and nuclear abnormalities in oral mucosae from urban or hazardous solid waste collectors.
It´s a transversal and descriptive study. Were taken 44 samples of oral mucosae cells, 22 were from urban or hazardous solid waste collectors and 22 from non-collector people; it was in the Metropolitan area of Guadalajara, Jalisco in the period of November 2014 to March 2015. Each sample was collected by a gentle scrapings and were stained with acridine orange. 2000 cells were analyzed with a microscope equipped with fluorescence. MNC was recorded, as well as those with some nuclear abnormality (NA) like binucleated cells (BN), condensed chromatin (CC), lobed nuclei (NL) and karyorrhexis (CR); following Tolbert criteria [12, 15]. In the results, no difference was observed in age between both groups and great frequency of LN and CR ($p < 0.01$) were identified. In conclusion, was found that solid waste collectors have high risk of genomic instability, suggesting increased biosecurity measures.

Keywords: Micronucleus, solid waste, hazardous waste, genotoxicity.

RESUMEN
Aunado a beneficios de nuevas tecnologías va la producción de gran cantidad de basura tanto común como de residuos peligrosos, es una problemática mundial, pero afecta más a las personas recolectoras de estos desechos ya que están expuestas de forma directa e inmediata a agentes que podrían ser genotóxicos, por ello es apremiante realizar estudios que permitan evaluar el posible daño genético de estas personas y así proponer más métodos de protección [1]. El objetivo es determinar frecuencia de células micronucleadas (CMN) y alteraciones nucleares en mucosa oral de recolectores de residuos sólidos urbanos o peligrosos. Es una investigación tipo descriptiva, transversal. Se tomaron 46 muestras de mucosa bucal, 23 de recolectores de residuos sólidos urbanos o peligrosos y 23 de personas no

recolectoras; en la ciudad de Guadalajara, Jalisco en noviembre del 2014 a marzo del 2015. Cada muestra se tomó mediante un raspado suave, las cuales se fijaron y se tiñeron con naranja de acridina. Se analizaron 2000 células con microscopio equipado con fluorescencia. Se registró CMN y aquellas con alguna anormalidad nuclear (AN) como células binucleadas (BN), cromatinas condensadas (CC), núcleos lobulados (NL) y cariorexis (CR); siguiendo criterios de Tolbert [12, 15]. No se observó diferencia en la edad entre grupos y en los recolectores se identificó mayor frecuencia de CR y NL ($p<0.01$). Se detectó que los recolectores de residuos sólidos presentan alto riesgo de inestabilidad genómica, lo que sugiere aumentar medidas de bioseguridad.

Palabras Clave: Micronúcleos, Residuos sólidos, genotóxicidad.

INTRODUCCIÓN

El Manejo de Residuos en México con aproximadamente 122 millones de habitantes [2]; es un tema importante de analizar y con especial énfasis en el manejo de residuos sólidos municipales (RSM), ya que se calcula que se recolectan diariamente 86 mil 343 toneladas de basura, lo que es igual a 770 gr de basura por persona [2] y esto no es una realidad exclusiva de México. Así que la población mundial está expuesta a una inmensidad de factores contaminantes, por ejemplo en el 2011 las estadísticas del Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino (MARM) de España identificaron en la atmosfera 71 elementos contaminantes que provienen de la generación de residuos, algunos son considerados muy peligrosos para la salud aún en cantidades muy reducidas, como los radiactivos, las dioxinas y los furanos, los metales pesados y diferentes óxidos inorgánicos o radiaciones ionizantes [1], incluso pueden ser agentes infecciosos [3], algo similar ocurre con las nuevas tecnologías que si bien traen consigo muchos beneficios también gran cantidad de basura tanto común como residuos peligrosos. Claro está que los recolectores de residuos urbanos, peligrosos o electrónicos son quienes en primer lugar son afectadas por estar expuestos directamente, inmediata y continuamente, y en muchas ocasiones sin mediadas de seguridad. Por todo ello es importante realizar estudios que permitan evaluar todos los posibles riesgos, pero es apremiante evaluar el riesgo al daño al material genético ya que este es silencioso y sus consecuencias se observan cuando es demasiado tarde, esto con la finalidad de establecer medidas de seguridad más efectivas, ya que si bien ya cuentan con códigos y material de seguridad personal es necesario tomar nuevas y mejores precauciones además de concientizar a todo el personal de su uso porque en ocasiones aun que cuenten con el no utilizan o no es suficiente. Incluso se deben tomar en cuenta las exposiciones derivadas de la situación económica de los individuos, la ingesta de alimentos contaminados, cansancio emocional o psicológico sumado al deterioro de su organismo y mayormente importante la carencia de visitas periódicas al médico desempeñan un papel importante en la continuidad de estos problemas en relación al manejo de Residuos Sólidos o de cualquier otro tipo de residuos y peor aún, potencializa los efectos de los factores antes mencionados [4].

Dentro de los trastornos a salud que se ocasionan por la exposición a residuos son cambios en el comportamiento, disminución de la función pulmonar, mayor susceptibilidad del sistema respiratorio, digestivo, inmunológico, nervioso, alteración de la expresión y función celular, reducción en la esperanza de vida y el más sobresaliente es el daño masivo al ADN [4, 5].

Sin embargo, países Nicaragua, Cuba y Brasil describen que los Individuos que están en contacto con los residuos sólidos municipales y algunas sustancias como pesticidas no han experimentado cambios drásticos o sustanciales en su ADN, sin embargo, estos han presentado cuadros clínicos con neumonía

tóxica, problemas gastrointestinales, molestias músculo-esqueléticas e incluso casos de Hepatitis B [6, 7, 8]. Otros investigadores de países europeos como Dinamarca y Francia describieron que personas en contacto con residuos sólidos experimentan inflamación nasal y problemas respiratorios como asma, disnea, estrechez de pecho, entre otras. Si bien son pocos los estudios encaminados a evaluar los riesgos de este tipo de exposición todos los estudios realizados demuestran que por más baja que sea la exposición de las personas a los agentes contaminantes en los residuos sólidos estos tendrán efectos adversos en la salud los cuales aumentaran en magnitud según el estado de salud del individuo, sus hábitos y el tiempo de exposición [9]. Sin embargo es importante continuar con las investigaciones sobre los posibles riesgos, ya sea por los datos contradictorios o porque cada día se genera más y diferentes tipos de residuos. Entonces, el estudio del riesgo laboral como consecuencia de la exposición a residuos peligrosos debe ser prioridad ya que en distintos ámbitos laborares se tiene contacto con productos mutagénicos, y en algunos casos no se atiende a las medidas de seguridad necesarias, por otro lado, los métodos utilizados en la evaluación de este riesgo frecuentemente son costosos, complicados e invasivos. Ante este panorama, la técnica de micronúcleos y anormalidades nucleares en mucosa bucal, que consiste en observar al microscopio la morfología de las células epiteliales superficiales después de su toma, fijación y tinción, ofrece una oportunidad en el monitoreo del daño genético en las poblaciones con alto riesgo laboral por la exposición a genotóxicos. La prueba es rápida, sencilla, económica, mínimamente invasiva, relativamente indolora y bien aceptada por los pacientes; además, no es necesaria la utilización de un cultivo celular, por lo que podría ser utilizada en el diagnóstico precoz del daño genotóxico derivado de la exposición laboral [11, 12, 13, 14, 15]. Además en el tejido epitelial también es posible observar anomalías nucleares (AN) que son indicadores de daño genético y citotóxica, en estas se incluyen células binucleadas (BN) o núcleos lobulados (NL), que son un bloqueo de la mitosis después de la replicación del ADN. Otras anormalidades observadas son condensación de cromatina (CC), células en Cariorrexis (CR), Picnosis (PN), que son indicadores de muerte celular o células en degeneración; y células en Cariolisis (CL) que representan la disolución completa de la cromatina [13].

Por tanto el objetivo de desarrollar este trabajo de investigación es conocer si los recolectores de residuos urbanos o peligrosos de la Zona Metropolitana de Guadalajara tienen alterada la frecuencia de CMN y/u otras anormalidades nucleares.

METODOLOGÍA

Es una investigación de tipo descriptiva, transversal y comparativa. Se colectaron 44 muestras de mucosa bucal de 22 recolectores de basura urbana o de residuos peligrosos y 22 personas no expuestas (controles), el método de muestreo fue por conveniencia.

El criterio de inclusión del estudio fue ser recolector de Residuos sólidos urbanos o peligrosos en la Zona Metropolitana de Guadalajara, se excluyeron los individuos con enfermedades crónicas degenerativas o personas que tomaran fármacos o drogas que pueden ser factores predisponentes para efectos genotóxicos. Los casos controles deberían ser no recolector, aparentemente sano y sin toxicomanías, cada uno de ellos se eligió lo más parecidos posibles a los recolectores en cuanto a su edad e índice de masa corporal (IMC).

Cada individuo firmó el consentimiento informado basado en la declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial, se les informó del objetivo de investigación, el procedimiento de lo que se iba a hacer,

los beneficios de este y también los posibles riesgos que pudieran tener. Todos los individuos fueron entrevistados con un cuestionario que incluía variables como edad, sexo, hábitos alimenticios, consumo de café, alcohol, tabaco, enfermedades, medicamentos; tiempo de laborar como recolector, horas al día y a la semana, uso de protección personal y medidas de seguridad. También se le tomaron medidas físicas tales como talla, peso, perímetro abdominal y el índice de masa corporal.

Se obtuvieron dos muestras de células de mucosa oral una de cada carrillo por cada individuo participante, previo a un suave enjuague bucal, los frotis se realizaron sobre laminillas y se sacaron a temperatura ambiente, se fijaron en etanol al 80% por 48 horas y se tiñeron con naranja de acridina; este colorante tiñe de color amarillo-verde limón el núcleo de las células y de naranja el RNA y proteínas.

Los frotis teñidos se conservaron en cajas para portaobjetos bien cerradas (no exponer a la luz), para mantener en óptimas condiciones la tinción de las células, esto hasta el momento de su uso [13].

Se analizaron 2000 células con microscopio con fluorescencia equipado con filtros 450- 490nm, 100x modelo Carl Zeiss IVFL Axiostar Plus bajo el objetivo de 100x; para poder ser observados los frotis se le puso una gota de buffer de fosfato sobre la muestra sobre este se colocó un cubreobjetos, quitando las burbujas y finalmente se le coloca una gota de aceite de inmersión. Del recuento de 2000 células se registraron células micronucleadas (CMN), así como aquellas con alguna anormalidad nuclear (AN) como células binucleadas (BN), cromatinas condensadas (CC), núcleos lobulados (NL), cariorexis (CR) y Cariolisis (CL), siguiendo los criterios de Tolbert [13, 16].

Para el análisis estadístico se incluyó la media y desviación estándar para fines descriptivos y para fines de inferencia, mientras que para comparar las frecuencias de MN y AN entre ambos grupos se utilizó la prueba U de Mann-Whitney, se utilizó GraphPadPrism (5 version), los resultados se expresan por cada 2000 células.

RESULTADOS

Al analizar los resultados, los grupos de trabajo son similares en cuanto a edad e IMC (P=0.5), al analizar el resto de la información se identificó que el 34.78% de los recolectores de residuos eran fumadores y el 56.52% tomaba alcohol al menos una vez al mes, además el 82.60% de los individuos sufren de sobre peso u obesidad.

En relación a la frecuencia de CMN y AN (Cuadro I), se identificó que los recolectores presentan mayor frecuencia de CR y NL ($p<0.01$) que grupo control, al comparar recolectores de desechos urbanos con los de desechos peligrosos se identificó que los primeros presentan mayor frecuencia de BN y CL ($p=0.05$) y los segundos de CC y CR ($p=0.01$).

Cuadro I Frecuencia de Anormalidades Nucleares

Grupo de estudio		n	Edad	CMN	BN	CC	CR	CL	PN	NL
Recolectores	**Residuos urbanos**	16	37.4 ± 9.4	0.2 ±0.4	4.6 ±2.8	13.5±13.7	5.2 ±4.9	4.6 ±4.0	1.7 ±2.2	17.4 ±7.6
	Residuos	6	30.2±16.5	0.2±0.4	2.2±1.6	2.5±1.8	12.4±6.7	0.7±0.9	1.2±1.1	15.0±1.0

	peligrosos						
	Total	22					
Controles		22	35.5±12.0	0.9±0.9	2.2±2.9	5.0±5.9	1.0±1.4	2.9±2.0	0.3±0.5	4.3±3.2

Tamaño de muestra (n), células micronúcleadas (CMN), células binucleadas (BN), cromatina condensada (CC), núcleo lobulado (NL), cariorexis (CR) y Cariolisis (CL). Diferencia estadística con la prueba de U de Mann Whitney.

DISCUSIONES

El número de recolectores de cada ciudad es muy pequeño comparativamente con la población en general, y por ello es una población clasificada como vulnerable por ser un grupo minoritario, y si esto se le agrega que son pocos los estudios que se realiza en este tipo de población la problemática para ellos es aún mayor, es por eso que cualquier estudio encaminado en conocer mejor la salud de estos individuos es bien aceptado y necesario.

Este estudio muestra que si bien los recolectores no presentan alteración en la frecuencia de CMN, si al daño al ADN y daño celular manifestado por la presencia de altas frecuencias de otras AN como ocurrió en los recolectores de residuos urbanos quienes presentan el doble de frecuencia de células BN que los controles y recolectores de residuos peligrosos, recordemos estas alteraciones son células que contienen dos núcleos principales y que no parecen implicar una interacción directa con el ADN, sin embargo si involucra la interferencia con los hechos ocurridos a finales de la división celular. Por esto se piensa que es un evento que tiene lugar en dos etapas, en primer lugar ocurre la mitosis que dará origen a dos núcleos pero el citoplasma no se divide; en consecuencia, se forma una célula binucleadas, misma que será eliminada si pertenece a un epitelio de revestimiento, pero si este fenómeno ocurre en una célula del epitelio basal o pertenece a otro tejido entonces ambos núcleos de la célula Binucleada entraran en mitosis al mismo tiempo, entonces cuando las membranas nucleares se desintegren, simultáneamente los cromosomas de ambos núcleos quedaran incluidos en el mismo huso y serán arrastrados juntos, así que en el momento de que la mitosis esté completa, habrá dos células con doble material genético cada una o bien, una célula tetrapaploide, si se repite el fenómeno de interrupción de la citocinesis [16, 17, 18].

También se puede observar que los recolectores también tienen alta frecuencia de CC, CR y NL, las primeras tienen núcleos intensamente teñidos, con regiones condensadas o cromatina agregada exhibiendo un patrón nuclear moteado o estriado, es evidente que la cromatina está agregada en algunas regiones del núcleo; mientras que se pierde en otras áreas, así cuando la condensación es extensa da la apariencia de un núcleo fragmentado, estas células al igual que las células en cariorexis terminan con la fragmentación del núcleo. Lo que conlleva la desintegración total de la cromatina, sin embargo su origen aun no es determinado, tal vez están en etapas tempranas de la
Apoptosis aunque dicha información aún no es concluyente [16, 18]. Por su parte las CR que presentan un núcleo que se caracteriza por agregación de la cromatina nuclear. Con respecto a las células de cromatina condensada, ellas tienen un patrón moteado nuclear indicativo de la fragmentación nuclear conducente a la eventual desintegración del núcleo. Estas células tal vez están pasando por una fase avanzada de apoptosis pero esto aún no ha sido comprobado [16, 18]. Y por último el NL o prolongación nuclear, broken eggs (NL-BE) se caracteriza por presentar un núcleo con una constricción en un extremo, sugestivos de un proceso de eliminación de material nuclear por gemación. El lóbulo presenta las mismas características morfológicas y de tensión que el núcleo, pero el tamaño es de 1/3 a 1/4 del

núcleo Tolbert, los definió como “Broken egg” y Bhattathiri describe estos fenómenos como “Nuclear buds” reconociéndolas como anormalidades nucleares [17, 18]. El origen y significado biológico de los NL en células exfoliadas aun no es totalmente comprendido y existen muy pocas publicaciones con crecientes a este tema. Algunos investigadores consideran a los “nuclear buds” en linfocitos como indicadores de genotóxicidad, sin embargo, en células exfoliadas no es claro ya que frecuentemente en diversos procesos de salud y enfermedad aparecen con mayor frecuencia CMN en comparación a las “nuclear buds”, por lo tanto, se puede asumir que las células con NL, no están asociadas a eventos genotóxicos, clastogénicos o aneuploidogénicos, pero tal vez sí a procesos degenerativos en la primera capa de células epiteliales (estrato germinativo) [16, 18, 19].

CONCLUSIONES

Es por todo esto que se concluye que esta población se encuentra en alto riesgo de daño citotóxico y genotóxico y que es importante poner atención en este tipo de personas que están expuestas a muchas sustancias tóxicas que son producto del consumismo en el que se vive hoy en día y que no se toma conciencia del daño a la salud de cientos de personas que trabajan Recolectando los Residuos y que se debe tomar medidas más estrictas en el manejo de este tipo de deshechos y en la protección individual, para así garantizar el estado óptimo de salud para estas personas.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al apoyo de la Facultad de Medicina de la UAG y al Licenciado Ricardo del Castillo.

REFERENCIAS

[1] Val AD. El problema de los residuos en la sociedad del bienestar. Boletín CF+S 50 (Madrid) 2011; (50): 29-38

[2] Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. (2015) Conteo de Población y vivienda. Resultados preliminares. México: INEGI

[3] Ogunseitan O. The Basel Convention and e-waste: translation of scientific uncertainty to protective policy. 6/S2214-109X. 2013; (13)70110-4

[4] Tabrizi R, Bernard A, Thommen A, De Winter F, Oppliger A, HilWker S, Tschopp A, Hotz P. (2010) Surfactant protein-D and exposure to bioaerosols in wastewater and garbage workers. Int Arch Occup Environ Health 83:879–886.

[5] Marinho T, RodriguesC, Araújo S, Matos M, Alves M, GarciaA, etall. (2014) Epidemiology of hepatitis B virus infection among recyclable waste collectors in central Brazil.Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 47(1):18-23.

[6] Lamadrid A, Romero I, González J, Mandina T (2011). Biomonitoring of workers exposed to pesticides. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas;30(2):235-244

[7] Martins R, Freitas N, Kozlowskj A, Reis N, Lopes C, Teles S, Gardinali N, Pinto M. (2014) Seroprevalence of hepatitis E antibodies in a population of recyclable waste pickers in Brazil, Journal of Clinical Virology 59: 188–191.

[8] Grant K, Goldizen F, Sly P, Brune M-L, Neira M, van den Berg M, Norman R.(2013) Health consequences of exposure to e-waste:a systematic review. Lancet Glob Health; 1: e350–61

[9] Cisneros-Camacho A, Estrada-Martínez S, Martínez-García S A, González-Herrera A, García-Corral N.(2008). Seroepidemiology of Infection with Toxoplasma gondii in Waste Pickers and Waste Workers in Durango, Mexico. Blackwell Publishing Ltd. 55, Nº 6. 306-312.

[10] Zalacain M, Sierrasesúmaga L, Patiño A (2005). The cytogenetic assay as a measure of genetic instability induced by genotoxic agents.An. Sist. Sanit. Navar, Vol. 28, No 2, 227-236

[11] Sotil, Giovanna, et al. "Aplicación de dos biomarcadores para el análisis de lesiones en el DNA de bivalvos marinos." Revista Peruana de Biología 13.3 (2007): 249-254.

[12] Torres-Bugarín O, Zavala-Cerna M, Macriz-Romero N, Flores-García A, Ramos-Ibarra M. (2013) Procedimientos básicos de la prueba de micronúcleos y anormalidades nucleares en células exfoliadas de mucosa oral. El Residente. Vol. 8 (1): págs. 4-1.

[13]Torres-Bugarín O., Ramos-Ibarra ML. (2013) 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., 31(2):650-657.

[14] Díaz Caballero A., Mora Solano E., Herrera Herrera A.(2013). Presence of micronuclei in oral epithelium cells, as marker of chromosomal instability. Systematic review. Av. Odontoestomatol vol.29; no.2.

[15] Thomas, P., Holland, N., Bolognesi, C., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Zeiger, E., ... & Fenech, M. (2009). Buccal micronucleus cytome assay.Nature protocols, 4(6), 825-837.

[16] Shi, Qinghua, and Randall W. King. (2005). "Chromosome nondisjunction yields tetraploid rather than aneuploid cells in human cell lines." Nature 437.7061: 1038-1042.

[17] Tolbert, Paige E., Carl M. Shy, and James W. Allen. (1991) "Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: a field test in snuff users." American Journal of Epidemiology 134.8: 840-850.

[18] Bhattathiri, Narayanan V., et al. (1998). "Radiation-induced acute immediate nuclear abnormalities in oral cancer cells." Acta cytologica 42.5: 1084-1090.

[19] Nersesyan, Armen K., (2005). "Nuclear buds in exfoliated human cells." Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 588.1: 64-68.

TRANSCRIPTIONAL COUPLING (Mfd) OF BASE EXCISION REPAIR (BER) IN SPORULATING *Bacillus subtilis* CELLS

(Reparación por escisión de bases acoplada a la transcripción en células esporulantes de *Bacillus subtilis*)

Alejandro Guerrero-Zavala[a*+], Fernando Ramírez-Guadiana[a], Mario Pedraza-Reyes[a].

[a*] Department of Biology, University of Guanajuato. 36050 Noria Alta. Guanajuato, Gto., México.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: agz_ag@hotmail.com

Área del Conocimiento: Biología y Química del Estrés Oxidativo.

ABSTRACT
In non-growing vegetative cells of *B. subtilis* the Mfd protein has been involved in transcription-associated-mutagenesis as well as in transcriptional-coupling of DNA repair in sporulating cells of this microorganism. A recent report revealed that a Mfd-deficient mutant of *B. subtilis* presented defects in sporulation even in the absence of external DNA damage suggesting that spontaneous DNA lesions, generated in sporangia, may activate the TCR-dependent pathway. Oxidized bases, apurinic/apyrimidinic (AP) sites and single and double strand breaks are side products resulting from attack of DNA by radical oxygen species (ROS). These lesions are processed with aid of the GO system (MutM, MutY and MutT) as well as by the AP endonucleases Nfo ExoA and Nth. We report here that *B. subtilis* sporangia deficient for Mfd increased its Spo$^-$ phenotype following genetic inactivation of the full GO system or the Nfo, ExoA, Nth-encoding genes, strongly suggesting that spontaneous ROS-promoted lesions that interfere with transcription are eliminated by Mfd and Base Excision Repair (BER). To further investigate this notion, *B. subtilis* sporangia lacking Mfd and the BER proteins GO or Nfo ExoA Nth were treated with a LD_{50} of the ROS-promoter agent hydrogen peroxide (H_2O_2) and the survival fraction of sporangia from each strain were calculated after 1 h. Notably, sporangia deficient for Nfo ExoA Nth and Nfo ExoA Nth Mfd were more susceptible to H_2O_2 treatment than sporulating cells of the wild type strain. Intriguingly, GO-deficient sporangia were less sensitive to H_2O_2 than its parental WT counterpart; however, disruption of *mfd* notably sensitized GO-deficient sporangia to the oxidizing agent. Altogether, our results suggest that in non-replicating sporulating *B. subtilis* cells Mfd and the BER system concertedly coordinate the elimination of ROS-promoted DNA lesions that compromise the transcriptional program that drives sporulation.

Keywords: Transcriptional coupling repair; GO and BER repair systems; ROS; sporulation; *B. subtilis*.

RESUMEN
En células carentes de división, la proteína Mfd de B. subtilis ha sido involucrada en la mutagénesis asociada a la transcripción; así como en la reparación de ADN acoplada a la transcripción (TCR) en células esporulantes de este microorganismo. Un reporte reciente reveló que una mutante de B. subtilis deficiente en Mfd presentó defectos en la esporulación incluso en ausencia de agentes externos dañinos para el ADN, sugiriendo que las lesiones espontáneas de ADN, generadas en el esporangio, pueden activar la vía dependiente de TCR. Las bases oxidadas, sitios apurínicos/apirimidínicos (AP) así como las

roturas de cadena dobles y sencillas pueden ser generadas espontáneamente como producto del ataque del ADN por especies reactivas de oxígeno (ROS); dichas lesiones son procesadas por el sistema GO (MutM, MutY y MutT) así como por las AP endonucleasas Nfo, ExoA y Nth (Sistema BER). Un estudio reciente mostró que la carencia de Mfd afectó la eficiencia de esporulación de B. subtilis sugiriendo que las lesiones espontaneas, promovidas por ROS que interfieren con la transcripción son procesadas con la participación de esta proteína y las AP endonucleasas Nfo, ExoA y Nth. Para investigar esta hipotesis, esporangios de B. subtilis carentes de Mfd y las proteínas del sistema BER fueron tratadas con una DL50 de peróxido de hidrógeno (H2O2) que es un agente promotor de ROS; después de una hora de tratamiento, se calculó el porcentaje de supervivencia para cada una de las cepas tratadas y no tratadas. Se encontró que los esporangios deficientes en Nfo, ExoA y Nth así como Nfo, ExoA, Nth y Mfd fueron mas susceptibles al tratamiento con H_2O_2 que las células esporulantes de la cepa silvestre. En conjunto, nuestros resultados sugieren que en células esporulantes de B. subtilis que no replican su genoma, Mfd y el sistema BER coordinan la eliminación de las lesiones promovidas por ROS y que comprometen el programa transcripcional que regula la esporulación.

Palabras Clave: Reparación acoplada a la transcripción, Sistema de reparación GO y BER, esporulación, *B. subtilis.*

INTRODUCCIÓN

Cuando las condiciones nutricionales y ambientales son poco favorables para su crecimiento vegetativo *Bacillus subtilis* es capaz de emprender un proceso de diferenciación celular que da lugar a la formación de una endospora. Este proceso, que consta de ocho etapas, inicia con un evento de división celular asimétrica que da como resultado la formación de dos compartimentos, la célula madre y la preespora, cada uno conteniendo una copia cromosomal idéntica [1]. La esporulación en *B. subtilis* es regulada en gran medida por una cascada de factores sigma (σ) que se unen a la RNA polimerasa, permitiendo así la expresión espacial y temporal de genes requeridos para la formación de la espora [2]. Además de los factores sigma, el factor transcripcional Spo0A juega un papel crucial en el proceso de esporulación ya que regula directa o indirectamente, varios cientos de genes que participan en este evento de diferenciación [2][3]. Las esporas de *B. subtilis* son resistentes a un gran número de condiciones ambientales extremas, incluyendo el calor, la abrasión, la desecación extrema, la exposición a agentes químicos, la exposición al ataque de otros organismos, a enzimas degradativas y a la prolongada exposición a la radiación solar [1][4][5][6]. Además, las esporas poseen la habilidad de permanecer en latencia por largos periodos de tiempo y germinar cuando perciben condiciones de crecimiento favorables [2][4]. Se han identificado varios factores importantes en la resistencia de las esporas de *B. subtilis,* incluyendo las condiciones de esporulación, particularmente la temperatura, las cubiertas de la espora, la relativa impermeabilidad, bajo contenido de agua y un alto nivel de minerales en el centro de la espora (“core”), saturación del DNA de la espora con las proteínas pequeñas ácido-solubles (SASP) del tipo α/β; además de los sistemas de reparación que se encuentran durante la germinación de las espora [4][5][6].

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) formadas en la célula ya sea como producto del metabolismo celular o por agentes externos, tienen la capacidad de reaccionar con lípidos, proteínas y con el ADN. De acuerdo a esto, se ha mostrado que cuando el DNA es atacado por ROS, resulta en la formación de bases oxidadas como 8-oxo-adenina y 8-oxo-guanina (8-oxo-G), entre otras; así mismo, este ataque puede generar sitios apurínicos/apirimidínicos (AP) [7]. Las lesiones no voluminosas o que no distorsionan la cadena incluida la 8-oxo-guanina (8-oxo-G) y el uracilo son procesados por la vía de reparación por

escisión de bases (BER), la cual requiere la participación de diferentes DNA glicosilasas y al menos una endonucleasa apurínica/apirimidínica (AP). *B. subtilis* posee un sistema de prevención/reparación dedicado exclusivamente a evitar los efectos mutagénicos de la 8-oxo-G; dicho sistema denominado GO, está conformado por las proteinas MutM, MutY y MutTA. *B. subtilis* además cuenta con tres proteínas diferentes que poseen actividad de AP-endonucleasas, denominadas Nfo, ExoA y Nth para eliminar éstas lesiones genotóxicas [7].

Se ha reportado que la vía de reparación acoplada a la transcripción (Mfd) juega un papel importante en eliminar lesiones espontáneas durante la esporulación, pues su sola ausencia afectó dicho proceso, sugiriendo así que las lesiones espontáneas que ocurren en células esporulantes, como la 8-oxo-G y los sitios AP, podrían afectar la expresión de genes que son específicamente requeridos para llevar a cabo de manera eficiente la formación de la espora [1]. Utilizando un enfoque genético-molecular, en el presente trabajo se investigó una posible interconexión entre Mfd y la ruta de reparación BER en el procesamiento de lesiones de ADN que tienen el potencial de afectar el proceso de la esporulación en *B. subtilis*.

METODOLOGÍA

En la Tabla 1 se muestran las cepas de *B. subtilis* utilizadas en este estudio.

Tabla 1. Cepas de *B. subtilis* usadas en este estudio.

Cepa	Genotipo
168	Wild type Trp^-
PERM1309	Δ*mfd*::spc (Spc)
PERM1307	Δ*nfo*::neo *exoA*:: tet *nth*:: eri (Neo Tet Eri)
PERM1310	Δ*nfo*::neo Δ*exoA*:: tet Δ*nth*:: eri Δ*mfd*::spc (Neo Tet Eri Spc)
PERM1136	Δ*MutT*::neo Δ*MutM*::tet Δ*MutY*::eri (Neo Tet Eri)
PERM1390	Δ*MutT*::neo Δ*MutM*::tet Δ*MutY*::eri Δ*mfd*::spc (Neo Tet Eri Spc)

Experimentos de esporulación

Las cepas de *B. Subtilis* fueron crecidas en medio DSM a 37 ºC durante 24 h. Para determinar la eficiencia de esporulación se realizaron diluciones seriadas en PBS y se plaquearon alícuotas del cultivo en medio LB sólido, las unidades formadoras de colonias (ufc) fueron contadas después de 16 horas de incubación.

Experimentos de resistencia a peróxido de hidrógeno

Las cepas de *B. subtilis* fueron crecidas en medio DSM a 37 ºC y se monitoreó la densidad óptica a 600 nm hasta encontrar T_0 (tiempo en el cual la pendiente de la fase logarítmica y la fase estacionaria se

interceptan), después de 4.5 h los cultivos fueron divididos en dos, dejando uno como control y otro expuesto a tratamiento con peróxido de hidrógeno (20 mM). Los cultivos fueron incubados durante 1 h más. Para determinar la sobrevivencia al tratamiento se realizaron diluciones seriadas en PBS y se plaquearon alícuotas de ambos cultivos en medio LB sólido, las ufc fueron contadas después de 16 h de incubación a 37 ºC.

RESULTADOS

Efecto de la pérdida del sistema GO y Nth Nfo ExoA sobre la esporulación de una mutante de *B. subtilis* deficiente en Mfd.

Para conocer la interrelación entre Mfd con el sistema BER (Nfo ExoA Nth) y el sistema GO durante el procesamiento de lesiones espontaneas generadas durante la esporulación de *B. subtilis*, se indujo la esporulación de las cepas carentes de Mfd y/o el sistema BER, así como las que carecían de Mfd y/o el sistema GO y se determinó la eficiencia de esporulación de estas mutantes en referencia a la cepa silvestre. Los resultados de este análisis mostraron que la ausencia de Mfd afecta la esporulación de una manera muy similar a la observada en las cepas carentes del los sistemas de reparación BER y GO, respectivamente (Fig. 1 y Fig. 2). Sin embargo, dicho efecto incremento de manera notable cuando se inactivó el gen *mfd* en estas mutantes (Figs. 1 y 2). Estos resultados sugieren que Mfd, junto con Nfo ExoA y Nth participan en el procesamiento de lesiones genéticas espontaneas que comprometen la esporulación de *B. subtilis*.

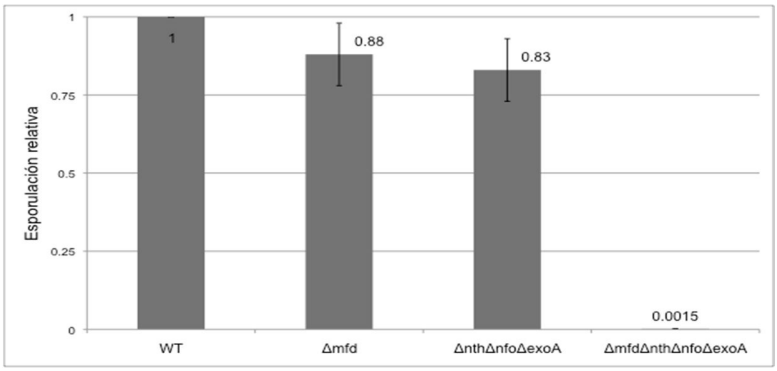


Figura 1. Esporulación relativa de las cepas deficientes en el sistema Mfd y/o Nfo EXoA Nth,en comparación con la cepa parental silvestre.

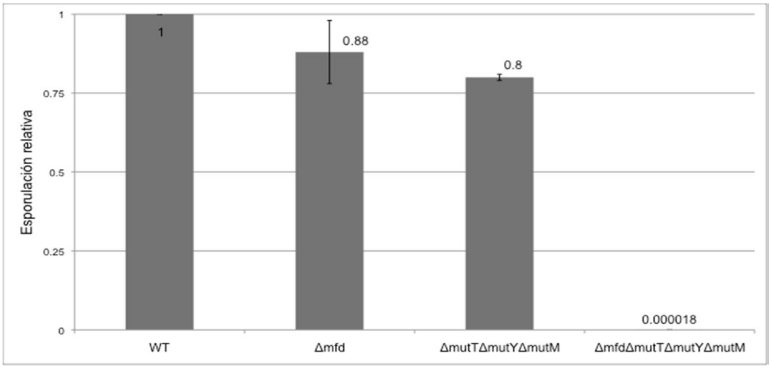


Figura 2. Esporulación relativa de las cepas deficientes en el sistema GO y en Mfd-GO en comparación con la cepa silvestre.

Efecto del peróxido de hidrógeno en la supervivencia de cepas de *B. subtilis* deficientes en Mfd, GO y/o Nth Nfo ExoA, durante la esporulación.

A continuación se investigo la participación de los sistemas Mfd, GO y BER en proteger a los esporangios de *B. subtilis* de los efectos nocivos del H_2O_2. Las células esporulantes colectadas 4.5 h después de iniciada la esporulación fueron tratadas por 1 h con 20 mM del agente oxidante. Los resultados de este análisis mostraron que en referencia a la cepa parental silvestre, la carencia de las AP-endonucleasas Nfo ExoA y Nth incrementó de manera significativa la susceptibilidad de los esporangios de *B. subtilis* al tratamiento con H_2O_2 (Fig. 3). Además se observó que la inactivación de Mfd no incrementó la susceptibilidad de la triple mutante *nfo exoA nth* al agente oxidante (Fig. 3).

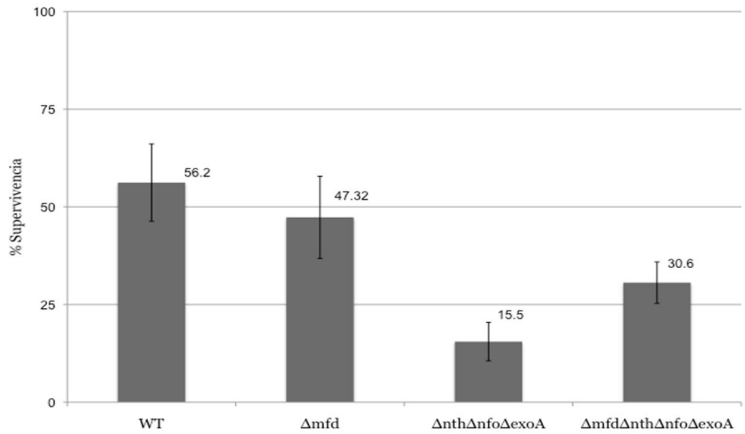


Figura 3. Porcentaje de supervivencia de esporangios de cepas de *B. subtilis* carentes en mfd y/o Nth ExoA Nfo. Las células fueron tratadas con H_2O_2 20 mM, 4.5 h después de iniciada la esporulación. Los resultados representan el promedio de tres repeticiones para cada cepa ±SD.

Por otra parte, la cepa deficiente en el sistema GO mostró mayor resistencia a los efectos nocivos del H_2O_2 que la cepa silvestre y que la mutante mfd (Fig. 4). Sorpresivamente, la inactivación de *mfd* en la mutante GO abolió dicho efecto, ya que la cuádruple mutante incrementó al menos 10 veces su susceptibilidad al peróxido de hidrógeno con respecto a la cepa deficiente en Mfd (Fig. 4).

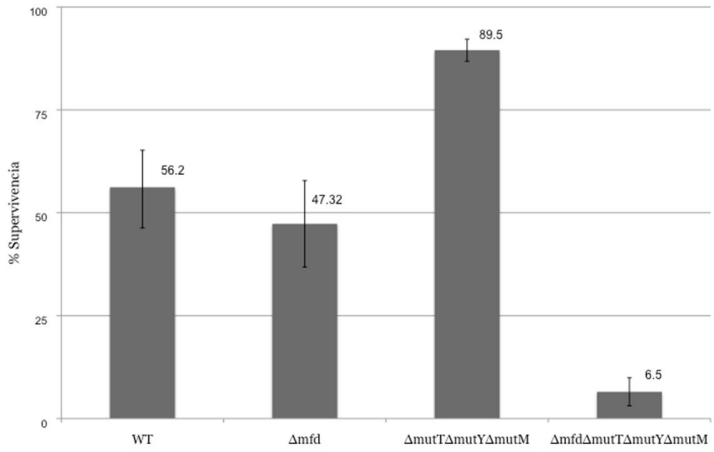


Figura 4. Porcentaje de supervivencia de esporangios de cepas de *B. subtilis* carentes en Mfd y/o MutT MutM MutY. Las células fueron tratadas con H_2O_2 20 mM, 4.5 h después de iniciada la esporulación. Los resultados representan el promedio de tres repeticiones para cada cepa ±SD.

DISCUSIÓN

Los resultados descritos en este trabajo mostraron que las enzimas del sistema GO, involucradas en eliminar y/o prevenir los efectos mutagénicos de la guanina oxidada, así como las AP endonucleasas Nfo, ExoA y Nth, juegan, junto con Mfd, un papel crucial en eliminar lesiones de ADN generadas espontáneamente durante la esporulación. Dichas lesiones, además de la 8-Oxo-G muy posiblemente incluyen sitios AP y roturas de cadena sencilla; además, de los precursores 8-Oxo-GTP y 8-Oxo-dGTP. Los resultados con las cuádruples mutantes *mfd nfo exoA nth* y *mfd mutM, mutY, ytkD* son consistentes con la idea de que estas lesiones afectan dramáticamente la generación de esporas en *B. subtilis.*

La adición de un agente oxidante exógeno (H_2O_2) a células esporulantes de *B. subtilis* mostró que Mfd y las enzimas Nfo ExoA y Nth muy posiblemente convergen en la misma ruta para eliminar sitios AP y roturas de cadena sencilla, productos del estrés oxidativo. La alta resistencia a los efectos nocivos del peróxido de hidrogeno mostrado por la cepa GO fue muy intrigante, ya que en estudios previos [8] se reportó que su frecuencia de mutación espontanea es tres ordenes de magnitud superior a la cepa silvestre. Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que la hipermutabilidad de la cepa GO promueve un fenotipo de alta resistencia al H_2O_2 y que Mfd juega un papel prominente en este fenómeno ya que la interrupción de este en la cepa GO aumentó en un orden de magnitud la susceptibilidad de los esporangios de *B. subtilis* al tratamiento con peróxido de hidrógeno. En experimentos futuros se investigará el mecanismo mediante el cual Mfd regula la alta resistencia al H_2O_2 cuando los niveles de 8-Oxo-G y/o los depósitos de los precursores 8-OxodGTP y 8-OxoGTP incrementan durante la esporulación de *B. subtilis*.

CONCLUSIÓN

En resumen, los datos obtenidos en el presente trabajo sugieren que, *i*) Mfd, el sistema GO y las AP endoncleasas Nfo ExoA y Nth juegan un papel crucial en eliminar las lesiones de ADN generadas espontáneamente que comprometen la esporulación de *B. subtilis*; *ii*) Mfd modula una ruta novedosa que incrementa la resistencia de los esporangios de *B. subtilis* al H_2O_2 posiblemente como producto de un aumento en los niveles de 8-OxoG y/o los precursores 8-Oxo-dGTP y 8-Oxo-GTP.

AGRADECIMIENTOS
Este trabajo fue apoyado por el CONACyT (Subsidios 205744 and 221231) y la Universidad de Guanajuato (subsidios DAIP-324-2013 y 602-2015). A. Guerrero Zavala agradece la beca de licenciatura otorgada por el CONACyT y al equipo de trabajo del Laboratorio de Mutagénesis Reparación de ADN del Departamento de Biología en la Universidad de Guanajuato, a cargo del Dr. Mario Pedraza Reyes.

REFERENCIAS

[1] Ramirez, F., Barajas, R., Ayala, V., Robleto, E., Pedraza, M. (2013), Transcriptional coupling of DNA repair in sporulating *Bacillus subtilis* cells. Mol Microbiol. 90: 1088-1099.

[2] Errington, J. (2003). Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. Nat Rev Microbiol. 1: 117–26.

[3] Fawcett, P., Eichenberger, P., Losick, R. & Youngman, P. (2000). The transcriptional profile of early to middle sporulation in *Bacillus subtilis*. Proc Natl Acad Sci. USA. 97: 8063–8068.

[4] Nicholson, W. L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H. J. & Setlow, P. (2000). Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. Microbiol Mol Biol Rev. 64: 548–572.

[5] Setlow, P. (2006). Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. J Appl Microbiol 101, 514–25.

[6] Pedraza-Reyes M, Ramírez-Ramírez N, Vidales-Rodríguez LE, Robleto EA. 2012. Mechanisms of bacterial spores survival, p 73–84. In Abel-Santos E (ed), Bacterial spores: current research and applications. CaisterAcademic Press, Wymondham, United Kingdom.

[7] Barajas, R., Ramírez, F., Juárez, R., Ayala, V., Robleto, E., Yasbin, R., Pedraza, M. (2014), Error-Prone Pocessing of Apurinic/Apirymidinic (AP) Sites by PolX Underlies a Novel Mechanism That Promotes Adaptative Mutagenesis in Bacillus subtilis., J. Bacteriol. 196: 3012.

[8] Vidales, LE., Cárdenas LlC. Robleto, E., Yasbin, RE., and M. Pedraza-Reyes. (2009). Defects in the Error Prevention Oxidized Guanine System Potentiate Stationary-Phase Mutagenesis in *Bacillus subtilis.* J. Bacteriol. 191: 506-513.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

ESTABLISHMENT OF CELL SUSPENSIONS OF *Turbinicarpus laui* (CACTACEAE) AND QUANTIFICATION OF ANTIOXIDANT COMPOUNDS CONTENT

(Establecimiento de suspensiones celulares de *Turbinicarpus laui* (cactácea) y cuantificación del contenido de compuestos antioxidantes)

Antonio Reyes-Martínez[a*], María del Socorro Santos-Díaz[a+], María del Carmen González-Castillo[a]

[a] Centro de Investigación y Estudios de Posgrado, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luís Potosí.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: ssantos@uaslp.mx

Área del Conocimiento: Biología y Química del Estrés Oxidativo.

ABSTRACT
Antioxidants are beneficial to health and prevent cancer, cardiovascular and chronic degenerative diseases. The phenolics acids, flavonoids and betalains are among the most studied antioxidants. An alternative to obtain these compounds under controlled conditions is the *in vitro* tissue culture. In previous studies in our laboratory, calli from the cactaceae *Turbinicarpus laui* were obtained. The callus produce phenolics acids, and flavonoids, but betalains content was low. As the *T. laui* extracts presented vasorelaxant activity, we are interested in to increase the levels of metabolites. Therefore, the aim of this study was to establish fast growing cell suspensions to improve the concentration of antioxidant compounds. To establish the cell suspensions, 1 g of friable callus was transferred to 150 ml flasks containing 50 ml of MS medium supplemented with 1 mg/L 2,4-D. The increase in fresh weight was recorded each 3 days during 18 days. The cultures show a lag phase in the first three days, then an exponential growth was observed until day 12, and the stationary phase presented after 15 days. A hydroalcoholic extraction was performed and the content of total phenolic acids, flavonoids, and betalains was quantified. The accumulation of the metabolites was observed at the beginning of growth curve and decrease after 9 days of culture. The content of phenolics, flavonoids and betalains in the cell suspensions was 4, 11 and 8 times higher respectively, compared to callus. Then, the cellular suspensions from *T. laui* were a better system to increase the level of metabolites compared to callus.

Keywords: Phenols, Flavonoids, Betalains, callus, cell suspension.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

EXPLORATORY STUDY OF THE FREQUENCY OF MICRONUCLEI AND OTHER NUCLEAR ABNORMALITIES IN BUCCAL MUCOSA OF RELATIVES AND PATIENTS WITH MARFAN SYNDROME

(Estudio exploratorio de la frecuencia de micronúcleos y otras anormalidades nucleares en mucosa bucal de familiares y pacientes con Síndrome de Marfan)

Leonardo Daniel Molina Noyola[a]*, Olivia Torres Bugarín[b+], Penélope Valdez Aburto[a], Livier Nataly Medrano Sánchez[a], María Guadalupe Zavala Cerna[b].

[a]Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Guadalajara
[b]School of Medicine, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Guadalajara

*Autor que presentó el trabajo.
+ Autor para correspondencia: oliviatorres@hotmail.com

Área del Conocimiento: Biología y Química del estrés oxidativo

ABSTRACT
Marfan syndrome (MS) is an autosomal dominant disorder with multi-systemic manifestations because it affects the connective tissue including different biochemical alterations that increase oxidative stress, this is able to induce fracture of genetic material, however, there is no information on its possible genotoxic effect. The objective of this study was to evaluate the frequency of micronuclei and nuclear abnormalities in cells of the oral mucosa in patients diagnosed with MS. This project was performed with 26 samples, that were taken oral mucosa, 4 were from patients with MS, 9 families and 13 unrelated individuals with no history of MS (controls). All signed consent and answered a survey on health, substance abuse, among others. Each sample was collected by gently scraping oral mucosa, smears were made, fixed (80% ethanol / 48 hours) were stained (acridine orange). Microscope (100x) 2000 cells were counted, micronucleated (CMN), pyknosis (PN), binucleation (BN) cells, lobed nucleus (NL), condensed chromatin (CC), karyolysis (CL) and karyorrhexis (CR) was recorded The Mann-Whitney U test was used. The results were; no drug addiction is identified, the average of mass index and age of patients was 16.01: 24, relatives 25.94: 47.5 and the unrelated 26.01:38.46. More frequently ($p < 0.05$) MN, BN and NL was identified in SM (2.0 ± 1.6; 19 ± 9.4; 22.2 ± 13.0) and relatives familiares (1.1 ±1.1; 8.33 ± 6.2; 7.6 ± 3.4); compared with controls (0.5 ± 0.6; 5.4 ± 5.3; 6.0 ± 3.5). In conclusion these results suggest that MS is a condition that induces genomic instability.

Keywords: Micronucleus, Marfan Syndrome, Oxidative Stress, Genotoxicity.

RESUMEN
El Síndrome de Marfan (SM) es un trastorno autosómico dominante con manifestaciones multisistémicas debido a que afecta al tejido conectivo incluyendo distintas alteraciones bioquímicas que incrementan el estrés oxidativo, éste último es capaz de inducir fractura del material genético, sin embargo no hay información sobre su posible efecto genotóxico en SM. El objetivo de este estudio fue evaluar la frecuencia de micronúcleos y anormalidades nucleares en células de mucosa oral de pacientes con diagnóstico de MS. En este proyecto se tomaron 26 muestras de mucosa bucal, 4 fueron de pacientes con SM, 9 de familiares y 13 de personas no relacionadas y sin antecedentes de SM

(controles). Todos firmaron consentimiento y contestaron una encuesta para conocer estado de salud, toxicomanías, entre otros. Cada muestra se tomó mediante un raspado suave de mucosa oral, se realizaron los frotis, se fijaron (etanol 80%/48 horas) y se tiñeron (anaranjado de acridina). Al microscopio (100x) se contabilizaron 2000 células, se registró las Células Micronúcleadas (MN), Picnosis (PN), Binucleación (BN), Núcleo lobulado (NL), Cromatina condensada (CC), Cariolísis (CL) y Cariorrexis (CR), se utilizó la prueba U de Mann-Whitney. En los resultados no se identificaron toxicomanías y el promedio de IMC y edad en los pacientes fue 16.01:24, en familiares 25.94:47.5 y en los no relacionados 26.01:38.46. Se identificó mayor frecuencia ($p<0.05$) de MN, BN y NL en SM (2.0 ± 1.6; 19 ± 9.4; 22.2 ± 13.0) y familiares (1.1 ±1.1; 8.33 ± 6.2; 7.6 ± 3.4); controles (0.5 ± 0.6; 5.4 ± 5.3; 6.0 ± 3.5). En conclusión estos resultados sugieren que el SM es un padecimiento que induce inestabilidad genómica.

Palabras Clave: Micronúcleos, Síndrome de Marfan, Estrés Oxidativo, Genotoxicidad.

INTRODUCCIÓN

En 1786 el Doctor Antoine Marfan, describió un paciente de 5 años de edad con dedos y miembros largos y anormalidades esqueléticas, pero es hasta 1990 que se identificó el gen responsable el cual codifica para la fibrilina 1 (FBN1), es un gen dominante que se localiza en el brazo largo del cromosoma 15 (15q21). Por tanto Síndrome de Marfan es una enfermedad que afecta las fibras elásticas del tejido conectivo, este se encuentra por todo el cuerpo y sirve como elemento de unión de todas las células, dando forma a los órganos, músculos, huesos, vasos sanguíneos y ligamentos [1, 2, 3]. Tienen como función la distensión y retracción, forman parte de la matriz extracelular de los tejidos y está compuestas por elastina y una red de microfibrillas que sirven de armazón para el depósito de elastina y el ensamblaje de las fibras elásticas [4, 5, 6]. Más de 90% de los individuos son clasificados como con Síndrome de Marfan a partir de la clínica con los "Criterios de Ghent" [4, 7].La incidencia del Síndrome de Marfan se encuentra entre las más altas de los trastornos hereditarios: alrededor de 1 por cada 3 000 a 5 000 nacimientos en la mayor parte de los grupos raciales y étnicos. Los síndromes relacionados son menos comunes. Las mutaciones por lo general se heredan bajo un esquema dominante autosómico, pero cerca de una cuarta parte de los pacientes presenta mutaciones esporádicas nuevas. Por lo que los mexicanos no están exentos de presentar este padecimiento [7,8].

La hipótesis es que la frecuencia de células micronucleadas y anormalidades nucleares en mucosa bucal de pacientes con diagnóstico de SM y/o familiares de pacientes con diagnóstico de SM es mayor que en personas sanas sin antecedentes familiares de SM.

El objetivo fue cuantificar el número de células micronucleadas de mucosa bucal de pacientes portadores de SM y comparar el anterior con número de células micronucleadas en pacientes portadores de SM y personas sin enfermedades genéticas y físicas esto mediante la prueba de aplicación de micronúcleos.

El estrés oxidativo tiene origen a partir del desbalance entre los radicales libres y especies reactivas de oxígeno generados en los procesos metabólicos del organismo y la capacidad de los sistemas antioxidantes [9]. Se cuenta con la idea general de que con la edad se disminuyen los niveles tisulares de antioxidantes y el subsecuente incremento y acumulo del estrés oxidativo lo que favorece la progresión y acumulación de daño incidiendo así en la aparición, o aceleración de enfermedades, ya que desde el punto de vista molecular, los radicales libres actúan como potentes agentes oxidantes y son causa de

envejecimiento al combinarse con moléculas esenciales, como el ADN y proteínas, a las cuales desactivan [10]. Paralelamente los efectos del envejecimiento son una combinación de procesos genéticamente programados y alteraciones genéticas inducidas por factores endógenos y exógenos, que tienen lugar a nivel celular [11, 12].

Por otra parte, los métodos tradicionales para evaluar inestabilidad genómica y envejecimiento son a menudo costosos, complicados y no siempre están al alcance de todos os laboratorios, ante este panorama la prueba de micronúcleos se presenta como una alternativa factible ya que los MN se originan por exposición a estrés oxidativo, agentes que dañan los cromosomas, también por defectos en la mitosis y/o reparación del ADN[13]. La prueba de MN se ha convertido en uno de los métodos citogenéticos preferidos para evaluar el daño en el ADN a nivel cromosómico y se ha utilizado como un importante biomarcador del envejecimiento e inestabilidad genómica[14, 15]. Esta técnica permite medir tanto rompimientos cromosómicos como pérdidas cromosómicas [16] este analiza diferencias de metafases, representa un método alternativo de evaluación a corto plazo y más sencillo [17].

Se ha asociado en los pacientes con Marfan la vaso disfunción en la aorta torácica con la acumulación del estrés oxidativo el cual es debido al desbalance de la expresión de proteínas superoxido y su eliminación [18], además presentan acumulación oxidativa en fibroblastos [19]y altos niveles de radicales libres en plasma incluso, si bien no es claro, con asociación con la severidad del padecimiento [20]. La inflamación, la inestabilidad genómica y el estrés oxidativo son mediadores patogénicos de muchas enfermedades, en el Síndrome de Marfan la información sobre el estrés oxidativo y la inflamación es escasa por lo que se pretende detectarla con la prueba de micronúcleos para estudiar posteriormente una diana terapéutica diferente en este padecimiento. El estrés oxidativo causa el mismo efecto que es el envejecimiento citogenético este último se refiere a la desregulación de la apoptosis, incorrecta capacidad de reparación del ADN en general se considera que los efectos del envejecimiento son una combinación de procesos genéticamente programados y alteraciones genéticas inducidas por factores endógenos y exógenos, que tienen lugar a nivel celular. Estos procesos generan una inestabilidad genética, la cual podría ser una de las principales causas para la senescencia celular y también podría estar asociada con el cáncer, enfermedades del sistema inmune [12, 21], enfermedades cardiovasculares tales como como congestión cardiaca, arritmias, enfermedad arterial coronaria, hipertrofia ventricular izquierda, dilatación aortica, disección aortica que son algunas de las principales manifestaciones clínicas en el SM [18, 22, 23] entre otras neurodegenerativas asociadas con la edad [21].

MÉTODOS

Es un estudio cuantitativo, prospectivo, transversal y comparativo, con método de muestreo consecutivo y por conveniencia, y se llevó a cabo en Guadalajara, Jal. México en febrero de 2015.

Se trabajó con pacientes con diagnóstico molecular de SM y familiares directos sin SM, ellos pertenecen a la “Asocian Mexicana de Síndrome Marfan, además un grupo control compuesto de personas no relacionadas aparentemente sanas sin antecedentes familiares de SM, con similitud en edad y sexo, todos ellos residentes de la ciudad de Guadalajara. Cada participante lleno un formulario con la siguiente información; edad, sexo, fecha de nacimiento, estado civil, domicilio, diagnostico, escolaridad, toxicomanías, ejercicio, estado de salud, consumo de medicamentos y según el caso cuándo se le diagnostico SM. Se tomó dos muestras de muestra de mucosa bucal posterior a un suave enjuague con agua potable, se realizó el frotis en un portaobjetos previamente codificado y limpio, una vez seco a

temperatura ambiente se fijó en etanol al 80%, luego se tiño con anaranjado acridina, se conservaron las muestras en una caja para mantenerlas libre de polvo y de la exposición a la luz, hasta el momento de su análisis.

Se analizaron 2000 células con microscopio con fluorescencia equipado con filtros 450- 490nm, 100x modelo Carl Zeiss IVFL Axiostar Plus bajo el objetivo de 100x; para poder ser observados los frotis se le puso una gota de buffer de fosfato sobre la muestra sobre este se colocó un cubreobjetos, quitando las burbujas y finalmente se le coloca una gota de aceite de inmersión. Del recuento de 2000 células se registraron células micronucleadas (MN), así como aquellas con alguna anormalidad nuclear (AN) como células binucleadas (BN), cromatinas condensadas (CC), núcleos lobulados (NL), cariorexis (CR) y cariolisis (CL), siguiendo los criterios de Tolbert[24, 25]. Ver figura 1 y 2.

Para el análisis estadístico se incluyó la media y desviación estándar para fines descriptivos y para fines de inferencia, mientras que para comparar las frecuencias de MN y AN entre ambos grupos se utilizó la prueba U de Mann-Whitney, se utilizó GraphPadPrism (5 versión), los resultados se expresan por cada 2000 células.

Aspectos éticos

La colecta de las muestras fue de personas voluntarias, a quienes se les informó de los objetivos del trabajo y procedimientos del mismo, además otorgaron consentimiento informado de acuerdo a lo establecido por la Ley General de Salud Mexicana. Fue aprobado en el cumplimiento de las Buenas Prácticas Clínicas y la legislación Mexicana vigente en materia de Investigación Clínica ante el Comité de Ética del Hospital Ángel Leaño.

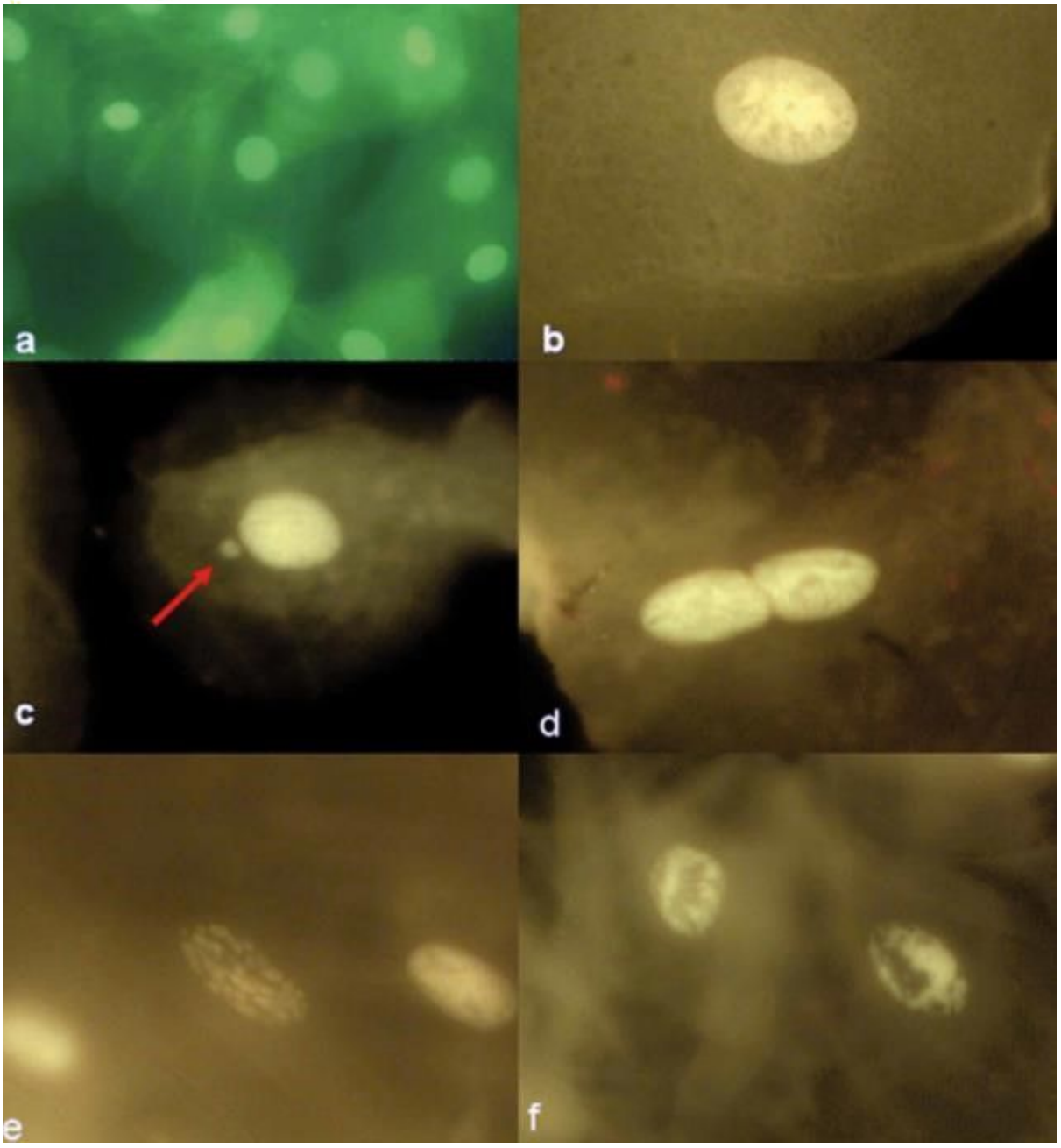


Figura 1. a. Células Normales, b núcleo normal, c. Célula micronúcleada (CMN); flecha micronúcleo (MN); d. Célula binucleada (BN), e. Cariorrexis (CR); f. Cromatina condensada (CC); Microscopio Binocular Mca. Carl Zeiss Mod Axiostar Plus.Fluorescencia IVFL Filtro de 450 a 490 Nanómetros, Objetivo Planacromático 100x/1.25 oil, cámara AxiocamIcc 1, Imágenes capturadas a 400 y a 1000 aumentos reales. Figura tomada de [26].

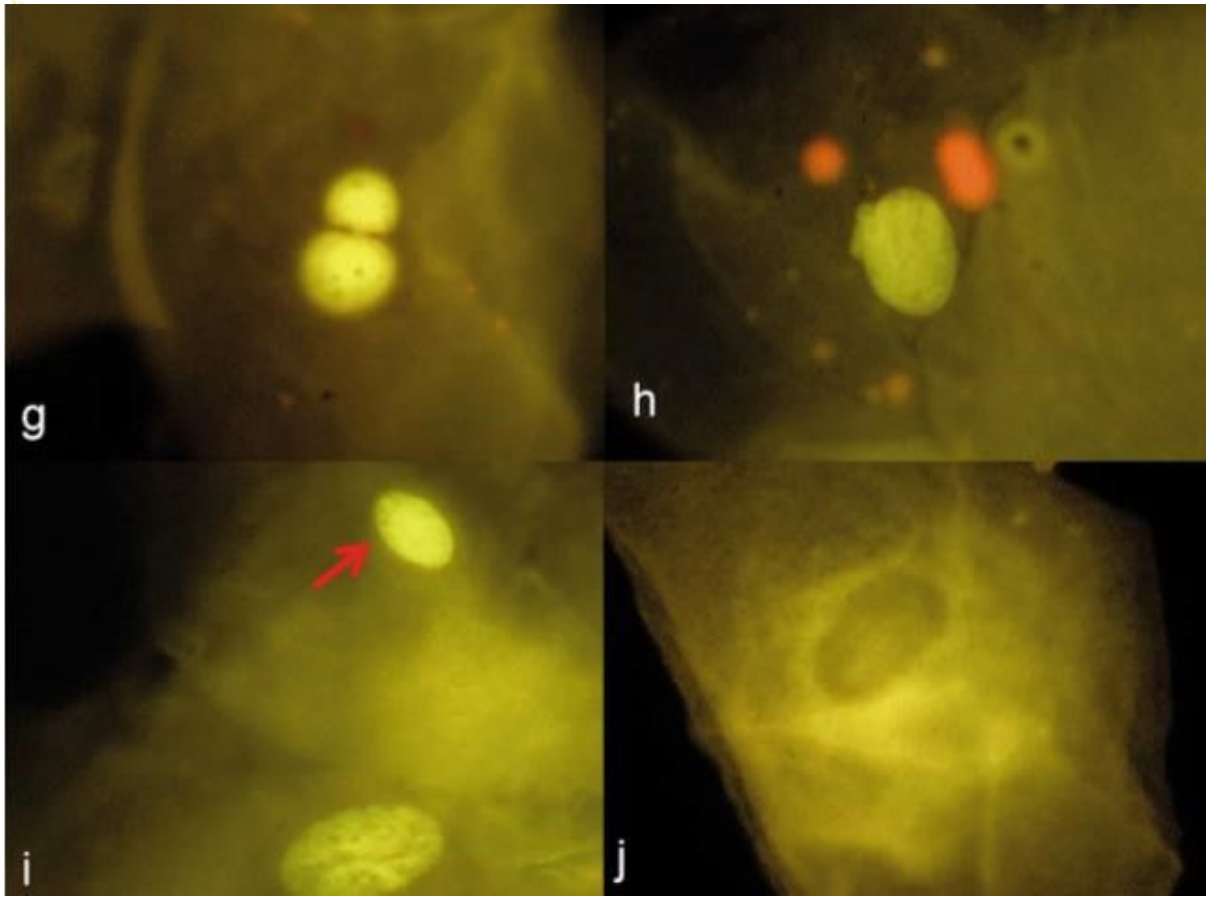


Figura 2. g-h. Núcleo lobulado típico (NL); Núcleo lobulado, i. Núcleo picnotico, flecha (PN); j. Cariolisis (CL). Microscopio Binocular Mca. Carl Zeiss Mod Axiostar Plus. Fluorescencia IVFL Filtro de 450 a 490 Nanómetros, Objetivo Planacromático 100x/1.25 oil, cámara AxiocamIcc 1, Imágenes capturadas a 1000 aumentos reales. Figura tomada de [26].

RESULTADOS

Se colectaron 4 muestras de pacientes con dx confirmado molecularmente como SM, 9 de familiares directos de estos pacientes y 13 de personas no relacionadas aparentemente sanas sin antecedentes de SM que fungieron como control. Al analizar los datos se observó que el grupo de familiares directos no afectados con SM y el grupo control son similares estadísticamente en cuanto a la frecuencia de MN y el resto de la AN (p=0.5).

Al comparar la frecuencia de MN y AN entre el grupos de pacientes con SM y el grupo control se observó que ambos grupos son similares en cuanto a la edad (p=0.5), también se detectó que en la frecuencia de MN y Cl no hay diferencia estadística, sin embargo en la frecuencia del resto de anormalidades la frecuencia es mayor que en el grupo control, ver tabla 1.

Tabla 1. Frecuencia de micronúcleos y anormalidades nucleares en Síndrome de Marfan

Grupo	Edad	MN	BN	NL	PN	CC	CR	CL
Pacientes con SM	25.2 ± 5.7	2 ± 1.6	19 9.4	± 22.2 ± 13.0	5.25 ± 2.7	15.5 ± 1.7	17 ± 16.3	9.5 ± 7.4
P	NS	NS	0.01*	0.009*	0.004*	0.03*	0.01*	NS
Controles	25.5 ± 5.7	0.5 ± 0.6	5.4 ± 5.3	6.0 ± 3.5	0.3 ± 0.6	9.0 ± 5.6	2.6 ± 2.2	2.2 ± 1.64

Sin significancia estadística (NS), células micronucleadas (MN), células binucleadas (BN), cromatinas condensadas (CC), núcleos lobulados (NL), cariorexis (CR) y cariolisis (CL). *Significancia estadística mediante la prueba de U de Mann-Whitney.

DISCUSIÓN

Este estudio muestra que si bien las personas con SM no muestran significancias estadísticas comparadas con controles en cuanto a la frecuencia de MN ni CL, si al daño al ADN y a nivel celular manifestado por la presencia de altas frecuencias de otras AN como una alta frecuencia en BN se involucran en la interferencia con los hechos ocurridos a finales de la división celular [27, 28, 29], además se observa que los pacientes tienen un aumento frecuencia de CC, CR y NL, las primeras tienen núcleos con regiones condensadas heterogéneas, así cuando la condensación es extensa da la apariencia de un núcleo fragmentado (desintegración total de la cromatina) se cree que en etapas tempranas de la apoptosis [28, 29]. Las CR las que presentan un núcleo que se caracteriza por agregación de la cromatina nuclear. Con respecto a las células de cromatina condensada, ellas tienen un patrón moteado nuclear indicativo de la fragmentación nuclear conducente a la eventual desintegración del núcleo. Estas células tal vez están pasando por una fase avanzada de apoptosis pero esto aún no ha sido comprobado [28, 29] por último el NL son sugestivos de un proceso de eliminación de material nuclear por gemación [27] pueden ser indicadores de genotoxicidad y tal vez en procesos degenerativos en la primera capa de células epiteliales (estrato germinativo) [28, 29].

El SM es un padecimiento que afecta al tejido conectivo, se encontraron evidencias de que hay mayor estrés oxidativo, por esta razón surge la hipótesis de que estos pacientes tendrán inestabilidad genómica, sin embargo no se cuentan con evidencias científicas que soporten esta hipótesis, por esto que este trabajo cobra relevancia, que si bien son pocos pacientes a los que se tuvo acceso debido a la condición de contar con un diagnóstico molecular, si aporta evidencias de que las personas con SM sufren de pérdida del material genético y toxicidad celular. Por todo esto que se concluye que los pacientes con SM se encuentra en alto riesgo de daño citotóxico y genotóxico.

Las personas que padecen SM son un grupo vulnerable pero minoritario y tanto los estudios como la información sobre toxicidad en tipo de población es escasa además del mismo modo la baja prevalencia SM dificulta la obtención una muestra más amplia y es limitada la cantidad pacientes. Aun cuando en los últimos años el mayor conocimiento de la enfermedad, los avances en los métodos diagnósticos así como en el tratamiento quirúrgico de las afectaciones vasculares, han mejorado en el abordaje de los pacientes con SM[30], continúan asociados a una alta mortalidad[32] y el tratamiento sigue es sintomático [1, 30]. Se recomienda abordar al paciente con SM de manera integral, no solo con un tratamiento sintomático sino también basado en la prevención, ya sea con una terapia y/o dieta rica en

antioxidantes. Tal vez no como una cura pero este nuevo abordaje podría retrasar ciertos síntomas. Este trabajo abre las puertas a estudios sobre nuevas dianas terapéuticas y manejo integral para buscar una mejor calidad y expectativa de vida[32].

AGRADECIMIENTOS

A la Asocian Mexicana de Síndrome Marfan y a sus miembros que generosamente colaboraron con esta investigación, a la Dra. María Guadalupe Zavala Cerna, por su orientación en la aplicación de las pruebas estadísticas, al Lic. Ricardo del Castillo Ruana, director de ejecutivo Facultad de Medicina de la UAG, por su apoyo académico, a la Universidad Autónoma de Guadalajara, por su apoyo financiero en la presentación del proyecto y en especial a la Dra. Olivia Torres Bugarín, por su apoyo durante toda la ejecución de este proyecto.

REFERENCIAS

[1] Satoh K, Nigro P, Tetsuya TR. O'Dell M, Cui Z, Shi X, et al. CyclophilinAenhances vascular oxidative stress and development of angiotensin II-induced aorticaneurysms. Nat Med 2009; 15(6): 649–656.

[2] Soto ME, Castro-Soriana E, Lans-Guarner V, Muruato-Ontiveros E, Hernández-Mejía BI, Martínez-Hernandez HJ, et al. Analysis of Oxidative Stress Enzymes and Structural and Functional Proteinson Human Aortic Tissue from Different Aortopathies. Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2014; 2014: 1-13.

[3] Shioma Y, Sasaki T, Shibasaki Y. Histological and inmunohistochemical study of endothelin-1 localization in periodontal ligament during experimental tooth movement. Dent Jap 1995; 32:75-78.

[4] Vasquez-Torres G, Gutiérrez-Sotelo O. Síndrome de Marfán / Marfans syndrome. Costarric Cardiol 2005; 7(3): 31-34.

[5] Barriales-Villa R, García-Giustiniani D, Monserrat L. Genética del síndrome de Marfan. Cardiocore 2011; 46: 101-104.

[6] Jorde L, Carey J, Bamshad M, White R. Genética del Desarrollo. En: Genética Médica. 2 Ed. Madrid: Harcourt; 2000. 204-220

[7] Prockop DJ, Bateman JF. Trastornos hereditarios del tejido conjuntivo. En: Dan L. Longo, et al. Harrison Medicina. 18 Ed. New York, NY: McGraw-Hill; 2012. 3204-3222.

[8] Syyong HT, Chung AWY, Yang HHC, Breemen C. Dysfunction of endothelial and smoothmusclecells in smallarteries of a mouse model of Marfan syndrome. British Journal of Pharmacology 2009; 158: 1597–1608.

[9] Fenech M. The genome health clinic and genome health nutrigenomics concepts: diagnosis and nutrition altreatment of genome and epigenome damage on an individual basis. Mutagenesis 2005; 20(4): 255-269.

[10] Zorrilla-García AE. El envejecimiento y el estrés oxidativo. Rev Cubana Invest Biomed 2002; 21(3): 178-85.

[11] Semsei I. On the nature of aging. Mech Ageing Dev 2000; 117(1-3): 93-108.

[12] Bolognesi C, Lando C, Forni A, Landini E, Scarpato R, Migliore L, et al. Chromosomaldamage and ageing: effect micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes. Age Ageing 1999; 28: 393–397.

[13] Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmueller S, et al. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. Mutat Res 2008; 659: 93-108.

[14] Fenech M. The genome health clinic and genome health nutrigenomics concepts: diagnosis and nutrition al treatment of genome and epigenome damage on an individual basis. Mutagenesis 2005; 20(4): 255-269.

[15] Fenech M, Holland N, Zeiger E, Chang WP, Burgaz S, Thomas P, Et al. The HUMN and HUMNxL International collaboration project son human micronucleus assays in lymphocytes and buccal cells–past, present and future. Mutagenesis 2011; 26(1): 239-45.

[16] Fenech M. The in vitro micronucleus technique. Mutat Res 2000; 455(1-2): 81-95.

[17] Fenech, M. Folate, DNA damage and the aging brain. Mechanisms of Ageing and Development 2010; 131: 236-241.

[18] Vincent HK, Innes KE, Vincent KR. Vasomotor dysfunction in the thoracic aorta of Marfan syndrome is associated with accumulation of oxidative stress. Diabetes Obes Metab 2007; 9(6): 813-39.

[19] Monici M, Basile V, Romano G, et al. Fibroblast autofluorescence in connective tissue disorders: a future tool for clinical and differential diagnosis. J Biomed Opt 2008; 13: 54-25.

[20] Fiorillo C, Becatti M, Attanasio M, Lucarini L, Nassi N, Evangelisti L, et al. Evidence for oxidative stress in plasma of patients with Marfan syndrome. Int J Cardiol 2010; 145(3): 544-546.

[21] Vincent HK, Innes KE, Vincent KR. Oxidative Stress and Potential Interventions to Reduce Oxidative Stress in Overweight and Obesity. Diabetes Obes Metab 2007; 9(6): 813-39

[22] Concha M, Legarra JJ, Casares J, Franco M, Mesa D, Chacón A, et al. Sustitución valvular aórtica con autoinjerto pulmonar (operación de Ross) en pacientes adultos y pediátricos Manuel. Rev Esp Cardiol 2000; 53(1): 28-38.

[23] Satoh K, Nigro P, Berk CB. Oxidative Stress and Vascular Smooth Muscle Cell Growth: A Mechanistic Linkage by Cyclophilin A. Antioxidants & Redox Signaling 2010; 12(5): 675-682.

[24] 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.

[25] Thomas P, Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, et al. Buccal micronucleus cytome assay. Nature protocols 2009; 4(6): 825-837.

[26] 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.

[27] Shi Q, King RW. Chromosomenondisjunctionyieldstetraploidratherthananeuploidcells in human celllines. Nature 2005; 437 (7061): 1038-1042.

[28] Tolbert PE, Shy CM, Allen JW. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: a field test in snuff users. Am J Epidemiol 1991; 134(8): 840-50.

[29] Tolbert PE, Shy CM, Allen JW. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. Mutat Res 1992; 271(1): 69-77.

[30] Cabrera-Bueno F, Recio-Mayoral A, Romero-Rodríguez N, Muñoz-García AJ, Jiménez-Navarro M. Síndrome de Marfan. Novedades en su diagnóstico y manejo. Cardio core 2011; 46(3): 83-84.

[31] Jaime-Bernal V, Fernando-Suárez O. La carga de la enfermedad genética en Colombia, 1996-2025.UnivMéd Bogotá (Colombia) 2008; 49(1): 12-28.

[32] Velázquez-Wong AC. Manifestaciones del envejecimiento a nivel citogenético [Monografía en Internet]. Mexico: Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social; 2012 [acceso 30 de septiembre de 2015]. Disponible en:

http://www.inger.gob.mx/bibliotecageriatria/acervo/pdf/moleculares_04.pdf.

OVEREXPRESSION OF ALDEHYDE AND KETONE REDUCTASES IN THE LIVER CARCINOGENESIS: NEW INSIGHTS INTO LIVER TRANSCRIPTOME

(Sobreexpresión de aldehído/cetona reductasas en la carcinogénesis del hígado: Nuevos conocimientos sobre el transcriptoma hepático)

Julia Esperanza Torres-Mena[a], Noemí Salazar Villegas[a], Ricardo Sánchez Rodríguez[a], Jose Luis Cruz Colin[a] Belem Gabiño Lopez[a], Julio Isael Pérez-Carreón[a*+]

[a] Laboratorio de Bioquímica y Estructura de Proteínas. Instituto Nacional De Medicina Genómica, México (INMEGEN).

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: jiperez@inmegen.gob.mx

Área del Conocimiento: Biología y Química del Estrés Oxidativo.

ABSTRACT
Hepatocarcinomas emerge from dysplastic nodules, however the molecular characteristics that enable the pre-tumor nodules to progress into tumor are unknown. The objective was to characterize the transcriptome of pre-tumor nodules and experimental cancer and its relationship with human hepatocarcinoma. Hepatocarcinogenesis was induced by chemical carcinogens such as diethylnitrosamine in rats. Nodules and tumors were identified in liver by histochemistry of gamma-glutamyl transferase (GGT); lesions were excised by laser capture microdissection and processed for global gene expression analysis using microarrays (Rat Gene ST 1.0, Affymetrix). Tumors of 9 (T9) and 17 (T17) months post-induction, two types of nodules at 4 months; persistent (P) and remodeling (R) and normal liver were studied. Gene expression changes were validated by RT-qPCR. Protein expression was determined by Western blot assay and immunohistochemistry, where nine clinical cases of liver cancer were included. Two types of nodules were identified at 4 months; R type nodules showed heterogeneous GGT activity, while P nodules presented larger diameter (> 1 mm) and uniform expression of GGT. When hierarchical clustering compared the global gene expression profile, the highest correlation between P and T9 or T17 was found. Those 335 genes, which contribute to that correlation, were associated with cell proliferation and Redox metabolism. Of these, 5 genes from the aldo-keto reductase (AKR) family showed elevated expression in nodules and tumors. This was confirmed by RT-qPCR. Expression of AKR proteins in tumors increased more than 5 times from the normal liver. Expression of these proteins was localized in the cytoplasm of neoplastic cells and in some of them (10%) showed nuclear localization. This same localization pattern was found in 8 hepatocarcinomas, while a case of cholangiocarcinoma was negative. Liver cancer progression is associated with increased expression of genes that contribute to metabolism redox and detoxification of xenobiotics.

Keywords: Biochemistry of liver cancer; Transcriptomics; Alkenal / Ona oxidoreductase; Pre-hepatic neoplasia; Cancer biomarkers.

IDENTIFICATION OF ISOLATED BACTERIA FROM ALCOHOLIC FERMENTED AGAVE WORT ABLE TO MODIFY ORGANOLEPTIC FEATURES OF TEQUILA

(Identificación de bacterias aisladas de mosto alcohólico fermentado de agave capaces de modificar las propiedades organolépticas del tequila)

Rosa Isela López Orozco[a]*, Mirna Estarrón Espinosa[b], Julia del Carmen Martínez Rodríguez[a], Juan Villafaña Rojas [a +]

[a] Departamento de Química, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Guadalajara
[b] Unidad de Tecnología Alimentaria, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: juvillafana@gmail.com

Área del Conocimiento: Fermentaciones

ABSTRACT
Tequila is an important alcoholic beverage produced from the juice of *Agave tequilana* Weber. It is differentiated from others liquors due to its organoleptic characteristics, which depend on volatile compounds produced, principally, during fermentation stage. A set of isolated bacteria has been demonstrated capacity to grow into alcoholic wort of agave juice, in the present work are presented the results of genetic identification and fermentation capacity as a first approach for the use of these bacteria to modify organoleptic features of tequila. Bacteria were inoculated in a sterilized alcoholic fermented wort of agave juice to perform a second fermentation at 30 C. Bacteria were assayed in an axenic culture. A protocol to DNA characterization of 16S subunit was used to identify each selected strain together Gram stain and catalase assay. Results demonstrated that 8 of 18 bacterial isolated strains were able to perform a second fermentation. This proves that these bacteria will grow on an alcoholic wort used into tequila industry and generated a wort with desirable organoleptic characteristics such as reported to wine industry. Identification assays indicate that the useful bacteria are bacilli Gram positive, negative catalase and belong to lactic bacteria. Two important strains were identified as *Lactobacillus paracasei*, which confirm the behavior observed into the different assays. The obtained results open the possibility to use isolated lactic bacteria to design a tequila process to develop an alcoholic beverage with a particular profile of organoleptic characteristics and establish its economical feasibility.

Keywords: Lactic bacteria, tequila, malolactic fermentation, *Lactobacillus paracasei*.

RESUMEN
El tequila es una importante bebida alcohólica producida con el jugo de *Agave tequilana* Weber, se distingue de otras bebidas por sus características organolépticas, las cuales dependen de los compuestos volátiles producidos, principalmente, durante la etapa de fermentación. De un conjunto de bacterias aisladas previemente, se seleccionaron aquellas cepas capaces de crecer en mosto alcohólico tequilero, presentándose en el presente trabajo la identificación genética y la capacidad fermentativa de

aquellas cepas que modifican las características organolépticas del tequila en una fermentación del mosto muerto. Las bacterias fueron inoculadas en el mosto muerto, para llevar a cabo la segunda fermentación a 30 C. Las bacterias se ensayaron como cultivos axénicos. Un protocolo para la caracterización de ADN de la subunidad 16S fue utilizado para la identificación de cada cepa, junto con la tinción de Gram y la prueba de catalasa. Los resultados muestran que 8 de las 18 bacterias aisladas tuvieron la capacidad de efectuar la segunda fermentación. Estos resultados indican que las bacterias aisladas son capaces de modificar el mosto fermentado generado en la industria tequilera y de generar un tequila con características organolépticas deseables, tal como sucede en la posfermentación en la industria del vino. Las bacterias identificadas son bacilos Gram positivos, catalasa negativos que pertenecen a las bacterias lácticas, dos cepas importantes se identificaron como *Lactobacillus paracasei*. Los resultados obtenidos abren la posibilidad de usar las bacterias lácticas aisladas para diseñar un proceso para elaborar tequila con características organolépticas particulares y establecer su factibilidad económica.

Palabras Clave: Bacterias lácticas, tequila, fermentación maloláctica, *Lactobacillus paracasei*

INTRODUCCIÓN

Uno de los aguardientes más famosos en México y a nivel mundial es el tequila, cuyo consumo se ha incrementado en los últimos años [1]. Durante el 2013 se reportó una producción de 226.5 millones de litros de tequila al 40% de alcohol volumen [2]. El éxito del tequila radica en gran parte en su sabor, el cual depende de la presencia de compuestos minoritarios como ésteres, aldehídos, ácidos orgánicos, entre otros. El tequila es una mezcla que tiene como principales compuestos etanol y agua, además de varios compuestos volátiles que le proporcionan diferentes características de aroma y sabor [3]. Gran parte de estos compuestos volátiles se generan durante el proceso de fermentación, debido a la acción de microorganismos como levaduras y bacterias [4]. El principal arquitecto en este proceso son las levaduras. Durante la fermentación del jugo de agave, las condiciones ambientales y nutricionales cambian debido a la formación de etanol y la desaparición de carbohidratos, hasta que se vuelve desfavorable para el desarrollo de la levadura y, finalmente, la actividad de la levadura cesa, lo que indica la final de la etapa de fermentación alcohólica. Sin embargo, algunas bacterias, como las cepas lácticas, son capaces de desarrollar una segunda fermentación utilizando compuestos contenidos en el mosto fermentado del agave [5]. En este trabajo se presentan los estudios relacionados con la capacidad post-fermentativa de bacterias nativas como criterios de selección de cepas, que se utilizarán para diseñar un segundo proceso de fermentación en la producción de tequila.

METODOLOGÍA

1. Aislamiento de bacterias del mosto fermentado

Para el aislamiento de bacterias se tomaron diversas muestras de mosto fermentado proporcionado por la Destiladora González-González. El mosto se entregó en una botella, la cual se marcó en tres partes para dividirla (FIGURA 1). Al día siguiente se tomaron muestreos de 2 mL con diferentes jeringas estériles en cada una de las partes de la botella con mosto (superficie, media y fondo), cada muestra se sembró en una caja petri con medio MRS por sextuplicado, esparciendo la muestra con un asa previamente esterilizada. Al terminar se incubó por 5 días a una temperatura de 30 C.

2. Pruebas de tolerancia a etanol

Se prepararon tubos con 10 mL de medio liquido MRS cada uno, y se inocularon las cepas. A cada bacteria se le agregó una concentración de etanol al 5% y 10% dejando un tubo sin etanol como medio de control de crecimiento. Después se incubó por un periodo de 7 días a 30 C.

3. Capacidad de crecimiento con ácido málico como fuente de carbono.

Se prepararon tubos con 10 mL de caldo MRS, cambiando la fuente principal de carbono por ácido málico, con una concentración de 20 g/L. Se inocularon las bacterias en cada tubo y se incubaron durante 7 días a 30 C.

4. Capacidad de crecimiento con ácido málico como fuente principal de carbono y etanol.

Se prepararon tubos con 10 mL de caldo MRS, cambiando la fuente principal de carbono por ácido málico a una concentración de 20 g/L. Se inocularon las bacterias, agregando una concentración de 5% y 10% de etanol a cada una, dejando un tubo libre de etanol como control. Se incubaron por 7 días a 30 C, tomando lectura de la turbidez en el espectrofotómetro a 600 nm cada tercer día.

5. Capacidad de crecimiento en mosto fermentado de agave

Preparación del papel filtro y celita. Se recortó papel filtro de manera circular con un diámetro de 9 cm, para colocarse en el kitasato. Se utilizaron 50 g de celita, las cuales se suspendieron primero en 500 mL de agua. El papel filtró se colocó en Buchner, después se vació la suspensión de celita para formar una capa de aproximadamente 2 cm de celita sobre el papel filtro.

Filtración del mosto en matraz kitasato. El embudo se colocó en el matraz kitasato ya conectado a la bomba de vació, y se vaciaron 200 mL de mosto fermentado. Este proceso se repitió tres veces.

Filtración con el uso de membranas. El mosto filtrado nuevamente se filtró una membrana de 0.22 µm, repitiéndose 3 veces el proceso.

Inoculación y lectura. Se utilizaron tubos con 10 mL de mosto filtrado, se inocularon las bacterias en cada uno de ellos y se dejaron por 7 días a 30 C tomando medición en el espectrofotómetro a una lectura de 600 nm cada tercer día.

6. Caracterización de las bacterias

Morfología de las colonias Primero se hizo una resiembra de cada uno de los aislados de bacterias para obtener colonias separadas en cajas con agar MRS, por un periodo de 24 horas a 30 C. De esta se describieron las siguientes características: Color, Tamaño, Forma Y Consistencia

Tinción. Se utilizaron porta objetos marcándolos por la mitad, para colocar una gota de agua destilada y en ella esparcir con un asa, previamente esterilizada, una colonia. Se esperó a que secara para comenzar el proceso de tinción de Gram.

Prueba de catalasa. Con un gotero, se colocó una gota de agua en el porta objetos, se colocó una colonia aislada de cada bacteria. Se prosiguió a colocar una gota de peróxido de hidrogeno a cada una de ellas, tomándose nota del resultado.

Identificación de bacterias mediante prueba de ADN y secuenciación. La extracción de ADN, se llevó a cabo con el kit *Ultra Clean Microbial DNA Insolation Kit*. Después se prosiguió a la cuantificación del mismo por medio de *Nanodrop 2000 Thermo Scientific*, y se mandaron a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Aislamiento

El objetivo de buscar bacterias anaerobias se debe a que se desea hacer un proceso de post fermentación en el mosto del tequila, donde bacterias lácticas son capaces de transformar el ácido málico en ácido láctico [6], además de que este tipo de bacterias son ácido tolerantes pudiendo crecer algunas a valores de pH tan bajos como 3.2, otras a valores tan altos como 9.6, permitiéndoles sobrevivir naturalmente en medios donde las bacterias no aguantarían la actividad producida por los ácidos orgánicos [7]. El medio MRS se utilizó para aislar bacterias lácticas. Se obtuvo un total de 18 cepas bacterianas, tres obtenidas de la superficie del mosto (BS1-a, BS1-b y BS1-c), nueve en la parte media del contenedor del mosto ferementado (BS2-a, BS2-b y BS2-c, BM1-a, BM1-b y BM1-c, BM2-a, BM2-b y BM2-c) y seis del fondo (BF1-a, BF1-b y BF1-c, BF2-a, BF2-b y BF2-c).

2. Pruebas de tolerancia a la presencia de etanol.

En el medio MRS con etanol se tomó medición de la turbidez en cada uno de los tubos cada tercer día dando los siguientes resultados.

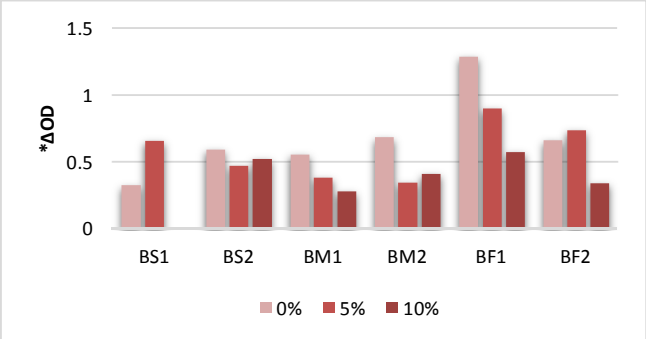


FIGURA 1. Diferencia de crecimiento en el espectrofotómetro: resistencia a etanol a 144 horas. *Diferencia general de densidad óptica

En esta prueba se establecieron dos concentraciones de etanol, la primera concentración fue de 5% v/v, mientras que en la segunda concentración fue de 10% v/v, esto nos asegura que las bacterias no se verán inhibidas por la presencia de etanol en los mostos de fermentación tequilera. La razón por la cual se planteó este procedimiento fue porque se sabe que es fundamental el desarrollo de bacterias en la fermentación maloláctica para transformar el ácido málico a ácido láctico [8].

3. Capacidad de crecimiento en presencia de ácido málico.

Las tres cepas denominadas BS1 fueron las únicas que no presentaron capacidad de crecimiento en ácido málico, por lo tanto se descartaron de las pruebas. Dos cepas BM1 (a y b) presentaron una actividad muy baja de crecimiento en glucosa debido a las condiciones anaerobias a las que estaban presentes, pero un alto crecimiento en ácido málico, esto nos puede indicar que se pueden tratar de bacterias facultativas [7].

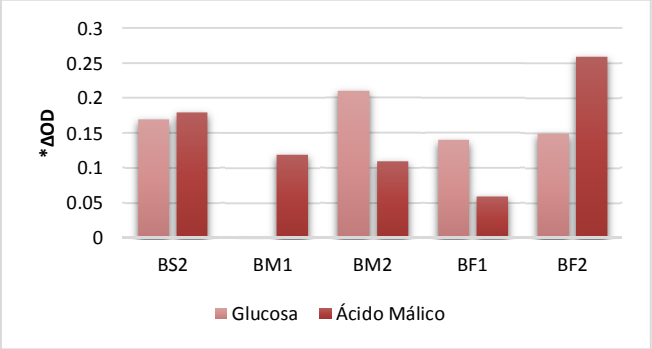


FIGURA 2. Diferencia de crecimiento con glucosa y ácido málico como fuente principal de carbono a un tiempo de 144 horas.
*Diferencia general de la densidad óptica

4. Capacidad de crecimiento en etanol y con ácido málico como fuente principal de carbono.
Para determinar la capacidad de crecimiento de las bacterias aisladas en etanol y ácido málico se midió la densidad óptica, como en los casos previos.

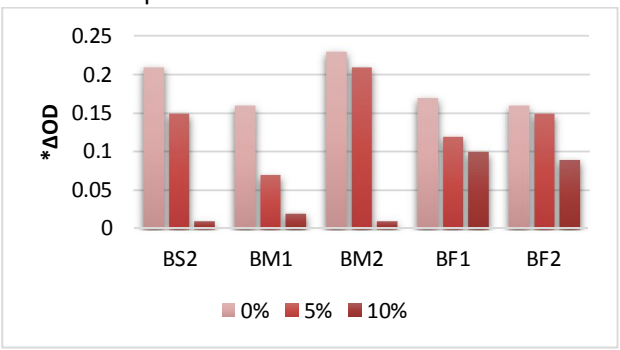


FIGURA 3. Diferencia de crecimiento en presencia de etanol y con ácido málico como fuente de carbono a 144 horas.
*Diferencia general de densidad óptica

La ventaja de inducción de la fermentación maloláctica por inoculación de sepas seleccionas de bacterias lácticas es el doble; en primer lugar porque mejora el control del tiempo y la velocidad de la conversión del ácido málico y, en segundo lugar porque ejerce una influencia positiva en el sabor y calidad de la bebida.

5. Capacidad de crecimiento en mosto de agave fermentado.
Para el desarrollo de las pruebas en mosto muerto de agave fue necesario eliminar completamente los microorganismos que pidieran estar presenten para garantizar que al detectarse crecimiento, éste era debido al desarrollo de las bacterias inoculadas. El procedimiento para detectar crecimiento bacteriano continuó siendo el mismo.

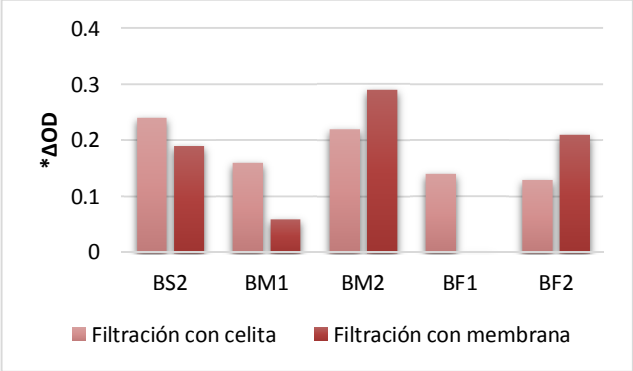


FIGURA 4. Diferencia de crecimiento en mosto de agave fermentado a un tiempo de 144 horas. *Diferencia general de densidad óptica

6. Caracterización de bacterias.

El trabajo experimental se inició aislando 18 bacterias, pero debido a las pruebas que se les aplicaron y los resultados obtenidos se seleccionaron sólo 8 como aquellas con mayor potencial de efectuar la pos-fermentación alcohólica, que son BS2-a, BS2-b, BM1-a, BM1-b, BM2-c, BF1-a, BF1-b y BF2-c.

Morfología, tinción y catalasa de las colonias. La identificación de las cepas se muestra a continuación (Tabla 1).

Tabla 1. Identificación de las cepas.

ID	Morfología	Gram	Catalasa	Bacteria identificada	Similitud
BM1-a	Bacilos	+	-	*Lactobacillus zeae strain RIA 482 16S ribosomal RNA gene, partial sequence*	99%
BF2-c	Bacilos	+	-	*Lactobacillus paracasei strain NBRC 15889 16S ribosomal RNA gene, partial sequence*	99%
BS2-a	Bacilos	+	-	*Lactobacillus rhamnosus strain NBRC 3425 16S ribosomal RNA gene, partial sequence*	99%
BS2-b	Bacilos	+	-	*Lactobacillus casei ATCC 334 strain ATCC 334 16S ribosomal RNA, complete sequence*	99%
BF1-a	Bacilos	+	-	*Lactobacillus camelliae strain MCH3-1 16S ribosomal RNA gene, complete sequence*	98%
BM2-c	Bacilos	+	-	*Lactobacillus paracasei subsp. tolerans strain NBRC 15906 16S ribosomal RNA gene, partial sequence*	99%
BM1-b	Bacilos	+	-	*Lactobacillus zeae strain RIA 482 16S ribosomal RNA gene, partial sequence*	99%
BF1-b	Bacilos	+	-	*Lactobacillus paracasei strain ATCC 25302 16S ribosomal RNA gene, partial sequence*	99%

CONCLUSIONES

Se encontraron tres cepas (BF1-a, BF1-b y BF2-c) que terminaron siendo capaces de crecer en los niveles superiores de etanol y ácido málico, demostrando su capacidad de realizar una fermentación maloláctica. Además de que una cuarta cepa (BM2-c) presentó el mayor aumento de la biomasa al crecer en mosto de agave fermentado y en una concentración del 5% de etanol, que es una concentración normal en la fermentación del tequila. Estos resultados obtenidos nos demostraron que

efectivamente fueron bacterias ácido lácticas las que terminaron siendo capaces de poder realizar una segunda fermentación, brindando así la oportunidad de producir el tequila de una manera similar al vino, dándole así otras características organolépticas. Con las cepas bacterianas aisladas se abre la posibilidad de desarrollar un proceso para la modificación vía fermentativa del mosto muerto para modificar compuestos aromáticos relacionados con las propiedades organolépticas del tequila. Para lo cual es necesario entre otros retos lograr la producción de la concentración apropiada de biomasa bacteriana y acordar los tiempos de la fermentación maloláctica.

REFERENCIAS

[1]Guzmán, P. (1997). Aguardientes de México: Tequila, Mezcal, Charanda, Bacanora, Sotol. "Bebidas Mexicanas", 4: 37-40

[2]Cámara Nacional de la Industria del Tequila. (2014). "Información Básica de la Industria Tequilera" Disponible en: http://www.tequileros.org/main.es.php#

[3]Estarrón, E. (1998). La calidad aromática de las bebidas alcohólicas: estudios realizados en el tequila. "Bebidas Mexicanas", 3: 23-25

[4]Cedeño Cruz, M., & Alvarez Jacobs, J. (2003). Production of Tequila from agave: historical influences and contemporary processes. "The alcohol Textbook" (Eds. Jacques, K., Lyons, T P., & Kelsall, D. R). Nottingham University Press, Great Britain: 3rd Edition.

[5]Aleixandre, J. L. (2002). Varietal differentiation of red wines in the Valencian region (Spain). "Agric Food Chem", 2: 751-755

[6]Arribas, M., & Polo, C. (2008). Occurrence of lactic acid bacteria and biogenic amines of biologically aged wines. "Food Microbiology", 25: 875-881

[7]Carr, F. C. (2002). The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. "Critical Reviews in Microbiology", 3: 281-370

[8]Reventós, M., & Aranzál, G., (2006). Fermentación Maloláctica", Madrid: Fundación para la cultura del vino.

SHORT CHAIN FATTY ACIDS IN THE GUT OF MICE AFTER A SUPPLEMENTATION OF DIETS WITH AGAVINS FROM *Agave angustifolia* HAW.

(Ácidos grasos de cadena corta en el colon de ratones alimentados con dietas suplementadas con agavinas de *Agave angustifolia* Haw)

Patricia Araceli Santiago- García [a*+], Mercedes G. López Pérez [b]

[a]Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Oaxaca, C.P. 71230, Hornos 1003, Oaxaca, México.
[b]Departamento de Biotecnología y Bioquímica, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN-Unidad Irapuato, C.P. 36821, Irapuato, Gto., México

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: psantiago@ipn.mx

Área del Conocimiento: Fermentaciones.

ABSTRACT
Agave fructans (agavins) has been identified as an effective prebiotic to promote active fermentation and Bifidobacteria and Lactobacilli proliferation in the gut and to enhance health benefits capable of improving parameters in the metabolic syndrome, such blood glucose levels, lipids metabolism (cholesterol and triglycerides), as well as, impact on body weight. The aim of this study was to compare, in a growing mice model, the effects on fermentations of diets containing 10% agavins. During the experimental period (6 weeks), STD mice group were fed with 5053 standard diet, whereas Raftilose (RSE) and agavins mice groups received a diet prepared by mixing 90 g of standard diet with 10 g or SDP-agavins from *A. angustifolia* (AASDP). Short-chain fatty acid (SCFA) concentrations were determined in cecal and colonic contents at the end of ingestion period. Total SCFA concentration increased in the gut with AASDP, but was not modified with the standart diet. As expected, acetic acid (166 mmol g^{-1}) was the most common acid generated in the cecum of the STD-fed mice, and the next most common was propionic acid (68–72 mmol.g^{-1}).While propionate concentration was highly increased, butyrate concentration was not increased significantly by AASDP in both the caecum and colon. The AASDP-fed mice showed a greater proportion of propionic acid (31%), whereas the mice that received the STD diet generated a higher proportion of acetic acid (65%). In the colon, the increase in propionic acid was significant for the AASDP-fed mice (73 mmol g^{-1} P = 0.001) and the proportion of propionic acid to other acids remained similar in the cecum (30%). In conclusion, these findings highlighted the potential from AASDP to improve glucose and lipid homeostasis through the production of SCFAs in the gut.

Keywords: *Agave angustifolia* Haw.; Short-chain fatty acids; Fructans.

PREBIOTIC EFFECT OF AGAVINS WITH DIFFERENT DEGREES OF POLYMERIZATION FROM *Agave angustifolia* HAW

(Efecto prebiótico de las agavinas de *Agave angustifolia* Haw. con diferente grado de polimerización)

Patricia A. Santiago García[a*+], Mercedes G. López[b]

[a] Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Oaxaca, C.P. 71230, Hornos 1003, Oaxaca, México.

[b] Departamento de Biotecnología y Bioquímica, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN-Unidad Irapuato, C.P. 36821, Irapuato, Gto., México

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: psantiago@ipn.mx

Área del Conocimiento: Fermentaciones.

ABSTRACT
Fructans of the inulin type possess mainly β(2-1) linkages that escape from the action of digestive enzymes; therefore they reach the large bowel unchanged where they serve as fermentative substrates. Based on the well-known health benefits of inulin, there is a great interest on agave fructans prebiotics properties The capacity of probiotics to ferment agavins from *Agave angustifolia* as the principal carbon source was studied. The growth of six Bifidobacteria species in Mann Rogosa and Sharpe medium containing 10 g of fructan/L of agavins (short-DP and long-DP and their mixtures) or commercial fructans as the sole carbon source was performed. The absorbance at 630 nm and pH were determined. The short chain fatty acids generated from their metabolic action were also analyzed by gas chromatography. Most probiotics grow more with short chain DP fructans from *A. angustifolia* than in long DP. The correlation between the growth and pH drop was always good $r^2 = 0.96$. In conclusion, the obtained absorbance and pH values showed that agave fructans stimulated the growth of Bifidobacteria more efficiently (2-fold) that commercial inulins, the short-DP fructans in the mixtures highly influenced the rate of fermentation by probiotic bacteria. In this work, the main fermentation product in all treatments was acetic acid.

Keywords: *Agave angustifolia*; fructans; short chain fatty acids; Bifidobacteria.

RESUMEN
Los fructanos tipo inulina poseen enlaces β(2-1) que escapan a la acción de las enzimas digestivas por lo tanto alcanzan el colon y sirven como substrato fermentativo. En base a los efectos benéficos de la inulina en la salud, hay un gran interés en las propiedades prebióticas de los fructanos de agave (agavinas). En este trabajo la capacidad probiótica para fermentar diferentes agavinas como fuente de carbono fue estudiada y se evaluaron seis especies de Bifidobacteria en medio Mann-Rogosa and Sharp conteniendo 10 gL^{-1} de fructanos de *Agave angustifolia* de alto y bajo grado de polimerización así como sus mezclas o fructanos comerciales (Raftiline y Raftilose). La absorbancia a 630 nm y el pH fueron determinados y los ácidos grasos de cadena corta (SCFA) generados de su acción metabólica fueron

analizados por cromatografía de gases. La correlación entre el crecimiento y la caída de pH tuvo una r^2 = 0.96. En conclusión, la absorbancia obtenida y valores de pH mostraron que las agavinas de *Agave angustifolia* Haw. estimularon el crecimiento de Bifidobacteria más eficientemente (2 campos) que las inulinas comerciales. Los fructanos de bajo DP de *Agave angustifolia* (AASDP) en la mezclas influyeron grandemente en la velocidad de fermentación por bacterias probióticas. En este trabajo el principal producto de la fermentación fue el ácido acético.

Palabras Clave: *Agave angustifolia*; fructanos; ácidos grasos de cadena corta; Bifidobacterias**.**

INTRODUCCIÓN

Los fructanos son polímeros de fructosa que generalmente presentan una molécula de glucosa terminal, se ha encontrado que la estructura de los fructanos reportada para *Agave tequilana* Weber var. azul, consiste de una mezcla compleja de fructanos conteniendo principalmente enlaces β(2-1) pero también enlaces β(2-6), altamente ramificada y con una glucosa interna o terminal denominados graminanos y agavinas respectivamente [1]. Los fructanos tipo inulina son fermentados selectivamente en el colon humano y pueden ser descritos como prebióticos. Previos reportes indican que los fructanos estimulan el crecimiento y actividad de Bifidobacteria y Lactobacilli en el colon de una manera selectiva y consecuentemente inhiben el crecimiento de bacterias patógenas incrementando la resistencia a infecciones gastrointestinales. [2]. López y Urías-Silvas, [3] reportaron el efecto prebiótico de los fructanos de *Agave tequilana*. Gto. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto prebiótico de los fructanos de alto y bajo grado de polimerización (DP) de *A. angustifolia* Haw. y sus mezclas sobre el crecimiento de cepas de Bifdobacteria.

MATERIALES Y MÉTODOS

Fructanos de *Agave angustifolia* de DP largo (LDP) y DP-corto (SDP) y 3 mezclas de ellos como se describe en la tabla 1 además de fructanos comerciales como Raftiline (RNE) y Raftilose (RSE) fueron utilizados en este trabajo. La extracción y separación de los fructanos por grado de polimerización (DP) se realizó siguiendo la metodología reportada por López *et al.,* [1]. Las Bifidobacterias fueron obtenidas de la ATCC (American Type Culture Collection Rockville, Md.): (A) *Bifidobacterium adolescentis*; (B) *B. animalis*; (C) *B. bifidum*; (D) *B. breve*; (E) *B. infantis* y (F) *B. longum* fueron probadas siguiendo la metodología reportada por Gibson and Wang [4] con algunas modificaciones. El medio de Mann, Rogosa and Sharpe (MRS) se empleó como medio de crecimiento con una concentración de 10 gL^{-1} de fructanos y las bacterias probióticas fueron incubadas anaeróbicamente a 37°C por 20 horas. El crecimiento bacteriano fue medido por densidad óptica (DO) a 630 nm y la ingesta de fructanos por las bacterias probióticas fue evaluada midiendo los cambios de pH del medio de cultivo.

Tabla 1.- Fructanos utilizados

Fructanos	AALDP	AASDP
AALDP	Agavinas de alto DP	
ASDP	Agavinas de bajo DP	
A	75%	25%
B	50%	50%
C	75%	25%
RNE	Fructanos tipo inulina de alto DP	
RSE	Fructanos tipo inulina de bajo DP	

La determinación de los ácidos grasos de cadena corta se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Prieto-Femia *et al.,* [5].

RESULTADOS

Bifidobacterium animalis tuvo el mayor crecimiento con los fructanos de agave de alto DP de *A. angustifolia* con una DO_{630} de 0.301 comparada a *B. breve* y *B. infantis* quienes tuvieron valores de 0.168. *B. adolescentis* y *B. bifidum* casi no utilizaron a AALDP. *B. animalis* creció tanto en AASDP como en AALDP y en todas las mezclas de diferente grado de polimerización, siendo capaz de hidrolizar y fermentar este tipo de fructanos. Con los fructanos de bajo grado de polimerización (AASDP) mostraron el mayor crecimiento las bacterias *B. animalis* y *B. breve*. El crecimiento de *B. breve* tuvo una DO_{630} de 0.514 que fue significativamente diferente y 3.2 veces mayor que para *B. bifidum*. La mayoría de las cepas de Bifidobacteria estudiadas utilizaron AASDP.

La producción de ácido acético fue mucho más pronunciada en cultivos con fructanos de alto y bajo DP de *A. angustifolia* que con RNE y RSE y esta fue proporcional a la reducción de pH. Resultados similares fueron reportados por López y Urías-Silvas [2].

DISCUSIÓN

El mayor crecimiento *in vitro* de probióticos con fructanos de agave como única fuente de carbono, es una indicación de la predominancia de las ramificaciones en la molécula de fructanos de *A. angustifolia*, permitiendo una más rápida hidrólisis de fructanos siendo tres veces más rápido para *B. longum*, *B. infantis*, *B. bifidum* y *B. adolescentis* que los fructanos comerciales, probablemente debido a la actividad de la β-fructosidasa [6]. Van der Meulen *et al*. [7] reportaron resultados similares para *B. animalis.*

CONCLUSIONES

La producción de biomasa y metabolitos por las bifidobacterias probadas en este trabajo corroboró la preferencia para fermentar los fructanos de bajo DP sobre los fructanos de largo DP. Llegando a la conclusión de que la presencia de fructanos de bajo DP en las mezclas influyen altamente la velocidad de fermentación por las bacterias probióticas. Los fructanos de *Agave angustifolia* y mezclas ofrecen un potencial prebiótico abriendo nuevas alternativas como ingrediente alimentario.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la SIP del Instituto Politécnico Nacional y al Cinvestav-Irapuato por las facilidades otorgadas para llevar a cabo esta investigación.

REFERENCIAS

[1] López, M.G., Mancilla-Margalli, N.A., Mendoza-Diaz, G**.** (2003). Molecular structures of fructanos from *Agave tequilana* Weber var. Azul. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 7835-7840.

[2] Gibson, G.R., Robert, H.M., Van Loo, J., Rasta, R.A., Roberfroid, M.B. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews* **17**, 259-275.

[3] López, M.G. Urías-Silvas, J.E. (2007). Agave fructans as prebiotics. In: Shiomi N, Benklebia N, Onodera S (Eds) *Advances in Fructooligosaccharides Research*,Research Signpost, Kerala, India, pp 297-310.

[4] Gibson, G.R., Wang, X**.** (1994). Bifidogenic properties of different types of fructo-oligosaccharides. *Food Microbiology* **11**, 491-498.

[5] Pietro-Femia, A.P., Luceri, C., Dolara, P., Giannini, A., Biggeri, A.; Salvadori, M. Clune, Y., Collins, K.J., Paglierani, M., Caderni, G. (2002). Antitumorigenic activity of the prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis* **23**, 1953-1960.

[6] O'Sullivan, M.C. (1996). Metabolism of bifidogenic factors by gut flora. An overview. *Bulletin of the IDF* **313**, 23-30.

[7] Hopkins, K.J., Cummings, J.H., Mcfarlane, G.T. (1998). Inter-species differences in maximum specific growth rates and cell yields of bifidobacteria cultured on oligosaccharides and other simple carbohydrates source. *Journal of Applied Microbiology* **85**, 381-386.

EVALUATION OF LACCASES AND HYDROLASES OF *Pycnoporus cinnabarinus* GROWN IN AIRLIFT REACTOR

(Evaluación de lacasas e hidrolasas de *Pycnoporus cinnabarinus* cultivado en reactor airlift)

Gerardo Díaz-Godínez [c*], Maura Téllez-Téllez [b], Alexis Joavany Rodríguez-Solís [a], Pedro Cervantes-Muñoz[c], José de Jesús Hernández-Perez [a], Ma de Lourdes Acosta-Urdapilleta [b], Elba Cristina Villegas-Villarreal [a+].

[a] Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos
[b] Centro de Investigaciones Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos;
[c] Centro de Investigación en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: elbav@uaem.mx

Área del Conocimiento: Fermentaciones.

ABSTRACT
Fungi of the genus *Pycnoporus* are white-rot because they have the ability to degrade lignin, cellulose and hemicellulose, since secreted enzymes such as laccases, peroxidases and hydrolases. *Pycnoporus cinnabarinus* is a potential producer of enzymes, however it is very little known about their production of hydrolases. In this study the activities of laccases and four hydrolases of *Pycnoporus cinnabarinus* (HEMIM-79) grown in an AirLift reactor of 5.5 L with 75% capacity of culture medium at pH 6.5 containing glucose yeast extract and minerals were evaluated. The inoculum was mycelium from a Petri dish of 9 cm diameter with potato dextrose agar. The reactor temperature was 25 °C and an air flow of 1 vvm. Samples were taken after 72 h and then every 24 h. For laccases activity was used 2 mM 2,6-dimethoxyphenol at pH 6.5 as substrate. Starch, polygalacturonic acid, xylan and carboxymethylcellulose for amylases, pectinases, xylanases and cellulases, respectively as substrate were used, measuring the release of reducing sugars by the DNS method. In general, in all samples the activity of all enzymes tested was observed and found that the hydrolases were constitutively presented to basal levels. Xylanases and cellulase activity showed fluctuations with values around 100 U/L. Amylases were the enzymes with higher activity values (close to 3200 U/L in the exponential phase) and pectinase showed values between 500-1200 U/L. Laccases showed low values (maximum near to 300 U/L). Note that in this system can be used inducer for each enzyme to increase their activity levels.

Keywords: *Pycnoporus cinnabarinus*; enzymes; laccase; reactor.

RESUMEN
Los hongos del género *Pycnoporus* son de podredumbre blanca debido a que tienen la capacidad de degradar la lignina, celulosa y hemicelulosa, gracias a las enzimas que secretan tales como lacasas, peroxidasas y algunas hidrolasas. *Pycnoporus cinnabarinus* es un productor potencial de enzimas, sin embargo, se sabe muy poco acerca de su producción de hidrolasas. En este estudio se evaluaron las actividades de lacasas y cuatro hidrolasas de *Pycnoporus cinnabarinus* (HEMIM-79) obtenidas en un reactor AirLift de 5,5 L operado a una capacidad del 75% con medio de cultivo a pH 6,5 que contenía extracto de levadura, glucosa y sales minerales. El inóculo fue el micelio obtenido de una caja de Petri de

9 cm de diámetro con agar de dextrosa-papa. La temperatura del reactor fue de 25 °C y un flujo de aire de 1 vvm. Las muestras fueron tomadas a las 72 h, y luego cada 24 h. Para la actividad lacasas se utilizó 2 mM de 2,6-dimetoxifenol a pH 6,5 como sustrato. Como sustrato se utilizaron almidón, ácido poligalacturónico, xilano y carboximetilcelulosa para amilasas, pectinasas, xilanasas y celulasas, respectivamente, la actividad se midió por la cuantificación de azúcares reductores liberados por el método de DNS. En general, en todas las muestras se observó la actividad de todas las enzimas evaluadas y se encontró que las hidrolasas se presentaron constitutivamente a niveles basales. La actividad de xilanasas y celulasas mostraron fluctuaciones con valores en torno a 100 U/L. Las amilasas fueron los enzimas con valores más altos de actividad (cerca de 3,200 U/L en la fase exponencial) y las pectinasas mostraron valores entre 500 a 1200 U/L. Las lacasas mostraron valores bajos (el máximo cerca de 300 U/L). Es importante mencionar que se pueden utilizar inductores para cada enzima para aumentar sus niveles de actividad.

Palabras Clave: *Pycnoporus cinnabarinus*; enzimas; lacasas; reactor.

INTRODUCCIÓN

Los hongos del género *Pycnoporus* crecen sobre madera podrida, residuos de madera y pajas agrícolas, los cuales son materiales lignocelulósicos. Estos organismos están clasificados como hongos de pudrición blanca, ya que tienen la capacidad de degradar eficientemente a la lignina además de celulosa y hemicelulosa, gracias a su capacidad de secretar un gran número de enzimas tanto fenoloxidasas como hidrolasas. La producción de enzimas está influenciada por diversos factores, por ejemplo, se ha reportado que la actividad y número de isoenzimas de lacasas en hongos, depende de la temperatura, pH, inductores, condiciones de cultivo y la composición del medio [1], además se ha sugerido que pueden ser constitutivas o inducibles [2, 3]. El uso de inductores también se ha estudiado, como en el caso de un trabajo donde el medio de cultivo se enriqueció con cobre para inducir la producción de isoenzimas de lacasas y reportaron hasta 14000 U/L en cultivo líquido y solo 5000 U/L aproximadamente en cultivo sólido sobre espuma de poliuretano [1]. En otro estudio, donde se evaluó el efecto del pH sobre la producción de lacasas de *Pleurotus ostreatus* en cultivo líquido, se observó cerca de 38000 U/L y se informó que no es el mismo pH de producción y de actividad [4]. Por otro lado, se propuso un medio de cultivo con presencia de cobre como inductor, glucosa y extracto de levadura que permitió el incremento de la actividad y producción de lacasas [1]. Las enzimas hidrolíticas son empleadas en diversas áreas, incluyendo la alimenticia, farmacéutica, del papel, etc., y las especies de *Pycnoporus* son productores potenciales de tales enzimas. Ko y col. [5] evaluaron la actividad de α-amilasa, celulasa, β-glucosidasa, lacasa y xilanasa en las pajas gastadas de cuatro especies de hongos comestibles incluyendo *Pleurotus ostreatus*. En la composta de *Lentinula edodes* se observaron las actividades enzimáticas más altas de α-amilasa, celulasa y β-glucosidasa, y en la de *P. ostreatus* se encontró la actividad más alta de lacasa. La mayor actividad xilanasa se encontró en la composta de de *Flammulina velutipes*. En otro trabajo, una cepa comercial de *Pleurotus ostreatus* se cultivó sobre paja de arroz y aserrín en bolsas de plástico. Las actividades de las enzimas exoglucanasas, endoglucanasas, carboximetilcelulasas y pectinasas fueron mayores en aserrín en comparación a las producidas en paja de arroz, tanto en micelio como en los cuerpos fructíferos. La actividad de xilanasas producida en el aserrín mostró mayor actividad en el micelio (21 U/g), luego disminuyó bruscamente en la etapa de fructificación (11 U/g) [6]. En este estudio se creció a *Pycnoporus cinnabarinus* en un reactor Airlift y se evaluó la actividad enzimática excretada a lo largo del cultivo; cabe mencionar existen mínimos reportes al respecto.

METODOLOGÍA

Microorganismo de estudio

Se utilizó la cepa de *Pycnoporus cinnabarinus* (HEMIM-79). El inóculo fue el micelio obtenido de una caja de Petri de 9 cm de diámetro con PDA, invadida al 90 % aproximadamente.

Fermentación

La fermentación se realizó en un biorreactor AirLift de 5.5 L, con el 75 % de su capacidad de medio de cultivo a pH 6.5 que contenía glucosa, extracto de levadura y sales minerales [1]. La temperatura del reactor fue de 25° C y un flujo de aire de 1 vvm. Se tomaron muestras del caldo de cultivo a partir de las 72 h después de la inoculación y posteriormente cada 24 h. En cada extracto crudo enzimático (ECE, caldo de cultivo libre de células) se midió la actividad de algunas enzimas.

Determinación de las actividades enzimáticas

La actividad de lacasas se determinó usando como sustrato 2 mM de 2,6-dimetoxifenol (DMP) en buffer de fosfatos 0.1 M y pH de 6.5. Una unidad de actividad (U) de lacasa se consideró como la cantidad de enzima que provoca un incremento de una unidad de absorbancia (648 nm) por minuto en la mezcla de reacción [1]. Las actividades de pectinasas, amilasas, invertasas, xilanasas y celulasas se determinaron utilizando el sustrato correspondiente (ácido poligalacturónico, almidón, sacarosa, xilano y carboximetilcelulosa, respectivamente) y midiendo la liberación de azúcares reductores por el método del DNS. Se reportó la actividad en unidades internacionales (U) que son la cantidad de enzima que libera 1 µmol de producto por min.

RESULTADOS

En la figura 1 se muestra la actividad de las enzimas evaluadas. Las celulasas mostraron actividad durante todo el cultivo con valores al inicio de aproximadamente 130 U/L y en los últimos tiempos los valores fueron de alrededor de 95 U/L. Las xilanasas presentaron fluctuaciones de actividad de entre 60 y 115 U/L, pero se observó actividad durante toda la fermentación. Álvarez-Cervantes y col. [7] reportaron aproximadamente 12000 U/L de xilanasas de *Sporisorium reilianum* desarrollado en cultivo liquido en presencia de xilano de abedul. En un estudio reciente se reportó que *Stenocarpella maydis* produjo actividad de celulasas de casi 8000 y 9500 U/L en cultivo líquido y sólido respectivamente [8]. En este estudio no se observó actividad de invertasas. Las pectinasas mostraron valores desde 350 hasta 1300 U/L; en un estudio se reportó la actividad de pectinasasa de *Aspergillus niger* crecido en cultivo líquido con pectina como inductor y fuente de carbono y observaron aproximadamente 1700 U/L, sin embargo, en cultivo sólido se alcanzaron más de 7000 U/L. Las lacasas mostraron valores cercanos a las 200 U/L, siendo valores bajos con respecto a los reportados previamente cuando se empleó a *Pleurotus ostreatus* crecido en el mismo medio de cultivo pero en matraces agitados [1].

Cabe mencionar que las enzimas hidrolasas se produjeron en ausencia de inductor, lo cual sugiere que se podría aumentar su producción en presencia de sus respectivos inductores, por otro lado, también se podría sugerir que las invertasas son inducibles para este hongo, pero se debe corroborar en un cultivo en presencia de sacarosa.

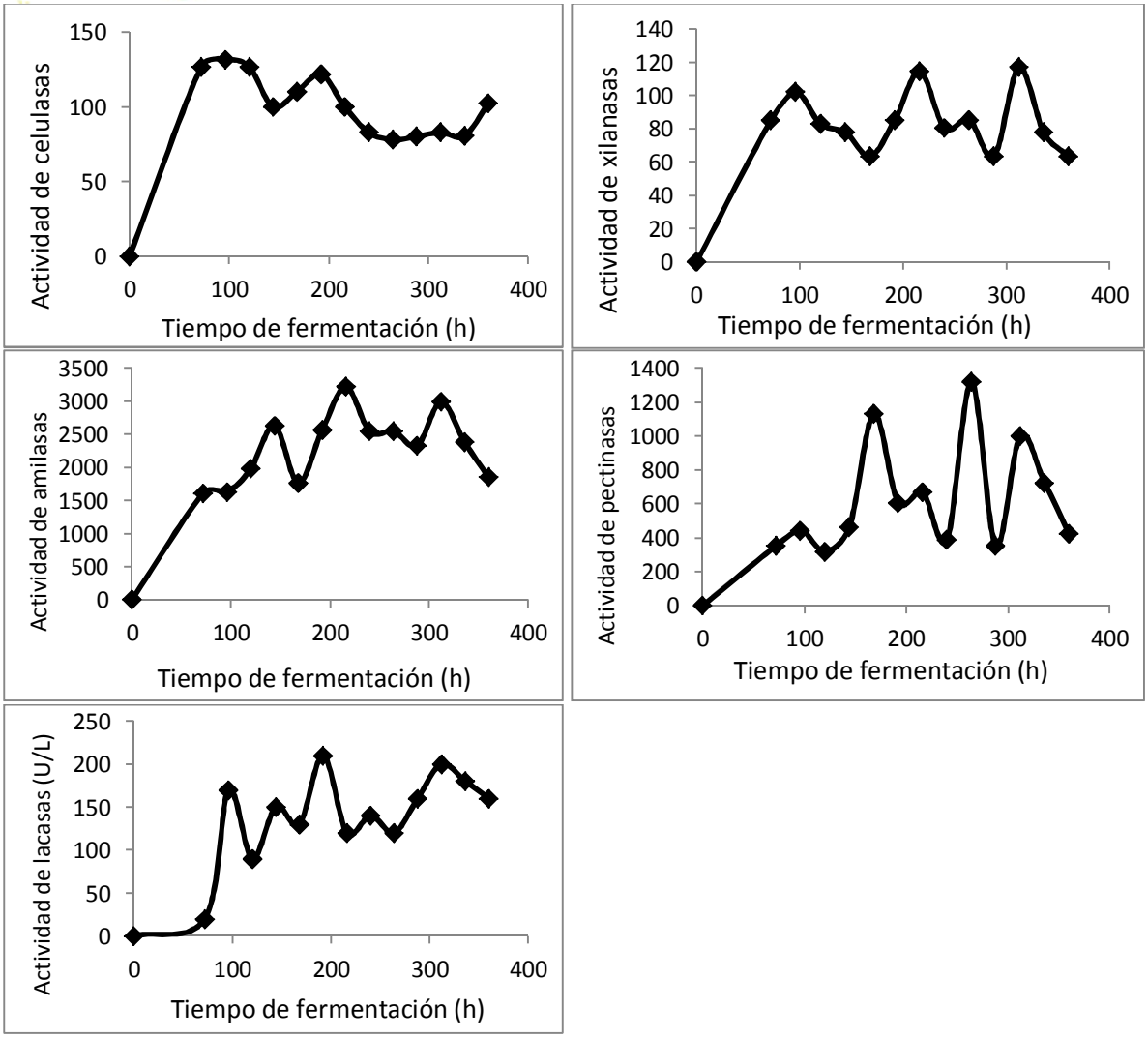


Figura 1. Actividad enzimática producida por *Pycnoporus cinnabarinus* crecido en reactor AirLift.

CONCLUSIONES

Pycnoporus cinnabarinus produjo enzimas hidrolasas y lacasas en un medio con glucosa en el reactor AirLift, por lo que se considera que las enzimas observadas son constitutivas, sin embargo, se sugiere que los niveles de producción se pueden incrementar si se adicionaran inductores.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por el apoyo para estancia sabática de G. Díaz Godínez (Solicitud 233234).

REFERENCIAS

[1] Téllez-Téllez M, Fernández FJ, Montiel-González AM, Sánchez C, Díaz-Godínez G. "Growth and laccase production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solid-state fermentation". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81, 675-679, 2008.

[2] Téllez-Téllez M, Sanchez C, Loera O, Diaz-Godinez G. “Differential patterns of constitutive intracellular laccases of the vegetative phase of *Pleurotus* species”. *Biotechnol. Lett*. 27, 18, 1391-1394, 2005.

[3] Palmieri G, Giardina P, Bianco C, Fontanella B, Sannia G. “Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus”. Appl. Environ. Microbiol*. 66, 920-924, 2000.

[4] Rubén Díaz, Maura Téllez-Téllez, Carmen Sánchez, Martha D. Bibbins-Martínez, Gerardo Díaz-Godínez, Jorge Soriano-Santos. “Influence of initial pH of the growing medium on the activity, production and genes expression profiles of laccase of *Pleurotus ostreatus* in submerged fermentation”. *Electronic J Biotechnol*. 16 (4), 2013.

[5] Ko HG, Park SH, Kim SH, Gu PH, Park WM. “Detection and recovery of hydrolytic enzymes from spent compost of four mushroom species”. *Folia Microbiol*. 50: 103-106, 2005.

[6] Sherief AA, El-Tanash AB, Temraz AM. “Lignocellulolytic enzymes and substrate utilization during growth and fruiting of *Pleurotus ostreatus* on some solid wastes”. *Environ. Sci. Technol*. 3: 18-34, 2010.

[7] Álvarez-Cervantes J, Hernández-Domínguez E M, Arana-Cuenca A, Díaz-Godínez G, Mercado-Flores Y. “Purification and characterization of xylanase SRXL1 from *Sporisorium reilianum* grown in submerged and solid-state fermentation". *BioRes*. 8: 5309-5318, 2013.

[8] Hernández-Domínguez EM, Rios-Latorre RA, Álvarez-Cervantes J, Loera-Corral O, Román-Gutiérrez AD, Díaz-Godínez G, Mercado-Flores Y. “Xylanases, cellulases, and acid protease produced by *Stenocarpella maydis* grown in solid-state and submerged fermentation”. *BioRes.* 9: 2341-2358, 2014.

ACTIVITY AND ISOFORMS OF LACCASES OF *Lentinula boryana* GROWN IN SOLID-STATE FERMENTATION

(Actividad e isoformas de lacasas de *Lentinula boryana* crecido en fermentación en medio sólido)

Rosa Mariela Hernández-Nava[a,b], Marlen Mendoza-García[a,b], Gerardo Díaz-Godínez[c], Maricarmen Jaime-Salinas[a,d], Ma de Lourdes Acosta-Urdapilleta[a], Elba C. Villegas-Villarreal[e], Maura Téllez-Téllez[a*+]

[a] Centro de Investigaciones Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
[b] Licenciatura de Biología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
[c] Centro de Investigación en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala.
[d] Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco.
[e] Centro de Investigaciones en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: maura.tellez@uaem.mx

Área del Conocimiento: Fermentaciones.

ABSTRACT
The white-rot fungus *Lentinula boryana* grows in tropical and subtropical areas of America including Mexico, however despite being an edible mushroom, its cultivation on a large scale has not been developed so far and the information available about the possible medicinal uses is scarce. The white-rot fungi have an enzymatic complex (laccases, peroxidases and hydrolases) with the ability to degrade lignocellulosic materials. Laccases are phenoloxidases with potential uses in bioremediation, since they can degrade phenolic compounds, dyes and different aromatic amines which produce environmental pollution. In this work, a strain of *Lentinula boryana* which is native from state of Morelos was used. Since the natural habitat of this fungus is the solid medium, is possible to produce laccases in solid-state fermentation using an inert support with a synthetic medium. Erlenmeyer flasks (250 mL) with 15 mL of liquid medium (potato-dextrose broth) and 0.5 g of polyurethane foam (PUF, cubes of 0.5 cm per side) were used. Each flask was inoculated with three mycelium pellets (4 mm de diam) from periphery of a colony obtained at 22 °C for 7 days. The fermentation was incubated at 22°C. The enzymatic extracts were obtained by soft press of PUF. Laccase activity was measured using 2,6-dimethoxyphenol by absorbance changes at 468 nm. The reaction mixture was heated at 40 °C during 10 min. Zymograms were used to observe the isoform numbers in each ECE using DMP as substrate. Its activity and isoforms of laccases at two pHs was quantified. Highest activity was obtained at pH 4.5 (9600 U/L) and two laccases isoforms, could observed in the early stages of growth (144-192 h).

Keywords: Laccases, *Lentinula boryana*, solid culture, zymogram.

RESUMEN

El hongo de pudrición blanca *Lentinula boryana* crece en áreas tropicales y subtropicales de América, incluyendo México, sin embargo a pesar de ser un hongo comestible, su cultivo a gran escala no se ha desarrollado ampliamente hasta el momento y la información disponible sobre los posibles usos medicinales es escasa. Los hongos de pudrición blanca tienen un complejo sistema enzimático (lacasas,

peroxidasas e hidrolasas) con la capacidad de degradar materiales lignocelulósicos. Las lacasas son fenoloxidasas con usos potenciales en la biorremediación, ya que pueden degradar compuestos fenólicos, colorantes y diferentes aminas aromáticas que producen la contaminación ambiental. En este trabajo se utilizó una cepa de *Lentinula boryana* nativa del estado de Morelos. Dado que el hábitat natural de este hongo es el medio sólido, es posible producir lacasas en fermentación en estado sólido utilizando un soporte inerte con un medio sintético. Se utilizaron matraces Erlenmeyer (250 mL) con 15 mL de medio líquido (caldo de dextrosa de papa) y 0.5 g de espuma de poliuretano (PUF, cubos de 0.5 cm por lado). Cada matraz se inoculó con tres fragmentos de micelio (4 mm de diámetro) obtenidos de la periferia de una colonia crecida a 22° C. Se incubó a 22° C. Los extractos enzimáticos fueron obtenidos por prensado suave de PUF. La actividad de la lacasa se midió utilizando 2,6-dimetoxifenol por cambio de absorbancia a 468 nm. La mezcla de reacción se incubó a 40°C durante 10 min y mediante los zimogramas se observaron las isoformas en cada ECE usando DMP como sustrato. Se cuantificó su actividad y isoformas de lacasas en dos pHs. La actividad más alta se obtuvo a pH 4,5 (9.600 U/L) y dos isoformas lacasas, las cuales se encontraron en los ECE de las primeras etapas de crecimiento del hongo (144-192 h).

Palabras Clave: Cultivo sólido, lacasas, *Lentinula boryana*, zimogramas

INTRODUCCIÓN

Se han reportaron seis especies reconocidas en el género *Lentinula*: *L. edodes*, *L. lateritia* (Berk). Pegler, *L. novaezelandiae* [Stev.] Pegler (estas tres especies tienen distribución asiática), *L. boryana* (Berk. y Mont.) Pegler, *L. guarapiensis* (Speg.) Pegler, y *L. raphanica* (Murrill) Mata & RH Petersen (se distribuyen en América). Pero los trabajos de Shimomura y col. [1] y Guzmán y col. [2] sugieren que las especies distribuidas en Asia y Australasia comprenden una sola especie biológica, debido a su capacidad de entrecruzarse. Pero Hibbett y otros autores [3-6] recomiendan que haya cambio de una sola clasificación de especie biológica para las especies de Asia-Australasia y apoyar las especies distintas filogenéticas para delinear las poblaciones únicas, divergentes genéticos de shiitake grupos monofiléticos posiblemente existentes. Esto deja claro que *Lentinula boryana* y *Lentinula edodes* permanecen separadas como especies biológicas, incapaces de entrecruzarse [2, 7]. Se ha reportado que ambas especies se caracterizan por poseer hifas densas en el basidiocarpo con laminillas sinuosas que sobresalen del estípite y la pérdida de color a medida que madura el cuerpo fructífero [3]. Estas similitudes morfológicas entre *Lentinula boryana* y *Lentinula edodes* han incrementado el interés en estudios centrados en la bioquímica, la fisiología, la ecología y filogenia de *L. boryana*, con el fin de cultivar con éxito este hongo [2, 4, 8, 9]. El crecimiento de los hongos de este género sobre material lignocelulósico se debe a su capacidad de producción de enzimas hidrolíticas (celulasas y hemicelulasas) y oxidativas (ligninolíticas), que catalizan reacciones de óxido-reducción para degradar los componentes poliméricos en moléculas de bajo peso molecular, que pueden ser asimiladas como nutrientes por el organismo [10]. Entre las enzimas oxidativas que participan directa o indirectamente en la degradación de la lignina se encuentran las familias de lignina peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP) y lacasas [11]. Las lacasas son enzimas que oxidan compuestos mono- y difenólicos, además se han utilizadó para la oxidación de compuestos no fenólicos mediante la acción de sustancias co-oxidantes denominadas mediadores [12]. El objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad enzimática de lacasas de *L. boryana* crecido en fermentación en medio sólido sin adición de inductores.

METODOLOGÍA

Microorganismos de estudio
Se utilizó la cepa *L. boryana* HEMIM-44 (Herbario Micológico del estado de Morelos). El inóculo se desarrolló sobre agar dextrosa-papa, a una temperatura de 22 °C y resembrándose cada mes.

Fermentación en medio sólido (FMS)
Cada matraz de 250 mL contuvo 15 mL del medio de cultivo (caldo dextrosa-papa) junto con 0.5 g de espuma de poliuretano (PUF) de baja densidad (17 kg/m^3) cortada en cubos (0.5 cm de altura × 0.5 cm de anchura × 0.5 cm de profundidad) como soporte inerte, previamente lavados y esterilizados [13]. Cada matraz se inoculó con tres fragmentos de micelio de 4 mm de diámetro, tomados de la periferia de una colonia de *Lentinula boryana*.

Obtención de extracto crudo enzimático
El extracto crudo enzimático (ECE) de la FMS se obtuvo por prensado de la PUF a través de una jeringa de 50 mL [13, 14]. El pH de los ECE se midió por potenciometría.

Determinación de la actividad de lacasas
La actividad de lacasas se determinó en cada ECE, utilizando como sustrato 2,6-dimetoxifenol (DMP). La mezcla de reacción se realizó con 950 µL de DMP 2 mM, en buffer de acetatos 0.1 M (pH de 4.5 y 5.5) y 50 µL de ECE. La actividad se determinó por incremento en la absorbancia a 468 nm de la mezcla de reacción a 40 °C durante 10 min. Una unidad de actividad (U) de lacasa se consideró como la cantidad de enzima que provoca un incremento de una unidad de absorbancia por minuto en la mezcla de reacción.

Zimografía
El gel de separación contenía 100 g/L de acrilamida y 27 g bis-acrilamida/L. El gel de empaquetamiento contenía 40 g/L de acrilamida y 27 g bis-acrilamida/L, 30 µL de ECE se mezcló con buffer de muestra sin un agente de la reducción de los enlaces disulfuro y sin tratamiento de calor, las muestras se colocaron en geles (espesor de 0.75 mm) en el sistema de electroforesis de Mini-Protean III (BioRad) y se aplicó 150 V por 1-1.25 h. Después de la electroforesis, los geles se lavaron con agua desionizada en un agitador orbital (20-30 rpm) durante 5-6 horas, el agua se cambia cada hora para eliminar SDS. Por último, los geles fueron incubados a temperatura ambiente en una solución de DMP. La actividad oxidativa de lacasas apareció como zonas oscuras en los geles [15].

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Se pudo observar que el micelio creció sobre el PUF (Figura 1) utilizando el medio CDP el cual es uno de los medios de cultivo mayormente utilizados para la manutención y preservación de los hongos. En la mayoría de estudios realizados con este tipo de macromicetos, el medio dextrosa-papa es utilizado para iniciar la activación de la cepa y su posterior uso, tanto para fermentaciones en cultivo líquido, como en trabajos realizados con cultivo tradicional y fermentación sólida [16]. Este medio de cultivo tiene todos los componentes nutritivos para que los hongos se desarrollen, el extracto de papa proporciona almidón y la dextrosa (glucosa) es la fuente de carbono principal para los hongos, el pH (5.6 ±2) es ideal para el crecimiento de hongos.

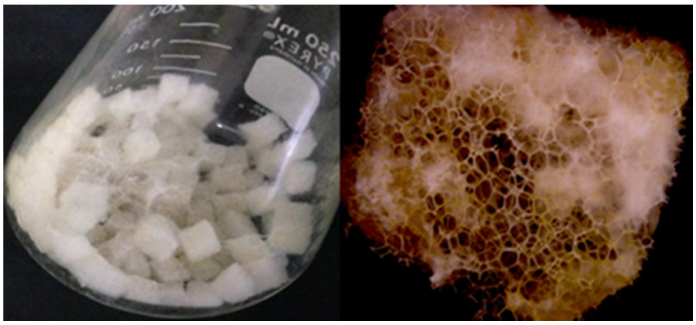


Figura 1. Crecimiento del micelio de *Lentinula boryana* sobre PUF

Se obtuvo mayor actividad de lacasas cuando se evaluó a pH de 4.5 (Figura 2), la actividad se observó durante todo el crecimiento, la menor actividad fue a las 240 h (364 U/L), posteriormente fue incrementando hasta 9600 U/L (528 h). Sin embargo a pH 5.5 la máxima actividad fue de 3404 U/L (576 h) y la menor actividad fue de 364 U/L (192 h). Nagai y col. [17] reportó que la actividad de lacasas fue determinada con ABTS a pH de 4.0, la actividad fue proporcional al crecimiento micelial del cultivo y que la actividad no se detectó antes de las 144 h y alcanzó casi el máximo (aproximadamente 1400 U/L) a las 288 h. En este trabajo a las 144 h presentó una actividad de 4372 U/L (pH 4.5) y 3157 U/L (pH 5.5).

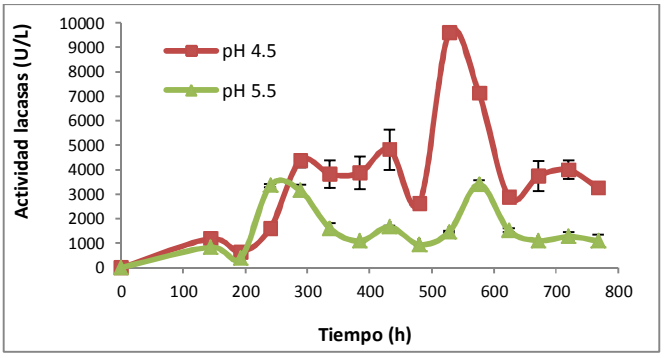


Figura 2. Actividad de lacasas de *Lentinula boryana* obtenida en FMS

Los zimogramas de *Lentinula boryana* se realizaron a dos pH´s, en la Figura 3 se puede observar dos isoformas de lacasas en las primeras horas (144-192 h), posteriormente solo se observa una isoforma. En los zimogramas de pH 5.5 (Figura 4) en las primeras horas no es visible ninguna isoforma, apartir de las 240 h es visible una isoforma, la cual se mantiene contante durante todo el crecimiento.

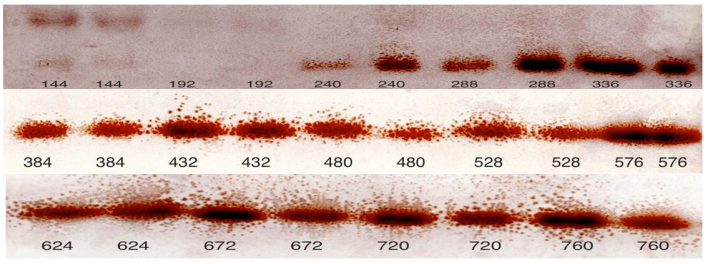


Figura 3. Zimogramas de la actividad de lacasas a pH 4.5 de *Lentinula boryana* en FMS (los números indican el tiempo en h de muestreo)

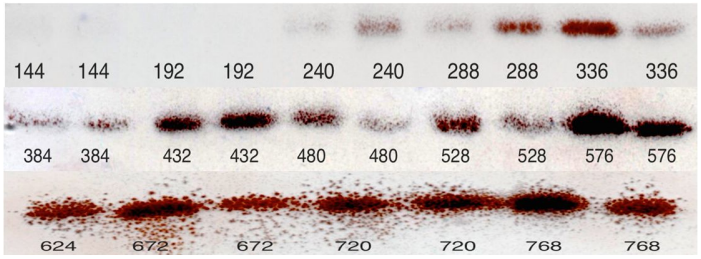


Figura 4. Zimogramas de la actividad de lacasas a pH 5.5 de *L. boryana* en FMS (los números indican el tiempo en h de muestreo)

Saeki y col. [18] creció *Lentinula edodes* en cultivo líquido suplementando con asserrin de *Castanopsis cuspidata*, reportó tres isoenzimas Lcc (74 kDa), Lcc (61 kDa) y Lcc (67 kDa); se detectaron como principales isoenzimas a Lcc (61 y 67 kDa), la isoenzima adicional Lcc (74), se detectó débilmente entre el día 22 y día 47 de cultivo. En este trabajo sólo visualiza claramente una isoforma.

CONCLUSIONES

El pH que le favorece a la actividad de lacasa de *Lentinula boryana* es 4.5, ya que en donde hubo mayor actividad y se pudieron visualizar dos isoformas de lacasas a ese mismo pH, se podrían modificar condiciones de cultivo para optimizar la producción no solo de lacasas, sino de otras enzimas oxidasas.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a PROMED por el financiamiento (Folio: UAEMOR-PTC-336).

REFERENCIAS

[1] Shimomura, N., Hasebe, K., Nakai-Fukumasa, Y., Komathu, M. (1992). Intercompatibility between geographically distant strains of shiitake. Reports of the Tottori Mycological Institute 30: 26–29.

[2] Guzman, G., Salmones, D., Tapia, F. (1997). *Lentinula boryana*: morphological variations, taxonomic position, distribution and relationships with *Lentinula edodes* and related species. Reports of the Tottori Mycological Institute 35: 1–28.

[3] Hibbett, D. (1992). Towards a phylogenetic classification for shiitake: taxonomic history and molecular perspectives. Reports of the Tottori Mycological Institute 30: 30–42.

[4] Hibbett, D., Fukumasa-Nakai, Y., Tsuneda, A., Donoghue, M. (1995). Phylogenetic diversity in shiitake inferred from nucle- ar ribosomal DNA sequences. Mycologia 87: 618–38.

[5] Hibbett, D.S., Donoghue, M.J. (1996). Implications of phylogenetic studies for conservation of genetic diversity in shiitake mushrooms. Conservation Biology 10: 1321–27.

[6] Hibbett, D.S., Hansen, K., Donoghue, M.J. (1998). Phylogeny and biogeography of *Lentinula* inferred from an expanded rDNA dataset. Mycological Research 102: 1041–49.

[7] Mata, G., Guzmán, G. (1989). Hibridación entre una cepa Mexicana de *Lentinus boryanus* y una Asiática de *Lentinus edodes*. Revista Mexicana de Micologia 5: 77–80.

[8] Guzmán, G. (1993). Hongos y Líquenes. In: Guevara, S., P. Moreno-Casasola, J. Rzedowski, (eds.), Logros y perspectivas del conocimiento de los recursos vegetales de México en visperas del siglo XXI. Instituto de Ecología y Sociedad Botánica de México. México, D.F. 1-5.

[9] Mata, J.L., Petersen, R.H. (2000). A new species of *Lentinula* (Agaricales) from Central America. Mycoscience 41: 351-355.

[10] Leatham, G.F. (1985). Extracellular enzymes produced by the cultivated mushroom *Lentinus edodes* during degradation of a lignocellulosic medium. Applied and Environmental Microbiology 50: 859-867.

[11] Kersten, P., Cullen, D. (2007). Extracellular oxidative systems of the lignin-degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Fungal Genetics and Biology 44: 77-87.

[12] Bourbonnais, R., Leech, D., Paice, M.G. (1998). Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin model compounds. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects 1379: 381-390.

[13] Díaz-Godínez, G., Soriano-Santos J., Augur C., Viniegra-Gonzalez, G. (2001). Exopectinases produced by *Aspergillus niger* in solid-state and submerged fermentation: A comparative study. Journal of industrial Microbiology and Biotechnology 26: 271-275.

[14] Zhu, Y., Knol, W., Smits, J.P, Bol, J. (1996). Medium optimization for nuclease P1 production by *Penicillium citrinum* in solid-state fermentation using polyurethane foam as inert carrier. Enzyme and Microbial Technology 18(2), 108-112.

[15] Téllez-Téllez, M., Sánchez, C., Loera, O., Díaz-Godínez, G. (2005). Differential patterns of constitutive intracellular laccases of the vegetative phase of *Pleurotus* species. Biotechnology letters 27(18), 1391-1394.

[16] Feng, Y.L., Li, W.Q., Wu, X.Q., Cheng J.W., Ma. S.Y. (2010). Statistical optimization of media form mycelia growth and exopolysaccharide production by *Lentinus edodes* and a kinetic model study of two morphologies. Biochemical Engineering Journal 49: 104-112.

[17] Nagai, M., Sato, T., Watanabe, H., Saito, K., Kawata, M., Enei, H. (2002). "Purification and characterization of an extracellular laccase from the edible mushroom *Lentinula edodes*, and decolorization of chemically different dyes. Applied Microbiology and Biotechnology 60 (3): 327-335.

[18] Saeki, N., Takeda, H., Tanesaka, E., Yoshida, M. (2011). Induction of manganese peroxidase and laccase by *Lentinula edodes* under liquid culture conditions and their isozyme detection by enzymatic staining on native. Mycoscience 52 (2): 132-136.

PRODUCTION OF ENZYME EXTRACTS BY FERMENTATION IN SOLID STATE

(Producción de extractos enzimáticos por fermentación en medio sólido)

Fatima Ortega-Enríquez [a]*, Neydeli Ayala-Mendivil [a], Georgina Sandoval [a+].

[a]Departamento de Biotecnología Industrial, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C (CIATEJ).

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: gsandoval@ciatej.mx / gsandoval@confluencia.net

Área del Conocimiento: Fermentaciones.

ABSTRACT
Currently the hydrolytic enzymes have great importance in technological applications due to its high specificity and efficiency in processes in which they are involved. Particularly cellulase enzymes are used in the textile industry and in the processing of lignocellulosic materials for the production of food and biofuels. Xylanase enzymes are also important because they have applications in the paper industry and food preparation. While chitinase enzymes are important for agriculture as alternatives for pesticides. It is well know that solid-state fermentation (SSF) is a low-cost process to produce enzymes; approximately 90% of all industrial enzymes are produced by SSF using filamentous fungi. In the present work the production of enzyme extracts in SSF by a fungus isolated from fruiting bodies of edible mushrooms was studied. In this work we also evaluated the influence of initial pH in the medium and incubation temperature on the enzyme production. The SSF were carried out in 250 ml flasks using agroindustrial waste as solid support and were incubated for six days. Cellulase, xylanase, protease and chitinase activities were monitored every 24 hours. As result we produce an enzyme extract in 5 days and the highest enzymatic activity was xylanase; these results could be useful for the future studies and optimization of enzyme production.

Keywords: enzyme; solid-state fermentation; fungi.

QUANTIFICATION OF LACCASES OF *Lentinula boryana* GROWN IN THREE DIFFERENT CULTURE MEDIA

(Cuantificación de lacasas de *Lentinula boryana* crecido en tres diferentes medios de cultivo)

Rosa Mariela Hernández-Nava[a,b], Marlen Mendoza-García[a,b], Gerardo Díaz-Godínez[c], Ma de Lourdes Acosta-Urdapilleta[a], Elba Cristina Villegas-Villarreal[d], Maura Téllez-Téllez[a*+]

[a] Centro de Investigaciones Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
[b] Licenciatura de Biología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
[c] Centro de Investigación en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala.
[d] Centro de Investigaciones en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: maura.tellez@uaem.mx

Área del Conocimiento: Fermentaciones

ABSTRACT
In Mexico there are several species of edible mushrooms, some are wild and other are cultured. Some species belong to the white-rot fungi, which have an enzymatic complex (laccases, peroxidases and hydrolases) with the ability to degrade lignocellulosic materials. Laccases are phenoloxidases with potential uses in bioremediation, since they can degrade phenolic compounds, dyes and different aromatic amines which produce environmental pollution. It has been reported that the laccase activity depends of various factors including the culture medium composition. *Lentinula boryana* is an edible and white-rot fungus, widespread in Mexico, grows on dead trunks. In this work, *Lentinula boryana* was grew in three different liquid culture media (malt extract, whole wheat flour with sucrose and potato-dextrose) and laccase activity was evaluated at different reaction pHs (3.5, 4.5 and 5.5). All fermentations were carried out in 125 mL Erlenmeyer flasks with 50 mL of liquid medium. Each flask was inoculated with three mycelium pellets (4 mm de diam) from periphery of a colony obtained at 22 °C for 7 days. The fermentations were incubated at 22°C in orbital shaker (120 rpm). The enzymatic extracts were obtained at 144 h and after that each 120 h, by broth filtration. Laccase activity was measured using 2,6-dimethoxyphenol by absorbance changes at 468 nm. The reaction mixture was heated at 40 °C during 10 min. In the culture with whole-wheat flour, the highest laccases activity was observed at pH 4.5 (6683U/L) and the lowest activity was obtained at pH 5.5 (10.2 U/L) in potato dextrose medium. The results suggest that *Lentinula boryana* could increase its laccase activity in presence of inducers.

Keywords: Laccases, *Lentinula boryana*, liquid culture.

RESUMEN
En México hay varias especies de hongos comestibles, algunos son silvestres y otros se cultivan. Algunas especies pertenecen a los hongos de pudrición blanca, que tienen un complejo sistema enzimático complejo (lacasas, peroxidasas e hidrolasas) con la capacidad de degradar materiales lignocelulósicos. Las lacasas son fenoloxidasas con usos potenciales en la biorremediación, ya que pueden degradar

compuestos fenólicos, colorantes y diferentes aminas aromáticas que producen la contaminación ambiental. Se ha informado de que la actividad de la lacasa depende de varios factores, incluyendo la composición del medio de cultivo. *Lentinula boryana* es un hongo comestible y de podredumbre blanca, muy extendida en México, crece en los troncos muertos. En este trabajo, *Lentinula boryana* se creció en tres medios de cultivo líquido diferente (extracto de malta, harina de trigo integral con sacarosa y de dextrosa papa) y la actividad lacasa fue evaluada a diferentes pH de reacción (3.5, 4.5 y 5.5). Todas las fermentaciones se realizaron en matraces de 125 ml Erlenmeyer con 50 mL de medio. Cada matraz se inoculó con tres pellets de micelio (4 mm de diametro) de la periferia de una colonia obtenida a 22° C crecida durante 7 días. El cultivo se incubó a 22° C en un agitador orbital (120 rpm). Los extractos enzimáticos se obtuvieron a 144 h y después de que cada 120 h, por filtración. Actividad de la lacasa se midió utilizando 2,6-dimetoxifenol por los cambios de absorbancia a 468 nm. La mezcla de reacción se calentó a 40° C durante 10 min. En el cultivo con harina de trigo integral, se observó la actividad más alta a pH 4.5 lacasas (6683 U/L) y la actividad más baja se obtuvo a pH 5.5 (10.2 U/L) en medio de dextrosa de papa. Los resultados sugieren que *Lentinula boryana* se podría incrementar la producción de enzimas lacasas en presencia de inductores.

Palabras Clave: Cultivo líquido, lacasas, *Lentinula boryana*.

INTRODUCCIÓN

Los hongos silvestres tienen importancia ecológica, cultural y económica para las comunidades rurales. En México este recurso no ha sido utilizado en todo su potencial y los beneficios económicos son limitados por falta de organización, procesamiento, regulación, conocimiento científico y tecnológico [1]. En México existen más de 200 especies de hongos comestibles, más de 40 especies medicinales, dentro de estos hongos existen algunos de pudrición blanca que son organismos capaces de degradar componentes de las plantas (lignina, celulosa y hemicelulosa) [2]. Entre los hongos de pudrición blanca hay géneros comestibles como *Lentinula,* crece de forma gregaria en madera caída de una gran variedad de árboles caducifolios, en climas cálido y húmedo. Los hongos de pudrición blanca se pueden desarrollar sobre los sustratos de carácter lignocelulósico, secretando diversas enzimas, tales como lacasa, Manganeso peroxidasas (MnP) y Lignina peroxidasa (LiP) [3]. Las enzimas lacasas y peroxidasas tiene gran importancia en la biorremediación, debido a su capacidad de oxidación se emplea en industrias como la cosmética, alimenticia y textil, para sintetizar colorantes, puede ser un método eficiente para el teñido de artículos textiles, controlando las condiciones del proceso [4]. El hongo *Lentinula boryana* es un hongo de pudrición blanca reportado en América incluyendo México, que crece en zonas tropicales y subtropicales sobre troncos muertos en la época de lluvia. Este hongo podría ser una alternativa de obtención de enzimas de importancia industrial, como es el caso de las lacasas, las cuales son prometedoras para remplazar muchos de los procesos químicos convencionales, ya que catalizan la oxidación de una gran variedad de sustratos orgánicos e inorgánicos [5].

METODOLOGÍA

Microorganismos de estudio

Se utilizó la cepa *Lentinula boryana* HEMIM-44 (Herbario Micológico del estado de Morelos). El inóculo se desarrolló sobre agar dextrosa-papa, a una temperatura de 22 °C y resembrándose cada mes.

Cultivo líquido y obtención del extracto crudo enzimático

Se colocaron 50 mL de cada medio cultivo: extracto de malta (EM), medio con harina integral de trigo y azúcar de mesa (HIT) y dextrosa-papa (DP) en matraces Erlenmeyer de 125 mL. Se inocularon con tres fragmentos de micelio de 4 mm de diámetro cortados de la periferia de la colonia. Se incubaron a 22 °C con agitación orbital a 120 rpm. El extracto crudo enzimático (ECE) se obtuvo a partir de las 144 h de cultivo y posteriormente cada 120 h, la biomasa se obtuvo por filtración. El pH de los ECE se midió por potenciometría.

Determinación de la actividad de lacasas

La actividad de lacasas se determinó en cada ECE, utilizando como sustrato 2,6-dimetoxifenol (DMP). La mezcla de reacción se realizó con 950 µL de DMP 2 mM en buffer de acetatos 0.1 M (pH de 4.5 y 5.5) y buffer de glicina-HCl (pH 3.5), se le agregó 50 µL de ECE. La actividad se determinó por incremento de la absorbancia a 468 nm de la mezcla de reacción a 40 °C durante 10 min. Una unidad de actividad (U) de lacasa se consideró como la cantidad de enzima que provoca un incremento de una unidad de absorbancia por minuto en la mezcla de reacción [6].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La cepa *Lentinula boryana* presentó actividad enzimática en los tres diferentes medios utilizados para su crecimiento, en los tres pH´s evaluados. La mayor actividad se observó en medio HIT a pH 4.5 (6683 U/L), mientras que a pH 3.5 fue de 3118 h/L (864 h) y a pH 5.5 de 3830 U/L. En general la actividad fue mayor en los últimos tiempos del cultivo (Figura 1).

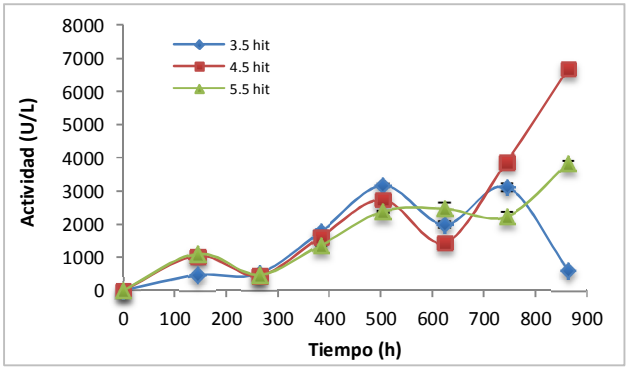


Figura 1. Actividad de lacasas a diferentes pH de *Lentinula boryana* crecido en medio HIT.

La máxima actividad de lacasas de *Lentinula boryana* crecido en el medio EM (Figura 2) fue de 456 U/L (144 h) a pH 5.5, a pH 4.5 fue de 647 U/L (264 h) y a pH 3.5 fue de 940 U/L (144 h). En este medio se observó la menor actividad. La máxima actividad en este medio se presentó antes a las 264 h de cultivo.

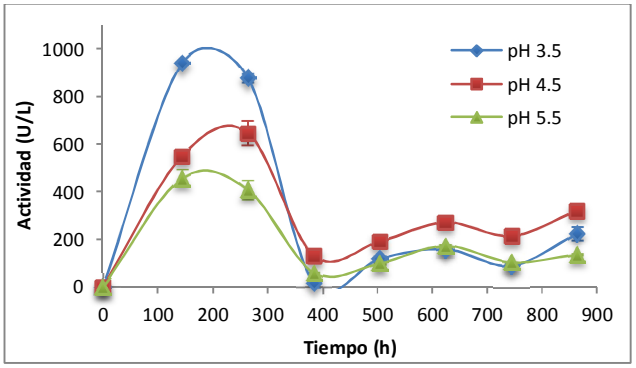


Figura 2. Actividad de lacasa a diferentes pH de *Lentinula boryana* crecido en medio EM.

La actividad de lacasas en medio DP (Figura 3) fue mayor a pH 4.5 (1474 U/L), a pH 3.5 fue de 959 U/L (264 h) y a pH 5.5 fue de 113 U/L (144 h). Al igual que en el medio EM, la máxima actividad se observó a las primeras horas de cultivo.

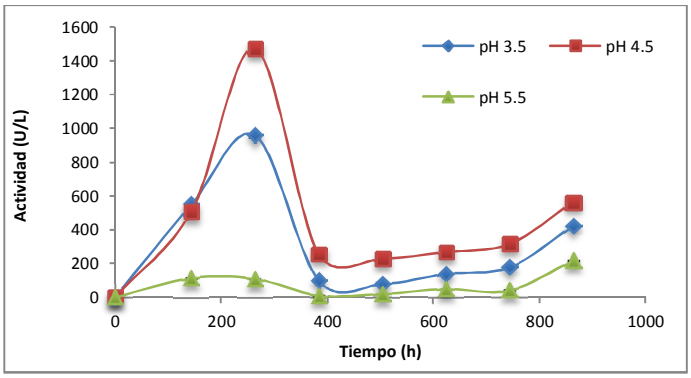


Figura 3. Actividad de lacasa a diferentes pH de *Lentinula boryana* crecido en medio DP.

Nagai *et al*. [6] reportaron la actividad de lacasas determinada con ABTS a pH de 4.0 de *Lentinula edodes*, mencionaron que fue proporcional al crecimiento micelial del cultivo, la actividad no se detectó antes de las 144 h y su actividad alcanzó casi el máximo (aproximadamente 1400 U/L) a las 288 h. Díaz *et al*. [7] crecieron *Pleurotus ostreatus* en medio líquido medio suplementado con sulfato de cobre y modificando el pH de crecimiento, siendo el pH 4.5 y 6.5 del medio de crecimiento los mejores para la producción de lacasas y el pH óptimo de la mezcla de reacción de cuantificación de lacasas fue 4.5. Se alcanzaron valores cercanos a los 75000 U/L. El pH de mezcla de reacción en este trabajo también fue el de 4.5. La actividad de *Lentinula boryana* se puede incrementar mediante la optimización del medio de cultivo y en presencia de inductores.

CONCLUSIÓN

El hongo nativo del estado de Morelos *Lentinula boryana* presenta actividad de lacasas sin presencia de inductores, pero presentó mayor actividad en medio HIT, por lo que la actividad se incrementará mediante la optimización del medio de cultivo

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a PRODEP por el financiamiento (Folio: UAEMOR-PTC-336).

REFERENCIAS

[1] Garibay, O.R., Martínez, R.M., Cifuentes, J. (2009). Disponibilidad de esporomas de hongos comestibles en los bosques de pino-encino de Ixtlán de Juárez, Oaxaca. Revista Mexicana de Biodivesidad, 80: 521-534.

[2] Martínez, A.T., Speranza, M., Ruíz, D.F., Ferreira, P., Camarero, S., Guillén, F., Martínez, M., Gutiérrez, A. (2005). Biodegradation of lignocellulosics: microbiological, chemical and enzymatic aspects of fungal attack to lignin. International Microbiology, 8: 195-204.

[3] Collins, P., Kotterman, J., Field, A., Dobson, D. (1996). Oxidation of anthracene and benzoapyrene by laccases from *Trametes versicolor.* Applied and Environmental Microbiology, 62: 4563-4567.

[4] Tzanov, T., Díaz, B., C. (2009). Dyeing properties, synthesis, isolation and characterization of an in situ generated phenolic pigment, covalently bound to cotton. Enzyme and Microbial Technology, 44: 380-385.

[5] Kunamneni, A., Plou, J.F., Ballesteros, A., Alcalde, M. (2008). Laccases and their Applications: A patent review. Recent patents on Biotechnology 2, 10-24.

[6] Nagai, M., Sato, T., Watanabe, H., Saito, K., Kawata, M., Enei, H. (2002). Purification and characterization of an extracellular laccase from the edible mushroom *Lentinula edodes*, and decolorization of chemically different dyes. Applied Microbiology and Biotechnology, 60 (3), 327-335

[7] Díaz, R., Téllez-Téllez, M., Sánchez, C., Bibbins-Martínez, M. D., Díaz-Godínez, G., Soriano-Santos, J. (2013). Influence of initial pH of the growing medium on the activity, production and genes expression profiles of laccase of *Pleurotus ostreatus* in submerged fermentations. Electronic Journal of Biotechnology, (16): 1-13.

EVALUATION OF LACCASE ACTIVITY OF *Pycnoporus sanguineus* GROWN IN SOLID AND LIQUID CULTURES

(Evaluación de la actividad de lacasas de *Pycnoporus sanguineus* crecido en cultivo sólido y líquido)

Marlen Mendoza-García[a,b], Rosa Mariela Hernández-Nava[a,b] ,Gerardo Díaz-Godínez[c], Elba Cristina Villegas-Villarreal[d], Ma de Lourdes Acosta Urdapilleta[a], Maura Téllez-Téllez[a*+]

[a] Centro de Investigaciones Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
[b] Facultad de Ciencias Biológicas-UAEM.
[c] Centro de Investigaciones en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala.
[d] Centro de Investigaciones en Biotecnología-UAEM.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: maura.tellez@uaem.mx

Área del Conocimiento: Fermentaciones

ABSTRACT
The white-rot fungi of the genus *Pycnoporus* grow wild in tropical and subtropical environments, over fallen logs and even on burned logs. This genus is distinguished because of its bright red-orange color. They have been studied mainly by their ability to degrade lignin using enzyme complexes (laccases, peroxidases and hydrolases). Genus *Pycnoporus*, has antimicrobial properties to Gram-positive and Gram-negative, anti-tumor and anti-viral properties, so that presents biomolecules with potential uses in biotechnology. In this work, laccases activity of *Pycnoporus sanguineus* grown in solid-state and liquid fermentations using a medium without inducer was determined. *Pycnoporus sanguineus* is a white-rot fungus, so it is a potential enzymes producer and has a constitutive level of laccase activity. For solid-state cultures, Erlenmeyer flasks (250 mL) with 15 mL of liquid medium (potato-dextrose broth) and 0.5 g of polyurethane foam (PUF, cubes of 0.5 cm per side) were used. For liquid cultures, Erlenmeyer flasks (125 mL) with 50 mL of liquid medium were used. Each flask was inoculated with three mycelium pellets (4 mm de diam) from periphery of a colony obtained at 22 °C for 7 days. The fermentations were incubated at 22°C (for the liquid cultures an orbital shaker at 120 rpm was used). The enzymatic extracts from solid cultures were obtained by soft press of PUF and from liquid cultures were obtained by broth filtration. Laccase activity was measured using 2,6-dimethoxyphenol by absorbance changes at 468 nm. The reaction mixture was heated at 40 °C during 10 min. Laccase activity was observed at constitutive level in both fermentation systems. There was greater laccase activity in solid culture (21358 U/L to 312 h) compared with the liquid (2081 U/L at 240 h).

Keywords: Laccases, liquid culture, *Pycnoporus sanguineus*, solid culture.

RESUMEN
Los hongos de pudrición blanca del género *Pycnoporus* crecen en forma silvestre en ambientes tropicales y subtropicales, sobre troncos caídos e incluso en los troncos quemados. Este género se distingue por su brillante color rojo-naranja. Se han estudiado principalmente por su capacidad para degradar la lignina usando un complejo enzimáticos (lacasas, peroxidasas y hidrolasas). Género

Pycnoporus, tiene propiedades antimicrobianas a Gram-positivas y Gram-negativas, anti-tumorales y propiedades antivirales, por lo que presenta biomoléculas con usos potenciales en biotecnología. En este trabajo se determinó la actividad lacasas de *Pycnoporus sanguineus* crecido en fermentación sólido y líquido utilizando un medio sin inductor. *Pycnoporus sanguineus* es un hongo de podredumbre blanca, por lo que es un potencial productor de enzimas y tiene un nivel constitutivo de la actividad lacasa. Para los cultivos sólidos se realizó en matraces Erlenmeyer (250 mL) con 15 mL de medio líquido (caldo de dextrosa papa) y 0.5 g de espuma de poliuretano (PUF, cubos de 0.5 cm por lado) se utilizaron. Para los cultivos líquidos se utilizaron matraces Erlenmeyer (125 mL) con 50 mL de medio líquido. Cada matraz se inoculó con tres fragmentos de micelio (4 mm de diam) de la periferia de una colonia obtenida a 22 °C durante 7 días. Las fermentaciones se incubaron a 22 °C (para los cultivos líquidos se utilizó un agitador orbital a 120 rpm). Los extractos enzimáticos del cultivo sólido se obtuvieron por el prensado suave del PUF y de cultivos líquidos se obtuvieron por filtración. Actividad de la lacasa se midió utilizando 2,6-dimetoxifenol por los cambios de absorbancia a 468 nm. La mezcla de reacción se calentó a 40 °C durante 10 min. Actividad de la lacasa a nivel constitutivo se observó en ambos sistemas de fermentación. Hubo una mayor actividad lacasa en cultivo sólido (21358 U/L a 312 h) en comparación con el líquido (2.081 U/L a 240 h).

Palabras Clave: Lacasas, cultivo líquido, cultivo sólido, *Pycnoporus sanguineus*.

INTRODUCCIÓN

Los hongos constituyen un grupo diverso y con amplio número de especies en ambientes terrestres después de los insectos, debido a su amplia distribución y asociación con diversos sustratos orgánicos e inorgánicos, encontrándose prácticamente en todos los ecosistemas [1]. Son considerados recicladores naturales debido a que utilizan un complejo enzimático que pueden degradar diversos sustratos y convertirlos en recursos para su sobrevivencia [2]. Entre los hongos degradadores se encuentra el género *Pycnoporus*. Este género ha sido estudiado principalmente por su capacidad para degradar lignina. Se encuentra ampliamente distribuido en diferentes estados de la República Mexicana [3], creciendo de manera silvestre en ambientes tropicales y subtropicales, sobre sustratos tan diversos como troncos de encino, eucalipto, caucho, e incluso sobre troncos quemados [4]. *Pycnoporus sanguineus* es capaz de secretar diversas enzimas extracelulares, entre ellas invertasas, tirosinasas, α-amilasas, β-glucosidasas, xilanasas, lignina peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP), exo-poligalacturonasa y lacasas [5]. Se han utilizado cepas de *Pycnoporus sanguineus* provenientes de distintas regiones del mundo para la caracterización de varias isoformas de lacasas en medios de extracto de malta [6] medio mínimo [7], melazas diluidas [8], en un medio líquido utilizando como inductores a los colorantes [9]. Se han aislado dos isoenzimas termoestables de lacasas, con pesos moleculares de 80 kDa y 68 kDa, y con actividad a pH 4 [10], degradan colorantes textiles y compuestos poliaromáticos como antraquinona [11], fenantreno, antraceno y pireno [12]. En este trabajo se determinó la actividad de lacasas de *Pycnoporus sanguineus* crecido en fermentación sólida usando espuma de poliuretano como soporte y en fermentación líquida usando un medio sin inductor

METODOLOGÍA

Organismo de estudio

Se usó la cepa de *P. sanguineus* (HEMIM-80). Para la conservación y crecimiento de la cepa se empleó medio Agar Papa Dextrosa (PDA), crecida por 8 días a 25°C.

Fermentación sólida y líquida

El cultivo sólido se realizó en matraces Erlenmeyer de 250 mL, cada matraz contenía 15 mL del medio de cultivo (Caldo dextrosa papa, DIFCO), embebidos en 0.5 g de espuma de poliuretano (PUF) de baja densidad (17 kg/m3) cortada en cubos (0.5 cm por lado), previamente lavados y esterilizados [13] y se incubaron a 25 °C. El cultivo líquido se realizó en matraces Erlenmeyer de 150 mL. Cada matraz contenía 50 mL del medio de cultivo. Se inoculó cada matraz con tres fragmentos de micelio de aproximadamente 4 mm de diámetro tomados de la periferia de una colonia del organismo. Se incubó a 25 °C a 120 rpm.

Obtención del extracto crudo enzimático

El extracto crudo enzimático (ECE) del cultivo sólido se obtuvo por presión suave de la espuma de poliuretano a través de una jeringa de 50 mL. El ECE del cultivo líquido se obtuvo por filtración del medio de cultivo sobre el cual creció el micelio del organismo. Posteriormente se filtraron y se midió el pH con un potenciómetro.

Determinación de enzimas lacasas

Se utilizó como sustrato 2,6-dimetoxifenol (DMP). La mezcla de reacción contenía 950 µL de DMP 2 mM en buffer de fosfatos 0.1 M y pH 4.5 con 50 µL ECE. Se incubó a 40 °C durante un minuto y medio, posteriormente se leyó la absorbancia a 468 nm.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Hubo menos producción de biomasa en el cultivo líquido (2.5 g/L) comparado con el sólido (6 g/L) (Figura 1a y 2a). En general los dos cultivos mostraron casi el 80 % del consumo de la fuente de carbono (Figura 1b y 2b) y con respecto a la actividad de lacasas hubo mayor actividad en el cultivo sólido a las 312 h presentó 21558 U/L (Figura 2c), comparado con el líquido que presentó 2081 U/L (240 h) (Figura 1c). La menor actividad en el cultivo líquido fue las primeras horas de cultivo a las 72 h presentó 684 U/L.

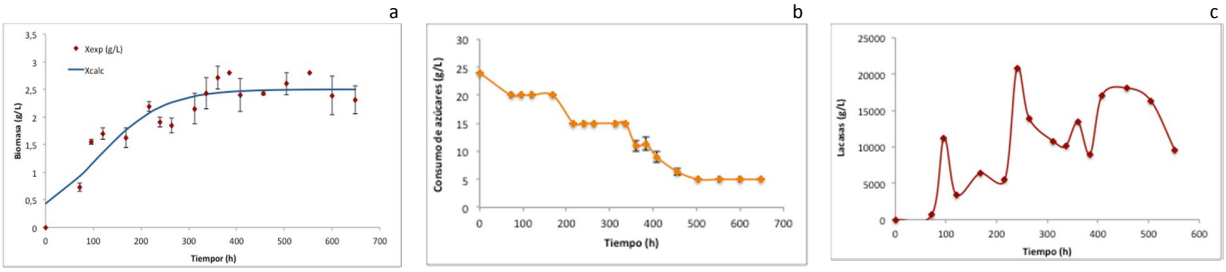


Figura 1. Cultivo líquido de *Pycnoporus sanguineus.* Producción de biomasa (a), consumo de fuente de carbono (b) y actividad de lacasas (c).

En el cultivo sólido a las 72 h presentó 1617 U/L de actividad, sin embargo se incremento la actividad conforme pasaron los dias de cultivo, a las 168 h se tenian 19715 U/L. El pH inicial del medio de cultivo es de 5.1, a las 72 h el pH baja aproximadamente a 4.4 y se mantiene alrededor de ese valor en ambas fermentaciones. El cultivo sólido tuvo 5 g/L de azucares residuales aproximadamente a las 300 h (Figura 2a), sin embargo en el cultivo líquido hasta las 400 h aproximadamente se obtiene esos valores de azucares residuales, probablemente el medio sólido es un sistemas eficaz para este organismo.

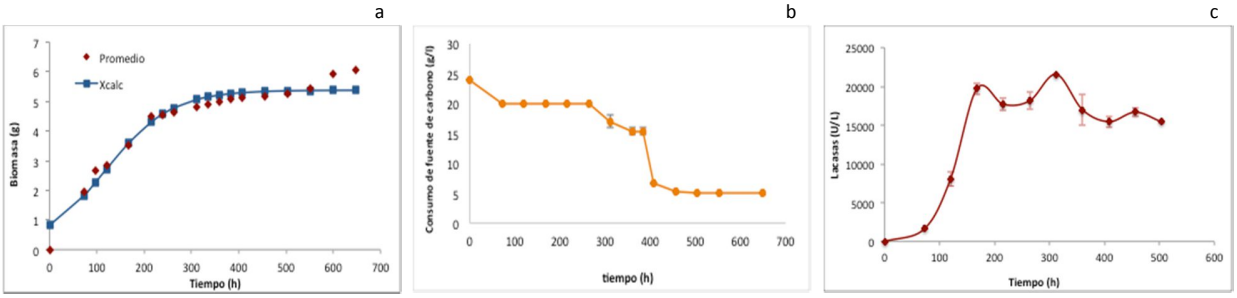


Figura 2. Cultivo sólido de *Pycnoporus sanguineus* Producción de biomasa (a), consumo de fuente de carbono (b) y actividad de lacasas (c).

La mayoría de los trabajos sobre producción de lacasasa reportan el uso de inductores, Trovaslet *et al*. [8] crecieron a *Pycnoporus sanguineus* (cepa China) en presencia de sulfato de cobre (0.002 g/L) como inductor, incubado a 28 °C a 150 rpm, reportaron 5120 U/L de actividad de lacasa. Lu et al. [7] crecieron a *Pycnoporus sanguineus* en cultivo líquido con extracto de malta y usando inductores como tween, xilidina y sulfato de cobre (0.01 mg/L) a 28 °C con 140 rpm, observaron que a las 72 h de incubación tenia 8600 U/L. Alves *et. al*. [10] crecieron a *Pycnoporus cinnabarinus* utilizando colorantes: azul de bromofenol, verde de malaquita, para inducir la producción de lacasa y decolorar estos compuestos, a los 7 días, en ambos casos, obtuvieron 1400 U/L de actividad de lacasa, con un 20% de decoloración en todos los casos. Acosta-Urdapilleta *et al*. [14] crecieron sobre aserrin de pino, cedro y roble a *Pycnoporus sangineus* (HEMIM-51), reportando que el asserin de pino fue el mejor sustrato para la producción de enzimas lacasas (1800 U/L), para el cultivo líquido al 3% de bran flakes se obtuvó un máximo de 6000 U/L a los 14 días de cultivo a 20°C. Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que la actividad se podrá incrementar utilizando inductores, o modificando condiciones de cultivo (temperatura, pH y agitación).

CONCLUSIONES

Se observó actividad de lacasas de manera constitutiva en ambos sistemas de fermentación, siendo los valores muy parecidos pero en cultivo líquido la actividad se detectó en menor tiempo.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a PRODEP por el financiamiento (Folio: UAEMOR-PTC-336).

REFERENCIAS

[1] Betancur, M. A., Calderón, H, M., Betancour, O., Sucerquia, G, A. (2007). Hongos macromicetes en dos relictos de bosque húmedo tropical montano bajo de la vereda la Cuchilla, Marmato, Caldas. Boletín Científico del Museo de Historia Natural de la Universidad de Caldas, (11): 19-31.

[2] Stamets, P. (2005). Mycelium running: how mushrooms can help save the world. California, Ten Speed Press.

[3] Lomascolo, A., Uzan-Boukhris, E., Herpoël-Gimbert, I., Sigoillot, J. C., & Lesage-Meessen, L. (2011). Peculiarities of *Pycnoporus* species for applications in biotechnology application. Microbiology of Biotechnology, (92): 1129-1149.

[4] Pérez-Silva, E., Aguirre, A.E., Pérez, A.C. (1988). Aspectos sobre el uso y la distribución de *Pycnoporus sanguineus* Polyporaceae en México. Revista Mexicana de Micología, 137-144.

[5] Esposito, E., Innocentini-Mei, L.H., Ferraz, A., Canhos, V.P., Duran, N. (1993). Phenoloxidases and hydrolases from *Pycnoporus sanguineus* (UEC-2050 strain): applications. Journal of Biotechnology (29): 219-228.

[6] García, T.A., Fontes S.C., Ulhoa, J. (2007). Studies on the *Pycnoporus sanguineus* CCT-4518 laccase purified by hydrophobic interaction chromatography. Applied Microbiology and Biotechnology (75): 311-318.

[7] Lu, L., Zhao, M., Zhang, B.B., Yu, S.Y., Bian, X.J., Wang, W., Wang, Y. (2007). Purification and characterization of laccase from *Pycnoporus sanguineus* and decolorization of an anthraquinone dye by the enzyme. Applied Microbiology and Biotechnology (74): 1232-1239.

[8] Trovaslet, M., Enaud, E., Guiavarch, Y., Corbisier, A.M., Vanhulle, S. (2007). Potential of a *Pycnoporus sanguineus* laccase in bioremediation of wastewater and kinetic activation in the presence of an anthraquinonic acid dye. Enzyme and Microbial Technology (41): 368-376.

[9] Pointing, S.B., Vrijmoed, L.L.P. (2000). Decolorization of azo and tiphenylmethane dyes by *Pycnoporus sanguineus* producing laccase as the sole phenoloxidase. World Journal of Microbiology and Biotechnology (16): 317-318.

[10] Alves, A.M., Record, E., Lomascolo, A., Scholtmeijer, K., Asther, M., Wessels, J.G., Wösten, H.A. (2004). Highly efficient production of laccase by the basidiomycete *Pycnoporus cinnabarinus.* Applied and Environmental Microbiology (70): 6379-6384.

[11] Trovaslet, M., Enaud, E., Guiavarc'h, Y., Corbisier, A.M., Vanhulle, S. (2007). Potential of a *Pycnoporus sanguineus* laccase in bioremediation of wastewater and kinetic activation in the presence of an anthraquinonic acid dye. Enzyme and Microbial Technology (41): 368-376.

[12] Vikineswary, S., Abdullah, N., Renuvathani, M., Sekaran, M., Pandey, A., Jones E.B.G. (2006). Productivity of laccase in solid substrate fermentation of selected agroresidues by *Pycnoporus sanguineus.* Bioresource Technology (97): 171-177.

[13] Díaz-Godínez, G., Soriano-Santos, J., Augur, C., Viniegra-González, G. (2001). Exopectinases produced by *Aspergillus niger* in solid state and submerged fermentation: a comparative study. Journal Industrial Microbiology and Biotechnology. (26): 271-275.

[14] Acosta-Urdapilleta, L., Medrano-Vega, F., Alonso, A., Villegas, E. (2007). *Pycnoporus sanguineus,* cultivation on industrial residues pine, oak and cedar sawdust. In Hacia un Desarrollo Sostenible del Sistema de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el Siglo XXI. Eds. D. Martínez-Carrera, N. Curvetto, M. Sobal, P. Morales y V. M. Mora. Capítulo 14, pp. 189-220.

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF THE SECRETABLE GOX ENZYME FROM Ed8 STRAIN OF *A. tubingensis*

(Purificación y caracterización de la enzima GOX secretable de la cepa Ed8 de *A. tubingensis*)

Oscar Abraham Flores Amaro[*a], Pamela Romo Rodríguez[a], Alma Rosa Corrales Escobosa[b], Kazimierz Wrobel[b], Katarzyna Wrobel[b], Julio Cesar Villagómez Castro[a], J. Félix Gutiérrez Corona [a+]

[a]Departmamento de Biología, Universidad de Guanajuato, México
[b]Departamento de Química, División de Ciencias Naturales y Exacta, Universidad de Guanajuato, México

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: xilefgu@gmail.com

Área de Conocimiento: Fermentaciones.

ABSTRACT
Previous studies have shown that Ed8 strain of *Aspergillus niger var. tubingensis* has the capability to produce high levels of GOX activity in the extracellular space when cultured in medium with low or high glucose concentration, compared with the reference strains NRRL593 of *Aspergillus tubingensis* and FGSCA732 of *Aspergillus niger*; it was observed that the presence of citric acid (45 mM) in the growth medium increased the level of secretable GOX activity in all strains. It was also observed that these differences in GOX activity among the strains are not due to differences in the transcription of *gox*C or *gox*2 genes. In the present work we describe the purification and characterization of the extracellular GOX enzyme from Ed8 strain. The extracellular GOX enzyme activity from Ed8 was purified from concentrates of the spent medium by a combination of chromatographic methods (ion exchange and molecular exclusion). The purified GOX enzyme from Ed8 was compared with the purified commercial GOX enzyme from *Aspergillus niger* analyzing different parameters, such as kinetic properties, effect of pH, buffer, temperature and metal ions, as well as the stability of the enzyme activity.The results showed that the purified GOX from Ed8 is more thermostable, it has a higher affinity for glucose and a higher reaction rate, as compared to the commercial GOX enzyme. Finally, proteomic analysis by HPLC-ESI-QTOF of the spent medium of strain Ed8 allowed identification of the GOX enzyme secreted by the strain as the GOXC protein, as previously described in *A. niger*.

Keywords: Ed8 strain, *Aspergillus tubingensis*, secretable GOX activity.

RESUMEN
Previos estudios han mostrado que la cepa Ed8 de *Aspergillus niger var. tubingensis* tiene la capacidad de producir niveles elevados de actividad enzimática GOX en el espacio extracelular cuando es cultivada en medios con bajas o altas concentraciones de glucosa, comparada con las cepas de referencia NRRL593 de *Aspergillus tubingensis* y FGSCA732 de *Aspergillus niger,* se observó que en presencia de ácido cítrico (45 mM) en el medio de cultivo incrementa los niveles de actividad GOX secretable en todas las cepas. Además, se ha observado que estas diferencias en la actividad GOX entre las cepas no se debe a diferencias en el nivel de transcrito de los genes *goxC* o *gox2.* En el presente trabajo describimos la purificación y caracterización de la enzima GOX extracelular de la cepa Ed8. La actividad enzimática GOX extracelular de la cepa Ed8 fue purificada de concentrados de medios gastados por una combinación de

métodos cromatográficos (intercambio iónico y exclusión molecular). La enzima GOX purificada de Ed8 fue comparada con la enzima GOX purificada de origen comercial de *Aspergillus niger* analizando diferentes parámetros, como propiedades cinéticas, efecto del pH, buffer, temperatura y iones metálicos, así como la estabilidad de la actividad enzimática. Los resultados muestran que la enzima GOX purificada de Ed8 es más termoestable y tiene una alta afinidad por la glucosa y una mayor velocidad de reacción, comparando con la enzima GOX comercial. Finalmente, el análisis proteómico por HPLC-ESI-QTOF del medio gastado de la cepa Ed8 arroja la identificación de la enzima secretada GOX es la proteína GOXC, previamente descrita en *A. niger.*

Palabras Clave: Cepa Ed8, *Aspergillus tubingensis,* actividad GOX secretrable.

INTRODUCCIÓN

En el grupo de investigación se ha realizado el aislamiento y la caracterización de cepas fúngicas nativas de sitios contaminados con Cr(VI), con el interés de elucidar los mecanismos implicados en su interacción con el ion, así como indagar sobre las posibles aplicaciones biotecnológicas de dichas interacciones [1,3,4]. Entre los microorganismos aislados de dichos sitios, la cepa Ed8 del hongo filamentoso *Aspergillus niger* var. *tubingensis* ha sido estudiada con más detalle, debido a que es tolerante a Cr(VI) y posee la capacidad de reducirlo a Cr(III) [1]; En estos estudios se ha encontrado que el proceso de reducción ocurre con una acumulación mínima de cromo en la biomasa, de menos del 1%, lo que se ha propuesto como una indicación de que la reducción de Cr(VI) ocurre en el medio extracelular [1].Estudios adicionales mostraron que la cepa Ed8 muestra estimulación en su capacidad de reducción de Cr(VI) cuando se cultiva en medio con citrato y otros ácidos orgánicos [3]; se demostró que, al menos en los cultivos con citrato, este ácido causa un incremento en la velocidad de transformación de Cr(VI) a Cr(III) [1].
En un estudio reciente se analizó la capacidad de reducción de Cr(VI) de la cepa Ed8 comparándola con las cepas de referencia FGSC322 de *A. niger* y NRRL593 de *A. tubingensis*, observándose que la cepa Ed8 muestra claramente una mayor eficiencia para realizar dicho proceso [8]. Por ello, con el propósito de encontrar correlatos bioquímicos a esta capacidad diferencial de reducción de Cr(VI) de la cepa Ed8, se analizó en ésta y en las cepas de referencia de *A. niger* y *A. tubingensis*, los niveles de la actividad secretable GOX, misma que en estudios previos con *A. niger* se ha mostrado que se secreta al medio extracelular [2]; los estudios realizados mostraron que tanto en colonias desarrolladas en medio sólido como en concentrados del medio de crecimiento la cepa Ed8 muestra apreciablemente mayor actividad GOX que las cepas de colección NRRL593 de *A. tubingensis* y FGSC322 de *A. niger* [8]*;* adicionalmente, en estos estudios se encontró que los concentrados del medio de crecimiento de la cepa Ed8, pero no los de las cepas de referencia mencionadas, causaban la disminución de Cr(VI) de una forma dependiente de glucosa. Finalmente, se demostró que la enzima GOX purificada de origen comercial de *A. niger* es capaz de producir la disminución de Cr(VI) y la aparición de Cr(III) [8].

En conjunto, todos estos datos indicaron que la actividad GOX secretable forma parte de la maquinaria bioquímica para la reducción de Cr(VI) por cepas de *Aspergillus*.

METODOLOGÍA

Determinación de la actividad GOX extracelular

Esta determinación se realizó para cuantificar la actividad enzimática GOX de la actividad de glucosa oxidasa de cada cepa en el medio extracelular. La determinación de la referida actividad enzimática en estas muestras se realizó con el método de ABTS (sigma; sal de 2,2'-Azino-bis (3-etilbenzotaizolina-6-ácido sulfonico) diamonio) (recuperado de Rodríguez Reyes [7])

Determinación de proteína

La cuantificación de proteína se realizó por el Método de Lowry [6], el cual es un método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas.

Purificación de la enzima GOX de la cepa ambiental Ed8 de *A. tubingensis*

Con las condiciones óptimas del medio de cultivo para obtener una alta actividad enzimática se inocularon $5x10^5$ conidias/mL de la cepa Ed8 en 1 litro. El sobrenadante se sometió a una ultrafiltación por Amicon de 30 kDa hasta llegar a un volumen de 7 mL de concentrado. Posteriormente, el concentrado se eluyó por una columna de Biogel P6 de 30 mL, para después aplicar por una columna de intercambio iónico (DEAE sefarosa) y posteriormente en una columna exclusión molecular (Sephacryl S200HR).

Ensayos de caracterización de la enzima GOX de la cepa Ed8 y la enzima GOX comercial de *A. niger*

Se realizaron ensayos de caracterización de la enzima GOX purificada de la cepa ambiental Ed8 de *Aspergillus niger* var. *tubingensis* y de la enzima GOX comercial de *A. niger*, analizando el efecto de diferentes factores y varios parámetros cinéticos y biofísicos sobre la actividad enzimática, con el fin de hacer un estudio comparativo entre ambas enzimas. Los parámetros evaluados fueron efecto de pH, temperatura, iones metálicos, ácido cítrico, estabilidad y concentración de sustrato. La identidad de la enzima GOX de Ed8 se obtuvo por HPLC–ESI-Q-TOF-MS los resultados arrojados fueron analizados en la base de datos MASCOT.

Ensayos de reducción de Cr (VI) con la enzima GOXC purificada de la cepa Ed8

Se determinó la concentración de Cr (VI) espectrofotométricamente utilizando el procedimiento que emplea difenilcarbazida [5].

RESULTADOS

Proteína secretada y actividad enzimática GOX en el medio extracelular de las cepas Ed8 de *A. niger var tubingensis* y las cepas de referencia NRRL593 de *A. tubingensis* y FGSCA732 de *A. niger*

Los resultados de la proteína secretada en el medio extracelular, se muestran en la Figura 1. Se observa que a bajas concentraciones de glucosa (0.25% y 2%) la secreción de proteína fue baja, y al añadirle ácido cítrico en estas mismas concentraciones aumento los niveles de proteína extracelular. Teniendo en cuenta esta observación se repitió el experimento con mayores concentraciones de glucosa (3.5% y 5%) en presencia de ácido cítrico y hubo mayor producción de proteína extracelular, siendo las cepas Ed8 y la de colección NRRL593 las que más secretaban proteína en el medio extracelular en todos los

casos. proponiendo que esto se debe al efecto de protección que tiene en ácido cítrico sobre las proteínas contra la actividad de las metaloproteasas que pudieran causar degradación proteica.

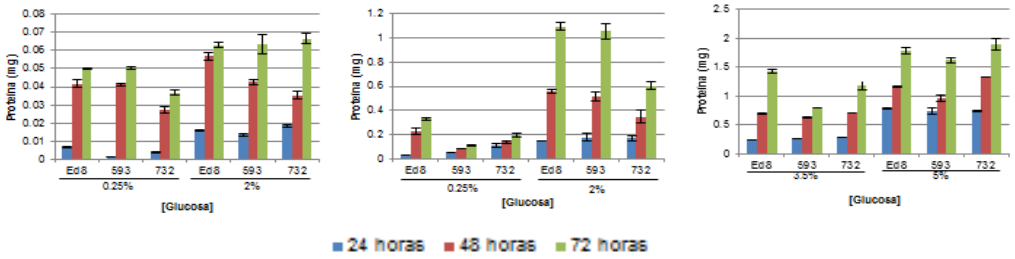


Figura 1. Producción de proteína de las cepas Ed8, NRRL593 y FGSCA732 a diferentes concentraciones de glucosa en ausencia o presencia de citrato.

En la Figura 2, se muestra la actividad específica GOX en el medio extracelular para la cepa Ed8, NRRL593 y FGSCA732, la mayor actividad enzimática GOX se presenta en la cepa Ed8 a un tiempo de incubación de 48 horas, mientras que para la cepa NRRL593 presentó actividad enzimática GOX menor a la cepa Ed8 pero valores más altos que la cepa FGSCA732. Por otra parte, es clara la observación que para las tres cepas la actividad enzimática va disminuyendo conforme avanza el tiempo de incubación. Cabe resaltar que en todas las concentraciones de glucosa probadas la cepa Ed8 produjo una mayor actividad específica GOX. Entonces las condiciones óptimas para una mayor producción de actividad GOX enzimática son medios de cultivo Lee con 5% de glucosa y suplementado con 45 mM de ácido cítrico, con un tiempo de incubación de 48 horas.

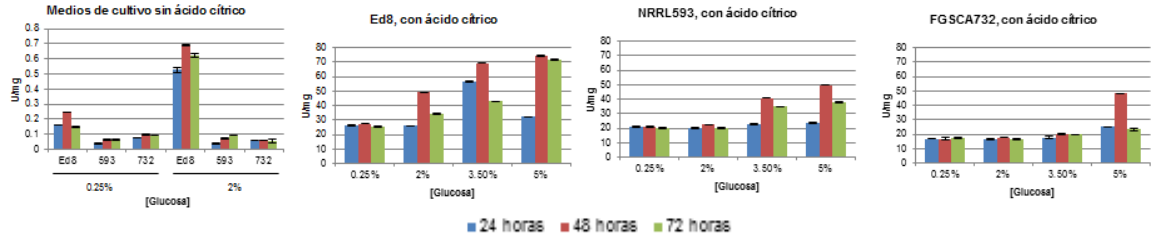


Figura 2. Actividad específica GOX secretable de las cepas Ed8, NRRL593 y FGSCA732, a diferentes concentraciones de glucosa en ausencia y presencia de ácio cítrico.

Identificación de la enzima GOX de la cepa Ed8

Las secuencias de aminoácidos presentes en los péptidos encontrados en la enzima GOX de la cepa Ed8 se utilizaron para buscar mediante análisis tipo Blast secuencias relacionadas en las proteínas de la base de datos MASCOT, y en la base de datos del genoma de *A. niger* en todos los casos los péptidos derivados de la cepa Ed8 alinearon perfectamente con regiones de la proteína GOXC, la cual ya ha sido demostrada como una proteína secretable en A. niger. Esto permite identificar a la proteína GOX secretable de la cepa Ed8 como la proteína GOXC.

Purificación de la enzima GOX de la cepa ambiental Ed8 de *A. tubingensis*

Se eluyó la muestra ultrafiltrada por una columna de intercambio iónico (DEAE-sepharose) observando un pico de actividad dentro de una concentración de 0.25 M de un gradiente discontinuo de NaCl (Figura 3A). Las fracciones que presentaban actividad enzimática GOX provenientes de esta columna, se aplicaron a una columna de exclusión molecular (Sephacryl S200HR), se obtuvo un pico de actividad enzimática en el perfil de elución como se muestra en la Figura 3B, se observa un pico de proteína fuera del pico de actividad enzimática el cual nos indica que la proteína esta pura (se verificó con un gel de poliacrilamida SDS-Page en condiciones desnaturalizantes, datos no mostrados), teniendo una purificación de la enzima GOX de Ed8 de 7 veces con un 36,4% de rendimiento.

A) B)

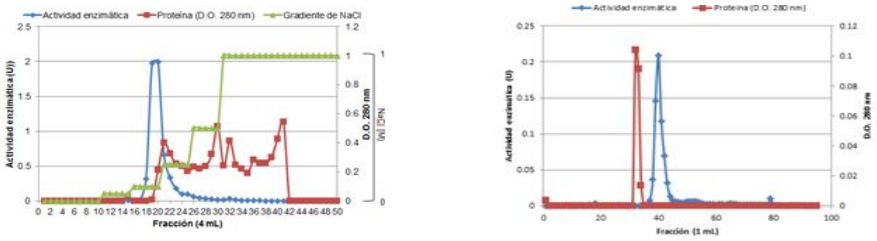


Figura 3. Perfil de elución de en la columna de intercambio iónico (DEAE-Sepharose) y de exclusión molecular (Sephacryl S200-HR).

Caracterización de la enzima GOX pura de la cepa Ed8 de *Aspergillus niger var tubingensis*

Efecto del pH y regulador sobre la actividad GOX

Se midió el efecto de pH y regulador sobre la actividad GOX de la cepa Ed8 y la de origen comercial de *A. niger*, teniendo que ambas enzimas presentaban una actividad más alta en un regulador de citrato-fosfato a un pH de 6.3. Por lo que se decidió que para los ensayos posteriores se utilizaría el regulador y pH mencionado.

Efecto de la temperatura sobre la actividad GOX

Sabiendo cual era el regulador y pH óptimos para la actividad enzimática, se realizó el efecto de la temperatura sobre la actividad GOX, poniendo la enzima a diferentes temperaturas, donde la temperatura óptima tanto para la GOX de Ed8 como para la GOX comercial fue de 37°C, sin embargo la GOX de Ed8 pierde un 15% y un 64% de su actividad a 45 y 60 °C respectivamente, mientras que la GOX comercial pierde un 75 y 100% a los 45 y 60°C respectivamente. Estas observaciones indican que la actividad catalítica de la enzima GOX de Ed8 es más tolerante a la temperatura que la enzima GOX comercial de *A. niger.*

Efecto de iones metálicos sobre la actividad GOX

Para ver si los iones metálicos tenían efecto sobre la actividad GOX, se puso en contacto las enzimas con diferentes sales metálicas; la GOX de Ed8 no se ve afectada por la presencia de sales de calcio, magnesio y bajas concentraciones de cobalto; se ve diferencialmente afectada negativamente por la presencia de sales de cobre, fierro y altas concentraciones de cobalto; fue fuertemente inhibida por la presencia de

sales de mercurio y manganeso. Por otra parte la actividad de la GOX comercial de *A. niger* no se ve afectada por la presencia de sales de magnesio; diferencialmente afectada negativamente por la presencia de cobalto; y fuertemente inhibida por la presencia de manganeso, calcio, cobre, fierro y mercurio.

Efecto del ácido cítrico sobre la actividad GOX

Con el objetivo de ver si la adición de ácido cítrico en la enzima pura tenía un efecto sobre la actividad enzimática GOX, la actividad GOX de Ed8 como la comercial se estimulan por la presencia del compuesto, siendo óptimo el efecto estimulatorio a la concentración más baja probada del ácido cítrico (15 mM); se observó una menor estimulación de la actividad GOX de ambas enzimas en presencia de 30 mM de ácido cítrico y no efecto o ligera inhibición a mayores concentraciones.

Efecto de la estabilidad sobre la actividad GOX

Basándose en la actividad óptima que se determinó anteriormente la cual fue de 37 °C, se hizo ensayos de estabilidad por un periodo de 24 horas; y se observó que la GOX de Ed8 es estable hasta las 24 horas (incluso muestra ligero incremento en la actividad), mientas que la GOX comercial de A. niger va perdiendo su actividad conforme transcurre el tiempo de incubación; así, a las 24 horas de incubación esta enzima ha perdido alrededor del 51 % de su actividad.

Determinación de los parámetros cinéticos de la enzima GOX pura

Se determinaron los parámetros cinéticos de las enzimas, variando la concentración de sustrato, obteniendo una cinética de tipo Michaeliano, y se calculó la Km, Vmáx y Kcat de ambas enzimas (Tabla 1). Observándose con estos resultados que la GOX de Ed8 tiene una mayor afinidad al sustrato y una velocidad de reacción mayor que la GOX comercial de *A. niger.*

Tabla 1. Parámetros cinéticos calculados de la enzima pura de Ed8 y de *A. niger*

Parámetro	GOX de Ed8	GOX comercial de *A. niger*
Km (mM)	14.71	36.94
Vmax (M/s)	4863.81	4411.11
Kcat (s^{-1})	330.64	119.41

Parámetros cinéticos determinados de la enzima GOX pura de la cepa Ed8 y de la enzima GOX pura comercial de *A. niger* obtenidos a partir de una variación de concentración de sustrato (glucosa).

Ensayo de reducción de Cr (VI) con la enzima GOX de Ed8 purificada

En presencia de su sustrato la enzima GOX de Ed8 reduce alrededor del 50% del Cr (VI) presente en la mezcla de reacción; también, se observó que cuando el sustrato está ausente no hay reducción de cromo; y en presencia de un inhibidor como Hg, e independientemente de la adición de glucosa, la enzima se inactiva y por lo tanto no hay reducción de Cr (VI). Estas observaciones indican que al igual

que la enzima GOX de *A. niger*, la enzima GOX de Ed8 posee la capacidad de causar la reducción de Cr (VI).

CONCLUSIONES

- En las cepas Ed8, NRRL593 y FGSCA732, la producción de proteína y actividad extracelular aumenta en los medios de cultivo con altos niveles de glucosa como fuente de carbono (> 2%).
- El análisis de las proteínas extracelulares de la cepa Ed8 por HPLC-ESI-QTOF arroja la identificación de la enzima GOX como la proteína GOXC.
- La enzima GOXC de la cepa Ed8 fue purificada 7 veces con un rendimiento del 36.4%.
- Un estudio muestra que la enzima GOXC de Ed8 tiene una mayor afinidad por el sustrato y una velocidad de reacción mayor que la enzima GOXC comercial de *A. niger*.
- La enzima GOXC de Ed8 tiene la capacidad de tolerar temperaturas más altas que la óptima, y tiene una estabilidad hasta por 24 horas a 37°C.
- La enzima GOXC pura de Ed8 tiene la capacidad de reducir el Cr (VI) es una reacción dependiente de glucosa.

AGRADECIMIENTOS

- Consejo Nacional De Ciencia Y Tecnología (CONACYT)
- Universidad de Guanajuato
  - Departamento de Biología
  - Departamento de Química
  - Laboratorio de Genética y Bioquímica de Microorganismos
  - Laboratorio de Glicobiología de Hongos y Protozooarios

REFERENCIAS

[1] Acevedo-Aguilar, F.J., Espino-Saldaña, A.E., León-Rodríguez, I.L., Rivera-Cano, M.E., Ávila-Rodríguez, M., Wrobel, K., Lappe, P., Ulloa, M., y Gutiérrez-Corona J.F.(2006). Hexavalent Chromium renoval in Vitro and from industrial wastes, using chromate-resistant strains of filamentous fungi indigenous to contaminated wastes. Canadian. Journal of Microbiology 52:809-15.

[2] Clarke, K. G., Johnstone-Robertson, M., Price, B., & Harrison, S. T. L. (2006). Location of glucose oxidase during production by *Aspergillus niger*. Applied microbiology and biotechnology, 70(1), 72-77.

[3] Coreño Alonso. (2009). Caracterización del sistema de reducción de Cr(VI) de la cepa Ed8 de *Aspergillus niger* resistente a cromatos. Tesis de Doctorado, Posgrado en Biología, Universidad de Guanajuato.

[4] Espino Saldaña, A. (2002). Aislamiento y caracterización de hongos resistentes a cromatos nativos de desechos industriales. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, Universidad de Guanajuato.

[5] Greenberg AD, Connors JJ, Jenkins DY, Franson MA. (1981). Standar methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Assiciation. Washington, D.C. 15:187-190.

[6] Lowry O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr y R.J. Randall. J. (1951) Biol. Chem. 193: 265-275.

[7] Rodríguez Reyes, S. C. (2014). Regulación de la producción de actividad GOX secretable en cepas de *Aspergillus niger*. Tesis de Maestría, Posgrado en Biología, Universidad de Guanajuato.

[8] Romo-Rodríguez, P., Acevedo-Aguilar, F. J., Lopez-Torres, A., Wrobel, K., Wrobel, K., & Gutiérrez-Corona, J. F. (2015). Cr (VI) reduction by gluconolactone and hydrogen peroxide, the reaction products of fungal glucose oxidase: Cooperative interaction with organic acids in the biotransformation of Cr (VI). *Chemosphere*.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

INFLUENCE OF PHOTOBIOREACTOR TYPE ON THE KINETIC PARAMETERS IN A MICROALGAE CONSORTIUM CULTURE AT LABORATORY SCALE (5L)

[Influencia del tipo de fotobiorreactor sobre los parámetros cinéticos de un cultivo mixto de microalgas a escala laboratorio (5 L)]

Miguel Ángel Ruiz Medina[a*+], Guillermo Arzate Martínez[a], Liliana Reynoso Cuevas[b], Arturo Salinas-Martínez[a]

[a] Universidad Politécnica de Guanajuato. Ingeniería Agroindustrial. Av. Universidad Norte S/N. Localidad Juan Alonso. C.P. 38483. Cortázar, Gto.. Tel (461) 441-4328
[b] Centro de Investigación en Materiales Avanzados, S.C. CIMAV Unidad Durango. Victoria 147 Nte., Zona Centro. C.P. 34000. Durango, Dgo. Tel (618) 811-3572

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: 08030224@upgto.edu.mx

Área del Conocimiento: Fermentaciones.

ABSTRACT
It is known that the geometry of a reactor can affect its performance in the culture of microorganisms due to changes on the dynamic properties of the system. This phenomenon can be evaluated with the kinetic parameters a microorganism culture shows. The aim of this study was to determine the kinetic parameters of a native microalgae consortium isolated from Rio Laja in Cortázar, Guanajuato, México (*Scenedesmus obliquus*, *Chlorella vulgaris* and *S. quadricauda*) on 3 different photobioreactor configurations. Culture runs were performed in 3 photobioreaction configurations at laboratory scale (5L). Each configuration comprises a bubbling column and a closed photobioreactor which depending on the case it could be; A) flat plates type, B) divided flat plates type or C) Helicoidal type. Bold's basal medium was used as culturing solution at a rate of 5.7 mL/h, a 12/12 lighting regime was used, it was provided by 2 X 30 watts fluorescent lamps, mixing and CO_2 were supplied by continuous bubbling with atmospheric air at a 1 VVM rate in the bubbling column. The study was conducted during this year between March 13 to May 13 2015; the initial cell density was $5x10^6$ cells/mL. The cell population behavior was monitored by cell counting using a Neubauer chamber. Sedimentation was observed in all photobioreaction configurations. For reactors A and B the system constantly mantains a suspended density of $1x10^6$ cells/mL, whereas for reactor C suspended cell density was $1.5x10^6$ cells/mL. Specific growth rates (μ) for each configuration were determined as 0.043, 0.042 and 0.082 for configurations A, B and C respectively. The parameters of cell division rate, doubling time and productivity were higher for configuration C. Therefor the configuration that showed the best overall performance in biomass production was C, which consists of a bubble column followed by a helicoidal photobioreactor.

Keywords: Photobioreactor; Microalgae culture; Kinetic parameters.

RESUMEN
Es conocido que la geometría en un reactor puede afectar su desempeño en el cultivo de microorganismos debido al cambio en las propiedades dinámicas del sistema. Éste fenómeno puede ser

medido con los parámetros cinéticos de un microorganismo. El objetivo del presente trabajo fue determinar los parámetros cinéticos de un cultivo microalgal nativo (*Scenedesmus obliquus*, *Chlorella vulgaris* and *S. quadricauda*) asilado del Río Laja en Cortázar, Guanajuato, México, en 3 configuraciones diferentes de fotobiorreactor. Los cultivos fueron llevados a cabo en 3 configuraciones de fotobiorreacción a escala laboratorio (5 L). Cada configuración estuvo compuesta de una columna de burbujeo y un fotobiorreactor cerrado, que dependiendo del caso fue; A) de placas planas, B) de placas planas con divisiones internas y C) helicoidal. Se utilizó medio basal Bold como medio de cultivo a razón de 320 ml cada 48 h, se suministró iluminación artificial con 2 lámparas fluorescentes de 30 watts con un régimen de luz/oscuridad de 12 horas, el mezclado y suplementación de CO_2 fueron suministrados mediante el burbujeo continuo en la columna de burbujeo empleando aire atmosférico a un flujo de 1 VVM, la densidad celular inicial fue de $5x10^6$ células/mL. El comportamiento de la población celular fue monitoreado mediante conteo celular en cámara de Neubauer. Se observó sedimentación en las 3 configuraciones de fotobiorreacción. Para los reactores A y B el sistema mantiene constantemente en suspensión una densidad de $1x10^6$ células/mL, mientras que para el sistema C se observó una densidad celular en suspensión de $1.5x10^6$ células/mL. Las velocidades de crecimiento específico (μ) determinadas para cada sistema fueron 0.043, 0.042 y 0.082 para las configuraciones A, B y C respectivamente. Los parámetros correspondientes a velocidad de división celular, tiempo de duplicación y productividad fueron significativamente mayores en la configuración del sistema C. La configuración que mostró los mejores parámetros en producción de biomasa fue la correspondiente al sistema C, que está compuesta de una columna de burbujeo seguida de un fotobiorreactor cerrado helicoidal.

Palabras Clave: Fotobioreactor; Cultivo de microalgas; Parámetros cinéticos.

INTRODUCCIÓN

Las microalgas son organismos fotosintéticos eucariotas cuyo cultivo se presenta como una de las mejores alternativas para hacer frente a la resolución de problemas mundiales como el calentamiento global, por su capacidad para la captura de CO_2 mediante el proceso de la fotosíntesis [2], a su capacidad metabólica para la remoción de contaminantes de aguas residuales [3], prevención de la eutrofización [1] y la posibilidad de obtener biocombustibles u otros productos de valor comercial derivados posterior procesamiento de la biomasa algal [4]. El cultivo de microalgas puede llevarse a cabo en diferentes regímenes, una primera subdivisión se puede hacer en sistemas abiertos y cerrados. Dentro de los primeros podemos encontrar a los estanques de microalgas al aire libre que es la forma más simple de llevar a calvo el cultivo éstos microorganismos. Se trata básicamente de piscinas expuestas al sol. Es el sistema menos eficiente aunque el más económico. Otro sistema también abierto es el llamado cultivo en tanques en invernadero en el que, los tanques de agua en los cuales se reproducen las microalgas están protegidos bajo la estructura de un invernadero. Las ventajas de este sistema sobre el de estanque al aire libre son; un mejor control de la temperatura y una pérdida muy reducida del volumen de agua [5]. Dentro de los regímenes cerrados encontramos el cultivo en fotobiorreactores; Los fotobioreactores son conductos transparentes aislados del exterior en los que se desarrollan las microalgas. Estos tubos se pueden colocar al exterior para captar mayor cantidad de radiación solar. De la misma forma que los sistemas abiertos los fotobiorreactores también pueden ir situados dentro de invernaderos [5].Dentro de los sistemas cerrados podemos encontrar diferentes configuraciones de fotobiorreactores difiriendo ya sea por su geometría y/o por su método de homogeneización. Unos de estos son los fotobiorreactores tubulares, que son de manera general tubos de acrílico o cristal transparente en el que se hace circular en forma horizontal, vertical o en serpentín, medio de cultivo

más el inóculo de microalgas. Los fotobioreactores de placa son construidos con paneles de materiales transparentes regularmente paneles de acrílico o cristal formando estructuras aplanadas y huecas a través de las que se hace fluir el medio de cultivo y microalgas [6]. Las columnas verticales con burbujeo son contenedores en los que se genera una circulación y homogeneización del medio con microalgas en una columna vertical a través de la inyección o flujo de gases como pueden ser aire atmosférico, gases de escape o dióxido de carbono. Los tipos anteriores de fotobiorreactores permiten alcanzar una alta eficiencia fotosintética gracias a que poseen una gran superficie de exposición a radiación luminosa [6]. Un método de cultivo más es el que se lleva a cabo en equipos de fermentación en la que los biorreactores de algas tienen un régimen de crecimiento no fotosintético, que se logra suministrando azucares al medio como fuente de carbono [5]. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la influencia de 3 configuraciones de fotobiorreacción a escala laboratorio (5 L) sobre los parámetros cinéticos en el cultivo de un consorcio microalgal asilado del Río Laja en el estado de Guanajuato.

METODOLOGÍA

Para la estimulación del crecimiento microalgal se empleó una modificación de la formulación de sales minerales por Bold [7] cada 48 h. Con el objetivo de proveer la cantidad de luz necesaria a los organismos fotosintéticos, se empleó Iluminación artificial con lámparas fluorescentes blancas de 30 watts en ciclo de luz 12/12. La homogeneización del cultivo se realizó por medio de aireación continua en la columna de burbujeo a 1 VVM, proveyendo el CO_2 necesario en la concentración atmosférica. El volumen total del cultivo fue de 5 L, se trabajó a temperatura ambiente no controlada (media de 25 ^{O}C durante el día).

El inóculo empleado fue un consorcio nativo aislado del cauce del Río Laja en Cortázar, Guanajuato, México. Compuesto por las especies *Scenedesmus obliquus, S. quadricauda* y *Chlorella vulgaris*, teniendo como densidad celular inicial 5x10^{6} cel/mL. La determinación de la densidad poblacional en cada uno de los reactores se realizó mediante cuenta total en cámara de Neubauer, homogeneizando los reactores hasta suspender la totalidad de la biomasa presente en el sistema.

Los fotobiorreactores evaluados en este trabajo se muestran y describen la Figura 1.

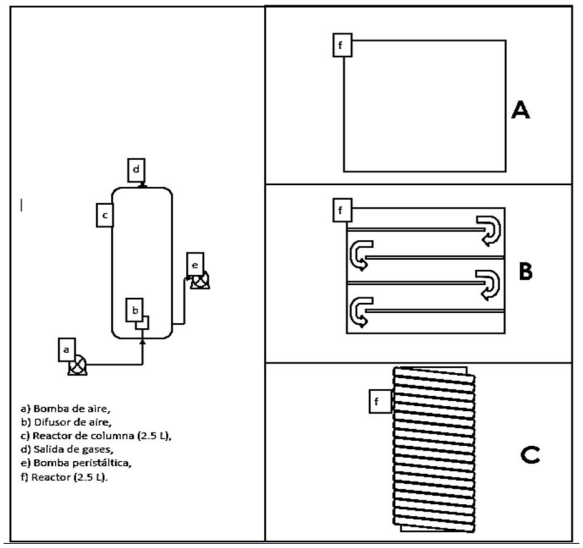


Figura 1: Diagramas de los sistemas de fotobiorreacción. Los sistemas de fotobiorreacción se componen de dos partes, el primer componente es una columna de burbujeo con un volumen de trabajo de 2.5 L, el segundo componente es un fotobiorreactor cerrado sin agitación y con recirculación a la columna de burbujeo según sea el caso será una fotobiorreactor de placas planas para el sistema A, un fotobiorreactor de placas planas con divisiones para el sistema B o un fotobiorreactor tubular helicoidal para el sistema C.

RESULTADOS

Con base en los resultados obtenidos se realizó un análisis de las cinéticas de crecimiento, La Figura 2 muestra el comportamiento de la población del consorcio microalgal en cada uno de los sistemas de fotobiorreacción durante durante la fase exponencial del cultivo. El tiempo en alcanzar la fase estacionaria es menor en los sistemas A y C, con 22 y 13 días respectivamente, mientras que en el sistema B se alcanza la fase estacionaria hasta los 27 días de cultivo.

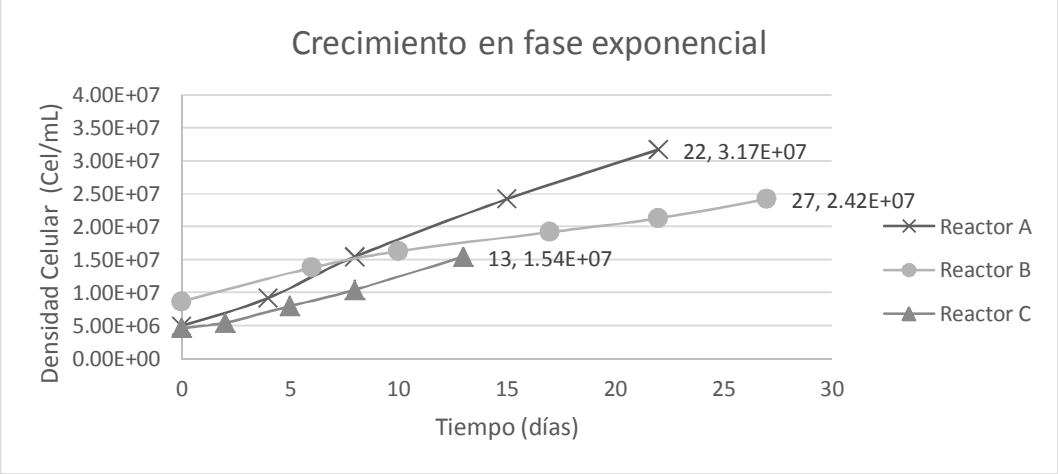


Figura 2: Comportamiento de la densidad celular en el tiempo (fase exponencial).

En la siguiente Tabla (1) se muestra una comparación de medias indicando que las densidades celulares máximas alcanzadas en las tres configuraciones presentaron diferencias significativas entre ellas. El sistema de fotobiorreacción A alcanzó la densidad más alta dentro de las configuraciones estudiadas obteniendo un valor de 3.17 $x10^7$ cel/mL, seguido por el sistema B con 2.42 $x10^7$ cel/mL y el sistema que alcanzó una densidad de 1.54 $x10^7$ cel/mL.

Tabla 1: Densidad celular máxima y tiempo hasta alcanzar la fase estacionaria en las configuraciones de fotobiorreacción.

Reactor	Densidad celular máxima (cel/mL)	Tiempo en alcanzar fase estacionaria (días)
A	$3.17\ x10^{7\,A}$	22
B	$2.42\ x10^{7\,B}$	27
C	$1.54\ X10^{7\,C}$	13

Letras diferentes en los superíndices indican diferencia significativa. Tukey $P<0.05$

Con el fin de determinar las diferencias en la fase *log* (exponencial) de crecimiento, se realizó una comparación de medias para las pendientes obtenidas para medir la eficiencia en la producción de

biomasa en las tres configuraciones de fotobiorreacción, los resultados obtenidos muestran que todas presentan una velocidad de crecimiento distinta durante esta fase del cultivo como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2: Comparación de medias obtenidas en las tres configuraciones de fotobiorreacción.

Reactor	Pendiente en fase exponencial
A	1215909 ^{A}
B	537760 ^{C}
C	909091 ^{B}

Letras diferentes en los superíndices indican diferencia significativa. Tukey P<0.05

Durante el tiempo de estudio se observó sedimentación celular dentro de las tres configuraciones de fotobiorreacción, por lo que se decidió homogeneizar el contenido de los reactores hasta la completa suspensión de la biomasa dentro del sistema antes de tomar la muestra para realizar el conteo celular. Para los reactores A y B el sistema mantiene constantemente en suspensión una densidad de $1x10^{6}$ cel/mL, mientras que para el reactor C la densidad celular en suspensión fue de $1.5\ x10^{6}$ cel/mL.

Tabla 3: Parámetros cinéticos del consorcio microalgal nativo cultivado en los sistemas de fotobiorreacción.

Reactor	μ (días^{-1})	Velocidad de división celular(divisiones/día)	Tiempo de duplicación (días)	Productividad (cel/ml*d)
A	0.043 ^{B}	0.062 ^{B}	16.11 ^{A}	7.98E+05 ^{A}
B	0.042 ^{B}	0.060 ^{B}	16.50 ^{A}	5.74E+05 ^{B}
C	0.082 ^{A}	0.118 ^{A}	8.45 ^{B}	8.33E+05 ^{A}

Letras diferentes en los superíndices indican diferencia significativa. Tukey P<0.05

La velocidad de división alcanzada en el sistema A (0.062 divisiones/día) resultó ser significativamente igual a la obtenida en el sistema B (0.06 divisiones/día), El sistema C obtuvo la mejor velocidad de división con 0.118 divisiones/día. Para el tiempo de duplicación nuevamente los sistemas A y B (16.11 y 16.5 días respectivamente) mientras que en el sistema C se obtuvo un tiempo de duplicación de 8.45 días. Para el parámetro de productividad, los valores obtenidos para los sistemas A y C no presentan diferencia significativa siendo $7.98\ x10^{5}$ cel/mL*día para el sistema A y $8.33\ x10^{5}$ cel/mL*día para el sistema C, mientras que para el sistema B fue de $5.74\ x10^{5}$ cel/mL*día. Por lo tanto el reactor que presentó los mejores parámetros en la producción de biomasa es el sistema C al superar significativamente a los sistemas A y B en cuanto a la velocidad de crecimiento específico obtenida, siendo de 0.082 dias^{-1} para el sistema C y de 0.043 y 0.042 dias^{-1} para los sistemas A y B respectivamente.

DISCUSIONES

Las condiciones de cultivo en las que se llevó a cabo el estudio fueron las mismas para los tres sistemas de fotobiorreacción, por lo que, las diferencias observadas en cuanto a los parámetros cinéticos determinados en los cultivos, se atribuyen a la diferencia geométrica de los sistemas de fotobiorreacción estudiados debido a que en el acervo internacional ha sido ampliamente reportado el efecto del estrés

hidrodinámico derivado principalmente de los métodos de agitación, el volumen de cultivo, el tipo de aireación y la geometría de los reactores de cultivo, limitando el desarrollo de cultivos [8, 9, 10, 11,12].

Tabla 4: Número de Reynolds a la entrada de los sistemas de fotobiorreacción.

	Sistema A	Sistema B	Sistema C
Número de Reynolds	1,364.30	4,092.92	483.41

Los sistemas A y B presentan mayor estrés hidrodinámico debido al flujo turbulento del medio de cultivo derivado de la geometría y las condiciones de construcción de los sistemas. En el sistema C la configuración tubular helicoidal del reactor permite mantener una producción celular mayor debido al flujo viscoso que se puede alcanzar dentro del sistema.

Los valores de productividad obtenidos son comparables a los reportados Silva y Col., [13] en ensayos con cuyo objetivo fue evaluar el efecto del estrés hidrodinámico sobre el crecimiento de *Dunaliella*, los valores reportados por el grupo de trabajo oscilan en el rango de 8.4 - 16.1 $x10^5$ cel/mL*día, las condiciones en las que llevaron a cabo su experimento fueron; en un matráz erlen meyer con un volumen de trabajo de 0.25 L burbujeando distintas composiciones de una mezcla de CO_2 y aire humidificado a diferentes flujos, bajo luz provista por lámparas fluorescentes en continuo y a una temperatura de 30 ^{O}C. White y Col. [14] Reportaron resultados que concuerdan con los obtenidos en el presente trabajo sobre velocidades de crecimiento especifico, su estudio arrojó valores dentro del rango de 0.017 - 8.7 día $^{-1}$ para especies de aguas dulces, en un fotobiorreactor cerrado, por lotes, con un volumen de 0.5 L, agitación por burbujeo de aire atmosférico en iluminación continua con lámparas fluorescentes y a temperatura ambiente con una media de 27 ^{O}C y de 0.0003-30.81 día $^{-1}$ en especies marinas bajo las mismas condiciones de trabajo. Newell y Fallon [15] reportaron velocidades de crecimiento específico de 0.095 hasta 0.45 día^{-1} en especies nativas de la costa de Georgia cultivadas a una temperatura media de 27 ^{O}C en un fotobiorreactor cilíndrico de 1 L con agitación por paletas y burbujeo, la iluminación se suministró colocando el fotobiorreactor frente a una lámpara fluorescente.

CONCLUSIONES

Con base en los resultados analizados, se concluye que los sistemas propuestos tienen la capacidad para llevar a cabo el cultivo del consorcio microalgal. Los tres sistemas de fotobiorreacción estudiados mostraron diferencias significativas en cuanto a sus capacidades para el cultivo del consorcio microalgal. Dichas diferencias pueden atribuirse a las características geométricas de cada uno y el inherente cambio en el estrés hidrodinámico al que es sometido el cultivo en cada uno de los sistemas de fotobiorreacción. Finalmente, considerando que la velocidad de crecimiento y la producción de biomasa son los mejores parámetros cinéticos, la mejor condición estudiada fue la C. De cara a una nueva etapa en el proceso de investigación, se infiere del comportamiento del sistema helicoidal, que puede ser empleado como una herramienta biotecnológica en aplicaciones como el tratamiento de agua residual.

REFERENCIAS

[1] León M.A.R, Sánchez M.V.L. (2010) Estudio de la influencia del uso de agua residual sobre el rendimeinto de cultivo de microalgas en un fotobiorreactor a escala laboratorio.

[2] González M.G.E. (2009) Determinación de los parámetros optimos de crecimiento de la microalga Chlorella vulgaris y las condiciones de mayor productividad para el diseño de un fotobiorreacctor.

[3] Arriaga-Jiménez T, Vera-Valdéz L, Medina G.R, Rivera P.O.M, Reynoso-Cuevas L, Arzate-Martínez G, Salinas-Martínez A. (2011) Tratamiento de aguas residuales domésticas e industriales a escala laboratorio, con un cultivo mixto de microalgas compuesto por Scenedesmus spp. y Chlorococcum spp. (Tesis de grado, Universidad Politécnica de Guanajuato).

[4]Pittman J.K, Dean A.P, Osundeko O. (2011) The potential of sustainable biofuel production using wastewater resources. Bioresource Technology. 102(1):17-25.

[5] Barraza C, Collao V, Espinoza C, Moya F, Thun G, Torres M. (2009) Producción de biodiesel a partir de microalgas. (Tesis de grado, Pontificia Universidad Catolica de Valparaiso).

[6] Ugwu C.U, Aoyagi H, Uchiyama H. (2008) Photobioreactors for mass cultivation of algae. Bioresource Technology. 99:4021-4028

[7] Bold H.C. 1949. "The morphology of Chlamydomonas chlamydogama", Bulletin of the Torrey

Botanical Club.72,.2: 101-108.

[8] Barbosa M.J, Albrecht M, Wijffels R.H. (2003) Hydrodynamic stress and lethal events in sparged microalgae cultures. Biotechnol Bioeng 83:112–120.

[9] Vega-Estrada J, Montes-Horcasitas M.C, Domínguez-Bocanegra A.R, Cañizares-Villanueva R.O. (2005) Haematococcus pluvialis cultivation in split-cylinder internal-loop airlift photobioreactor under aeration conditions avoiding cell damage. Appl Microbiol Biotechnol 68:31–35.

[10] Sobczuk T.M, García C.F, Molina G.E, Chisti Y. (2006) Effects of agitation on the microalgae Phaeodactylum triconutum and Porphyridium cruentum. Bioprocess Biosyst Eng 28:243–250.

[11] García C.F, Contreras G.A, Sobczuk T.M, Molina G.E. (2000) Effects of mechanical and hydrodynamic stress in agitated, sparged cultures of Porphyridium cruentum. Process Biochemistry 35:1045–1050.

[12] García C.F, Molina G.E, Mirón A.S, Pascual V.G, Chisti Y. (2001) Carboxymethyl cellulose protects algal cells against hydrodynamic stress. Enzyme Microb Technol 29:602–610.

[13] Silva H.J, Cortiñas T, Ertola R.J. (1987) Effect of hydrodynamic stress on Dunaliella growth. Chem. Tech. Biotechnol. 40:41-49.

[14] White P.A, Kalff J, Rasmussen J.B., Gasol J.M. (1991) The effect of temperature and algal biomass on bacterial production and specific growth rate in freshwater and marine hábitats. Microbial Echology. 21:99-118.

[15] Newell S.Y, Fallon R.D. (1982) Bacterial productivity in the water column and sediments of the Georgia (USA) coastal zone: Estimates via direct counting and parallel measurement of thymidine incorporation. Microb Ecol 8:33-46.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

APPLICATION OF A HYDROTHERMAL TREATMENT COMBINED WITH CALCIUM CHLORIDE TO INHIBIT THE ANTHRACNOSE PRESENCE IN PAPAYA

(Aplicación de un tratamiento hidrotérmico combinado con cloruro de calcio para inhibir la presencia de antracnosis en papaya)

Lidia Elena Ayón-Reyna[a*], Carlos Andrés Soltero-Sánchez[b], Martha Edith López-López[a], Claudia Barraza-Elenes[c], Patricia García-Cervantes[d], Ana María López-López[d], María Elena Báez-Flores[d], José Guadalupe Rendón-Maldonado[d], Misael Odín Vega-García[ac+]

[a] Doctorado Regional en Biotecnología, Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa. Culiacán, Sinaloa, México.
[b] Licenciatura en Ingeniería Bioquímica, Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa. Culiacán, Sinaloa, México.
[c] Doctorado en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa. Culiacán, Sinaloa, México.
[d] Maestría en Ciencias Biomédicas, Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa. Culiacán, Sinaloa, México.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: mvega6@yahoo.com

Área del Conocimiento: Fitopatología.

ABSTRACT
Papaya is a fruit of great economic potential. Nevertheless, it is highly susceptible to mechanical, microbial, and physiological damage, which produce a short shelf-life. Anthracnose is considered as an important postharvest disease in tropical and subtropical regions, being a major problem in papaya. On the other side, the accelerated softening process and its perishability, make necessary to apply alternatives that reduce deterioration and increase the shelf-life during marketing. In this sense, the hydrothermal treatment (HT) and calcium salts (Ca) have been shown to be effective to maintain the postharvest quality and inhibit anthracnose growth in papaya. The aim of this study was to evaluate the effect of the application of a HT-Ca combination on the quality and the presence of anthracnose in papaya inoculated with *C. gloeosporioides*. The anthracnose fungi was isolated of infected papayas and was characterized morphologically and molecularly. Fruits were inoculated by immersion in a spore suspension ($1x10^5$ spores/mL) for 3 minutes. After that, fruits were divided in four groups, one of them did not receive a treatment, other group received a HT (48°C, 20 minutes), the third group was immersed in a calcium chloride solution (1% w/v, 20 minutes) at room temperature, and the fourth group was treated with the combination HT-Ca. After the application of the treatments, fruits were stored during 20 days at 12°C and quality parameters (color, firmness), weight loss and anthracnose presence were evaluated. HT-Ca showed reduced anthracnose incidence and severity; also, fruits treated with HT-Ca resulted with higher retention of color and firmness, and lower weight loss than the other treatments. In general, HT-Ca proved to be effective to inhibit the anthracnose presence and to maintain the quality during storage of papaya.

Keywords: Hydrothermal treatment; calcium chloride; anthracnose; papaya.

RESUMEN

La papaya es un fruto de gran potencial económico. Sin embargo, es altamente susceptible a daño mecánico, microbiano y fisiológico, lo cual produce una corta vida de anaquel. Antracnosis es considerada como una enfermedad postcosecha importante en regiones tropicales y subtropicales, siendo el principal problema en papaya. Por otro lado, el acelerado proceso de ablandamiento y su carácter perecedero, hacen necesaria la aplicación de alternativas que reduzcan la deterioración y que incrementen la vida de anaquel durante la comercialización. En este sentido, el tratamiento hidrotérmico (HT) y las sales de calcio (Ca) han sido efectivos para mantener la calidad postcosecha y para inhibir el crecimiento de antracnosis en papaya. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la aplicación de una combinación HT-Ca sobre la calidad y la presencia de antracnosis en papaya inoculada con *C. gloeosporioides*. El hongo de la antracnosis fue aislado de papayas infectadas y fue caracterizado morfológica y molecularmente. Los frutos fueron inoculados por inmersión en una suspensión de esporas ($1x10^5$ esporas/mL) por 3 minutos. Después, los frutos fueron divididos en cuatro grupos, uno de ellos no recibió tratamiento, otro grupo recibió un HT (48°C, 20 minutos), el tercer grupo fue sumergido en una solución de cloruro de calcio (1% p/v, 20 minutos) a temperatura ambiente, y el cuarto grupo fue tratado con la combinación HT-Ca. Después de la aplicación de los tratamientos, los frutos fueron almacenados durante 20 días a 12°C y se evaluaron los parámetros de calidad (color y firmeza), pérdida de peso y presencia de antracnosis. HT-Ca mostró baja incidencia y severidad de antracnosis; además, los frutos tratados con HT-Ca resultaron con mayor retención de color y firmeza, y menor pérdida de peso que los otros tratamientos. En general, HT-Ca probó ser efectivo para inhibir la presencia de antracnosis y mantener la calidad durante el almacenamiento de papaya.

Palabras Clave: Tratamiento hidrotérmico; cloruro de calcio; antracnosis; papaya.

INTRODUCCIÓN

La papaya (*Carica papaya* L.) es un fruto climatérico ampliamente cultivado en regiones tropicales y subtropicales, que tiene gran importancia económica debido a su alto valor nutritivo y medicinal [1]. Este fruto ha ganado gran interés en el mercado internacional ya que es una fuente rica de compuestos bioactivos con alta actividad antioxidante [2], tales como carotenoides, vitamina C, tiamina, riboflavina, niacina, vitamina B6 y vitamina K [3]. El consumo de papaya ocurre alrededor del mundo, siendo Estados Unidos y Europa quienes constituyen los principales mercados consumidores [4]. En México el cultivar Maradol es económicamente el más importante, y su comercialización está limitada debido a su rápido ablandamiento poscosecha [5], siendo este fenómeno la principal característica que determina el tiempo en el mercado de esta fruta, ya que aumenta la susceptibilidad al daño mecánico, así como al ataque de insectos y enfermedades impactando ampliamente la aceptabilidad por el consumidor [6].

Debido a que contiene aproximadamente 88% de humedad y a que su cáscara es delgada, la papaya retiene por poco tiempo su calidad [7], siendo éste uno de los principales problemas para su exportación [8]. Otros inconvenientes incluyen una rápida maduración y alta susceptibilidad al estrés biótico y abiótico, lo cual podría resultar en un alto porcentaje de pérdida de producto [9, 10].

La contaminación microbiológica de productos frescos puede causar pérdidas poscosecha considerables, además de que representa un riesgo potencial a la salud de los consumidores [11]. El fruto de papaya posee un pH alto lo cual lo hace más susceptible al ataque microbiano, por lo que un factor importante que puede afectar la calidad poscosecha de la papaya y limitar la extensión de la vida de almacenamiento es la presencia de enfermedades [10]. El cultivo de la papaya es afectado por un

número de enfermedades especialmente aquella causada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* el cual provoca la enfermedad llamada antracnosis [1].

La antracnosis es una de las enfermedades poscosecha que más afecta la producción mundial de papaya a través de su infección latente en frutas con estados de madurez temprana que se encuentran en el campo. Los síntomas de antracnosis no son aparentes al momento de la cosecha sino que aparecen cuando los frutos están madurando o cuando están maduros, causando una severa descomposición durante el almacenamiento, transporte y distribución [12].

Debido a que esta enfermedad se presenta cuando la fruta empieza a madurar, es muy importante tomar medidas efectivas para inhibirla en frutos de papaya cosechados. Usualmente es controlada con la aplicación de fungicidas químicos como procloraz y propiconazol. Sin embargo, algunos factores como el desarrollo de mayor resistencia del hongo a los fungicidas y la opinión pública sobre el impacto potencial de fungicidas sobre la salud humana y el ambiente, han impulsado el interés por buscar nuevas alternativas para el control de enfermedades poscosecha [10].

Actualmente, existe un creciente interés por integrar en la investigación el desarrollo de productos naturales, especialmente en el área de poscosecha [13]. La necesidad de aplicar alternativas adecuadas al uso de fungicidas químicos para el control de enfermedades así como para mantener una buena calidad de los frutos después de la cosecha ha provocado que las investigaciones se dirijan a la combinación de varias alternativas para diseñar una estrategia de control que iguale o supere la efectividad de los productos químicos sintéticos. La estrategia ideal podría erradicar los patógenos presentes y proteger al producto de más infección, así como lograr una buena calidad del producto por mayor tiempo. En la actualidad, la alternativa más probable a un tratamiento químico puede ser la combinación de diferentes métodos [14].

La técnica conocida como métodos combinados brinda una alternativa para el desarrollo de tratamientos que mantengan por más tiempo los atributos de calidad, el contenido nutricional y una presencia baja de microorganismos que el que se conseguiría al aplicar los métodos de forma individual [15]. En este sentido, la aplicación de tratamientos hidrotérmicos combinados con sales de calcio ha mostrado mejores resultados en el mantenimiento de la calidad de los frutos al aplicarse de manera conjunta que individual. La aplicación de soluciones de calcio a temperatura alta ha mostrado efectos benéficos, por ello la aplicación de esta sal en conjunto con los tratamientos térmicos ha ido en aumento en los últimos años, atribuyéndose al hecho de que las temperaturas cálidas (40-60°C) incrementan el efecto benéfico del tratamiento con calcio debido a una mayor retención de la solución de calcio en el interior del producto [16].

Algunos autores han documentado que la combinación de sales de calcio con el tratamiento hidrotérmico ha sido efectiva en el mantenimiento de la firmeza de los frutos [17, 18, 19, 20], ya que los tratamientos térmicos ejercen su efecto positivo al permitir la desmetilación por PME para formar grupos carboxilo aniónicos con los cuales los iones calcio pueden formar enlaces cruzados. Durante estos tratamientos, ocurre también la pérdida de la permeabilidad selectiva de la membrana, permitiendo la difusión de cationes como el calcio en la pared celular.

Sharma y col [20] reportaron que la aplicación precosecha de calcio y la aplicación poscosecha de agua caliente en manzanas es altamente conveniente para reducir las pérdidas poscosecha, así como para mantener la firmeza, altos niveles de antioxidantes y la calidad del fruto. Por su parte, Shahkoomahally y Ramezanian [19] evaluaron los efectos del agua caliente y la inmersión en soluciones de cloruro de calcio sobre la calidad de frutos de kiwi, encontrando que esta combinación favorecía la retención de la calidad de los frutos.

La combinación de la aplicación precosecha de cloruro de calcio y el tratamiento poscosecha con agua caliente, así como el empaque en bolsas de polietileno causó una mejora en la calidad y una disminución en la infección fúngica en frutos de granada [18]. Luna-Guzmán y Barret [17] observaron un menor desarrollo de hongos y levaduras y de cuenta total bacteriana en melón fresco cortado inmerso en una solución de cloruro de calcio y lactato de calcio a 60 °C, al ser comparado con las piezas inmersas solo en agua a la misma temperatura.

Por todo esto, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la aplicación de una combinación de tratamiento hidrotérmico-cloruro de calcio sobre la inhibición de antracnosis y los parámetros de calidad en frutos de papaya enteros inoculados con el hongo *C. gloeosporioides*.

METODOLOGÍA

Para el desarrollo de este proyecto se utilizaron 144 frutos de papaya (*Carica papaya* L.) variedad Maradol en índice de madurez 4, atendiendo lo reportado por Santamaría-Basulto y col [21]. Los frutos fueron obtenidos de un huerto localizado en la ciudad de Culiacán, Sinaloa y seleccionados con base en libertad de golpes y ausencia de daños por microorganismos, asegurándose uniformidad de color y tamaño (1000 ± 300g), generando un material experimental homogéneo. Se sometieron a un lavado en una solución al 1% de hipoclorito de sodio por 5 minutos y se enjuagaron en agua destilada estéril.

Aislamiento de *C. gloeosporiodides* y preparación del inóculo

La cepa de *Colletochichum gloesporioides* se aisló de frutos de papaya variedad Maradol con síntomas de antracnosis. Para aislar el patógeno de los frutos, se tomaron trozos de tejido infectado, se sembraron en medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) y se almacenaron a temperatura ambiente (25°C) para favorecer el desarrollo del hongo. Una vez que el crecimiento micelial fue observado, las colonias fueron resembradas en medio PDA fresco para obtener cultivos puros. Los cultivos puros desarrollados fueron entonces identificados basados en sus características morfológicas y culturales, utilizando las claves taxonómicas de Barnett y Hunter [22] y confirmados realizando una identificación molecular del hongo.

Se preparó una suspensión de conidios en agua destilada estéril a una concentración de $1.5x10^5$ conidios/mL obtenidos de un cultivo de dos semanas de edad, adicionada con Tween 80® al 0.5% para facilitar la adhesión de los conidios al fruto. Para el conteo de esporas se utilizó un hemacitómetro, inyectándole 100 µL de la suspensión de conidios en cada pocillo [23].

Inoculación de los frutos de papaya con *C. gloeosporioides*

Una vez lavados y desinfectados, los frutos se sumergieron en la suspensión de conidios por 5 minutos y se dejaron a temperatura ambiente (25 °C) durante 1 h para retirar el exceso de humedad para posteriormente aplicar los tratamientos correspondientes.

Aplicación de tratamientos

Los frutos se dividieron en cuatro lotes y las frutas de uno de los lotes fueron sumergidas en agua purificada a temperatura ambiente (25 °C), a otro lote se le aplicó un tratamiento hidrotérmico (48 °C por 20 min), los frutos de un tercer lote se sumergieron en una solución conteniendo cloruro de calcio grado alimenticio (CCFO21-00 Fapsa, México) (1 % p/v, 3 min) a temperatura ambiente, y el cuarto lote se trató con la combinación tratamiento hidrotérmico-cloruro de calcio. Se obtuvieron un total de cuatro tratamientos:

T1. Control (Control)
T2. Hidrotérmico (HT)
T3. Cloruro de calcio (Ca)
T4. Hidrotérmico-Calcio (HT-Ca)

Una vez aplicados los tratamientos, las papayas se almacenaron durante 20 días a 12 °C a una humedad relativa de 95%. De este almacenamiento se retiraron tres papayas por tratamiento cada cuatro días para realizar los respectivos análisis.

Incidencia y severidad de antracnosis

Para cada tratamiento, 6 frutos fueron empacados en bolsas de polietileno con agujeros y almacenados por 20 días a 12°C, con una humedad relativa del 95%. La incidencia de la enfermedad se evaluó con base en los síntomas de antracnosis en la superficie de los frutos [24]. El efecto de los tratamientos sobre la incidencia de la enfermedad se evaluó diariamente a partir del día que se presentaron síntomas, y se expresó como porcentaje de frutos que mostraron antracnosis del total de frutos de cada tratamiento, usando la siguiente fórmula:

$$Incidencia\ de\ antracnosis\ (\%) = \frac{\#\ frutos\ infectados}{Total\ de\ frutos\ inoculados}\ x100$$

La severidad de antracnosis se evaluó cada cuatro días siguiendo la metodología reportada por Ong y Ali [24], utilizando una escala del 1 al 5, donde 1= 0% de la superficie dañada (sin presencia de antracnosis sobre la superficie del fruto), 2= 1-25%, 3= 26-50%, 4= 51-75%, 5= 76-100%.

Firmeza

La medición de la firmeza se realizó de acuerdo a lo reportado por Ayón-Reyna y col [25]. Se determinó la firmeza de la pulpa de los frutos de papaya utilizando un penetrómetro digital Chatillon DFE Ametek modelo E-DFE-100 equipado con una punta plana de 11 mm de diámetro con una velocidad constante de 50 mm/min. Se reportó la fuerza de compresión máxima en Newtons (N). Se tomaron 18 lecturas por tratamiento.

Color

La determinación de color se realizó de acuerdo a la metodología reportada por López-López y col [26] utilizando un colorímetro Minolta CR 200 (Minolta Chromameter, Japón). Se registraron los parámetros *L** y a* de la escala de color CIELAB, en la cual *L** define la luminosidad, mientras que a* es un componente cromático que van de verde a rojo. Se tomaron 12 lecturas por tratamiento.

Pérdida de peso

Nueve frutos de cada tratamiento fueron usados para mediciones de pérdida de peso, siguiendo la metodología reportada por Hazbavi y col [27]. Los frutos fueron pesados y los resultados fueron expresados como porcentaje de pérdida de peso respecto al valor inicial.

Análisis estadístico

Se realizó un diseño completamente aleatorio con tres réplicas, donde dos frutos de papaya constituían una réplica. El análisis estadístico de los datos se realizó mediante un análisis múltiple de varianza utilizando Statgraphics Plus 5.1 y la comparación de las medias se realizó mediante la prueba de Fisher con un nivel de significancia del 5 % ($P \leq 0.05$). Las medias con el correspondiente LSD para cada nivel fueron graficados utilizando SigmaPlot 12.0.

RESULTADOS

Incidencia y severidad de antracnosis

En la figura 1A se muestra que la incidencia de la enfermedad aumentó con el paso del tiempo de almacenamiento a 12°C, y alcanzó un máximo (100%) en los frutos tratados con calcio después de 12 días de almacenamiento, mientras que en los frutos control alcanzó el máximo a los 13 días y en los tratados con HT y HT-Ca al día 14 y 15, respectivamente. Sin embargo, fueron los frutos control los primeros en presentar síntomas de antracnosis al día 6 con un 16.7% de incidencia, mientras que los frutos tratados con calcio presentaron sus primeros síntomas al día 7 con un 33.3% de incidencia, seguido por HT que tardó hasta 10 días en presentar síntomas, con un 16.7% de frutos infectados, y por último la combinación HT-Ca que retrasó la aparición de síntomas en los frutos hasta por 11 días.

Los frutos control presentaron desarrollo de puntos necróticos en los primeros 6 días de almacenamiento, y la incidencia de la enfermedad rápidamente incrementó a 33.3%, 50%, 83.3% y 100% después de los días 8, 10, 12 y 14 días, respectivamente.

La figura 1B muestra los efectos de los tratamientos sobre la severidad de antracnosis en frutos de papaya inoculados con *C. gloeosporioides*. La máxima protección de los frutos fue conferida por el tratamiento HT-Ca. Inicialmente, en los primeros 4 días de almacenamiento ningún síntoma apareció sobre los frutos en todos los tratamientos, mientras que para el día 8 ya se mostraban síntomas en los frutos control y en aquellos tratados con calcio. Los tratamientos HT y HT-Ca retrasaron el inicio de los síntomas hasta por 8 días cuando el resultado aún era 1. Se pudo observar que la mayor severidad la presentaron los frutos de los tratamientos control y calcio, con un valor de 4 al día 20 de almacenamiento; sin embargo, ninguno de los tratamientos alcanzó la máxima puntuación ya que todos los frutos tuvieron un porcentaje promedio de presencia de síntomas de antracnosis en la superficie con valores menores al 75%.

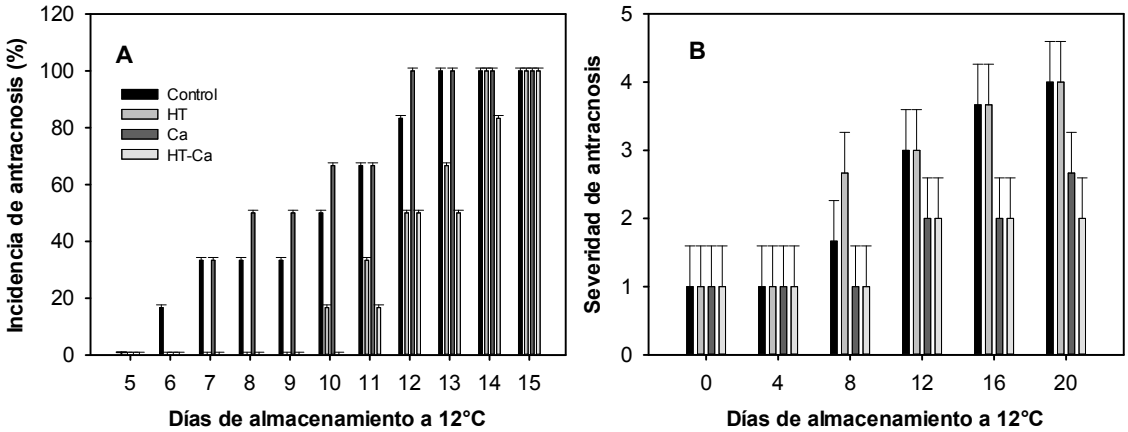


Figura 1. (A) Cambios en el porcentaje de incidencia de antracnosis en frutos de papaya inoculados con *C. gloeosporioides* y tratados hidrotérmicamente, con cloruro de calcio y la combinación y almacenados a 12°C por 20 días. (B) Efecto de la aplicación de un tratamiento hidrotérmico, cloruro de calcio y la combinación sobre la severidad de antracnosis en frutos de papaya inoculados con *C. gloeosporioides* y almacenados a 12°C por 20 días.

Color

En la figura 2A se muestran los cambios en la luminosidad de los frutos, partiendo de valores *L** de 58-59, los cuales disminuyeron conforme avanzó el tiempo de almacenamiento, alcanzando valores al día 20 de 57.6, 56.8, 56.7 y 56.3 para HT-Ca, HT, Ca y control, respectivamente. Se observó un comportamiento constante los primeros 12 días de almacenamiento para todos los tratamientos, seguido de una disminución al día 20. A pesar de que en la mayor parte del almacenamiento no se mostraron diferencias significativas entre tratamientos, se lograron apreciar valores mayores de luminosidad ($P \leq 0.05$) en el tratamiento HT-Ca respecto a los tratamientos Ca y control al final del almacenamiento.

Un incremento en el valor a* fue observado durante el almacenamiento de los frutos a 12°C para todos los tratamientos (Figura 2B). Se encontraron valores estadísticamente mayores en los frutos control que en los tratados con Ca y HT-Ca a partir del octavo día de almacenamiento. A pesar de que el tratamiento control presentó valores mayores que HT, no fueron significativos durante todo el almacenamiento excepto en el día 12. Se pudo observar como la combinación de calcio con agua caliente fue el mejor tratamiento para mantener el color de las papayas inoculadas con *C. gloeosporioides*, incluso tuvo mejor efecto que el calcio aplicado a temperatura ambiente, ya que logró un valor a* promedio de 11.32 al final del almacenamiento, mientras que el calcio aplicado de manera individual presentó un valor promedio estadísticamente más alto (14.7).

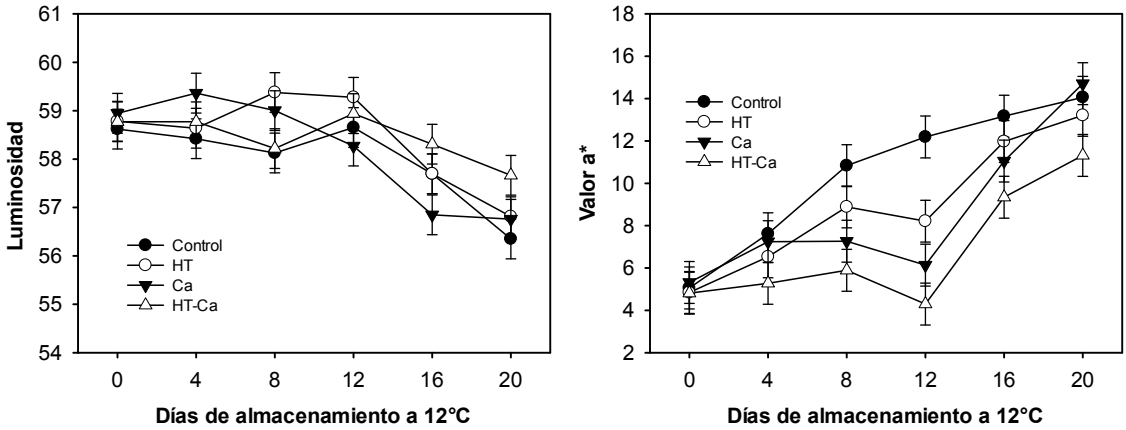


Figura 2. (A) Efecto de la aplicación de un tratamiento hidrotérmico, cloruro de calcio y la combinación sobre la luminosidad de frutos de papaya inoculados con *C. gloeosporioides* y almacenados a 12°C por 20 días. (B) Cambios en el valor a* en frutos de papaya inoculados con *C. gloeosporioides* y tratados hidrotérmicamente, con cloruro de calcio y la combinación almacenados a 12°C por 20 días.

Firmeza

En la figura 3A se observan los cambios en firmeza ocurridos en papaya inoculada con el hongo *C. gloeosporioides* almacenada a 12°C. El valor inicial promedio de los frutos de papaya fue de 18.8 N y se observó una tendencia a disminuir para todos los tratamientos, excepto para los frutos tratados con HT-Ca, los cuales mantuvieron la firmeza durante los 20 días que duró el almacenamiento. Al final, la firmeza de los frutos fue significativamente más alta ($P \leq 0.05$) en frutos tratados con la combinación HT-Ca en comparación con el resto de los tratamientos; sin embargo, HT-Ca no mostró diferencias significativas con el tratamiento Ca en los primeros 16 días de almacenamiento, mientras que con el control y HT se encontraron diferencias a partir de los días 8 y 12, respectivamente. El tratamiento que consiguió la mayor pérdida de firmeza a lo largo del almacenamiento fue el control con un porcentaje de pérdida de 21.4, seguido por HT con un 12.3 % y Ca con un 8.03 %, mientras que la combinación no mostró pérdidas en la firmeza.

Pérdida de peso

Un incremento progresivo en el porcentaje de pérdida de peso ocurrió para todos los tratamientos (Figura 3B). La menor pérdida de peso la presentaron los frutos de papaya tratados con la combinación HT-Ca con un porcentaje de pérdida de sólo el 2.6% después de 20 días de almacenamiento a 12°C, el cual mostró diferencias significativas al último día de almacenamiento respecto al resto de los tratamientos, mientras que en el día 16 mostraron diferencias sólo con los tratamientos HT y Ca. No se observaron diferencias significativas durante el almacenamiento para los frutos control, HT y Ca, los cuales alcanzaron porcentajes de pérdida de peso al final del almacenamiento de 3.8%, 3.7% y 4.2%, respectivamente.

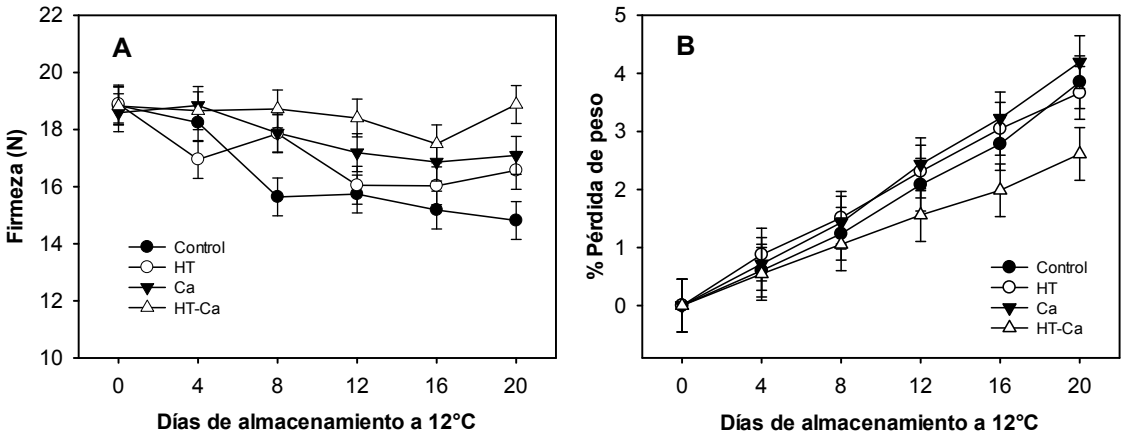


Figura 3. (A) Efecto de la aplicación de un tratamiento hidrotérmico, cloruro de calcio y la combinación sobre la firmeza de frutos de papaya inoculados con *C. gloeosporioides* y almacenados a 12°C por 20 días. (B) Cambios en el porcentaje de pérdida de peso en frutos de papaya inoculados con *C. gloeosporioides* y tratados hidrotérmicamente, con cloruro de calcio y la combinación almacenados a 12°C por 20 días.

DISCUSIONES

Este estudio demostró el potencial del tratamiento hidrotérmico combinado con cloruro de calcio en el control de antracnosis y en el mantenimiento de la calidad de los frutos de papaya almacenados a 12°C. El desarrollo de los síntomas de la antracnosis fue afectado por los tratamientos aplicados, especialmente por la combinación HT-Ca, ya que se logró reducir la incidencia de la antracnosis en los frutos, manteniéndose el porcentaje de incidencia en cero durante diez días, mientras que para el tratamiento control los frutos permanecieron libres de daño por sólo cinco días; es decir, la combinación HT-Ca logró retrasar la aparición de síntomas de antracnosis hasta por 5 días respecto al control. Además, HT-Ca retardó la aparición de los síntomas 1 día respecto a los frutos tratados con HT y 4 días respecto a los tratados con calcio. Li y col [10] reportaron que la aplicación de un tratamiento con agua caliente (54°C, 4 min) en frutos de papaya redujo la incidencia de antracnosis casi 3 veces comparado con los frutos no tratados, así como también observaron una disminución significativa en la severidad de la enfermedad. Contrario a nuestros resultados, Madani y col [12] reportaron que concentraciones de 1.5 y 2% de cloruro de calcio redujeron significativamente la incidencia de antracnosis en frutos de papaya durante 5 semanas de almacenamiento y retardaron la iniciación de los síntomas por cuatro semanas. Además, Saborio y col [28] reportaron una disminución de la severidad de la antracnosis al aplicar un tratamiento de inmersión de 1 y 4 % de cloruro de calcio en papaya, alcanzando disminuciones del 48 y 55% con respecto a los frutos no tratados. Sin embargo, en este estudio la aplicación de calcio a temperatura ambiente no tuvo efecto sobre la incidencia y la severidad de antracnosis. Nuestros resultados indicaron que al adicionar calcio al agua caliente la actividad antifúngica del hidrotérmico se incrementó, lo cual coincide con la recomendación de emplear temperaturas elevadas durante la inmersión del producto cuando el aporte cálcico se realice utilizando baños, esto con el fin de activar la enzima pectin metil esterasa, la cual desmetila las pectinas de la pared celular y la lámina media, lo que permite la unión del Ca^{2+} endógeno o exógeno con los grupos

carboxílicos libres (desmetilados) de los polímeros de pectinas existentes, estabilizando la pared celular y mejorando la firmeza [16]; ya que según Luna-Guzmán y Barrett [17], el calcio podría aumentar la resistencia de los tejidos al ataque de hongos o bacterias mediante la estabilización o refuerzo de las paredes celulares.

Según Chailoo y Asghari [29] los tratamientos hidrotérmicos son efectivos para el control de hongos teniendo un efecto sobre su crecimiento, debido a que pueden inducir sustancias antifúngicas como las fitoalexinas. Además, las esporas de hongos y otros microorganismos en su mayoría actúan sobre la superficie o en las primeras capas de células de la piel de los frutos y vegetales [30]. En estos casos, las temperaturas altas ejercen efectos letales o subletales para inhibir la germinación y el crecimiento de hongos [25].

Además de sus propiedades antifúngicas, el tratamiento hidrotérmico-cloruro de calcio también mostró potencial para preservar la calidad de las frutas de papaya durante el almacenamiento a 12°C. Se pudo observar como la combinación HT-Ca mantuvo la firmeza y el color, así como un menor porcentaje de pérdida de peso.

La pérdida de firmeza es atribuida al proceso natural de maduración del fruto, mientras que la retención de la firmeza en los frutos tratados con HT-Ca puede ser atribuida al efecto combinado del calcio con el hidrotérmico, favoreciendo la formación de pectatos de calcio y resultando en una menor actividad de la poligalacturonasa y menor pérdida de firmeza [16]. En este sentido, Silveira y col [16] reportaron un efecto sinergístico de la combinación de un tratamiento hidrotérmico con sales de calcio, encontrando mayor retención de la firmeza en los frutos de melón tratados que en los no tratados. Por su parte, Ayón-Reyna y col [25] reportaron que la aplicación de un tratamiento hidrotérmico en combinación con cloruro de calcio preservó el color original de la papaya fresca cortada. Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que el HT por sí solo no fue suficiente para mantener la firmeza y retrasar los cambios de color de los frutos de papaya por más tiempo que el control, lo cual difiere con lo reportado por Djioua y col [31], quienes encontraron que el tratamiento hidrotérmico fue efectivo para mantener tanto la firmeza como el color de mangos frescos cortados.
La pérdida de peso es un parámetro importante para los comerciantes de frutas y hortalizas, ya que implica una pérdida económica. En este estudio se presentó un incremento en el porcentaje de pérdida de peso, siendo los frutos tratados con HT-Ca los que presentaron la menor pérdida. Los resultados de pérdida de peso pueden relacionarse con la luminosidad, ya que los frutos que tuvieron la menor pérdida de agua (TH-Ca) fueron los mismos que retuvieron mejor la luminosidad. En este sentido, Ayón-Reyna y col [25] reportaron que la pérdida de luminosidad en frutos de papaya fresca cortada pudo ser debida a la pérdida del contenido de humedad.

CONCLUSIONES

Se puede concluir del presente estudio que el tratamiento HT-Ca mostró mejor efecto antifúngico que los tratamientos HT y Ca aplicados de manera individual, ya que pudo controlar la antracnosis y mantener la calidad de los frutos de papaya.
La combinación HT-Ca puede ser recomendada para su aplicación comercial en frutos de papaya cosechados como una alternativa a los fungicidas químicos sintéticos, ya que aparte de combatir la antracnosis y mantener la calidad de los frutos, es un método de conservación barato y no tóxico para los consumidores.

REFERENCIAS

[1] Kalam-Azad, M.A., Golam-Babbani, M., Anim, L., Marzuki-Sidik. (2013), "Development of transgenic papaya through Agrobacterium-mediated transformation", International Journal of Genomics, 2013:235487. http://dx.doi.org/10.1155/2013/235487.

[2] Brasil, I.M., Gomes, C., Puerta-Gomez, A., Castell-Perez, M.E., Moreira, R.G. (2012). "Polysaccharide-based multilayered antimicrobial edible coating enhances quality of fresh-cut papaya", LWT - Food Science and Technology, 47:39-45.

[3] Pinto, F.O., Pereira, M.G., Luz, L.N., Cardozo, D.L., Ramos, H.C.C., Macedo, C.M.P. (2013), "Use of microsatellite markers in molecular analysis of segregating populations of papaya (*Carica papaya* L.) derived from backcrossing", Genetics and Molecular Research, 12(3):2248-2259.

[4] De Oliveira, J.G., Vitória, A.P. (2011), "Papaya: Nutritional and pharmacological characterization, and quality loss due to physiological disorders. An overview", Food Research International, 44:1306–1313.

[5] Iniestra-González, J.J., Lino-López, G.J., Paull, R.E., Barba de la Rosa, A.P., Mancilla-Margalli, N.A., Sañudo-Barajas, J.A., Ibarra-Junquera, V., Chen, N.J., Hernández-Velasco, M.A., Osuna-Castro, J.A. (2013), "Papaya endoxylanase biochemical characterization and isoforms expressed during fruit ripening", Postharvest Biology and Technology, 81:13–22.

[6] Amnuaysin, N., Jones, M.L., Seraypheap, K. (2012), "Changes in activities and gene expression of enzymes associated with cell wall modification in peels of hot water treated bananas". Scientia Horticulturae, 142:98–104.

[7] Widyastuti, T.E.W., Srianta, I. (2011), "Development of functional drink based on foam-mat dried papaya (*Carica papaya* L.): optimization of foam-mat drying process and its formulation", International Journal of Food, Nutrition and Public Health, 4(2):167-176.

[8] Farzana, A.R.F., Palkadapala, P.G.V.N., Meddegoda, K.M.M.N., Samarajeewa, P.K., Eeswara, J.P. (2008), "Somatic embryogenesis in papaya (*Carica papaya* L. cv. Rathna)", Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka, 36(1):41-50.

[9] Zhu, X., Li, X., Chen, W., Chen, J., Lu, W., Chen, L., Fu, D. (2012), "Evaluation of new reference genes in papaya for accurate transcript normalization under different experimental conditions", Plos One, 7(8):1-14.

[10] Li, X., Zhu, X., Zhao, N., Fu, D., Li, J., Chen, W., Chen, E. (2013), "Effects of hot water treatment on anthracnose disease in papaya fruit and its possible mechanism", Postharvest Biology and Technology, 86:437–446.

[11] Hussain, P.R., Meena, R.S., Dar, M.A., Wani, A.M. (2012), "Effect of post-harvest calcium chloride dip treatment and gamma irradiation on storage quality and shelf-life extension of Red delicious apple", Journal of Food Science and Technology, 49(4):415–426.

[12] Madani, B., Muda Mohamed, M.T., Biggs, A.R., Kadir, J., Awang, Y., Tayebimeigooni, A., Shojaei, T.R. (2014), "Effect of pre-harvest calcium chloride applications on fruit calcium level and post-harvest anthracnose disease of papaya", Crop Protection, 55:55-60.

[13] Machado, L.P., Matsumoto, S.T., Jamal, C.M., Barreto da Silva, M., da Cruz Centeno, D., Neto, P.C., Retz de Carvalho, L., Yokoya, N.S. (2014), "Chemical analysis and toxicity of seaweed extracts with

inhibitory activity against tropical fruit anthracnose fungi", Journal of the Science of Food and Agriculture, 94(9):1739-1744.

[14] Pereira-Kechinski, C., Sherrer-Montero, C.R., Zapata-Noreña, C.P., Tessaro, I.C., Ferreira-Marczak, L.D., Bender, R.J. (2012), "Effects of ozone in combination with hydrothermal treatment and wax on physical and chemical properties of papayas", Ozone: Science and Engineering, 34:57-63.

[15] Avallone, C.M., Montenegro, S., Gruszycki, A., Cravzov, A. (2012), "Mamón (*Carica papaya* L.) y sandía (*Citrullus vulgaris Schrad*) mínimamente procesada: cobertura más favorable para su conservación", Consultado en agosto del 2015. Disponible en: http://www.unne.edu.ar/Web/cyt/cyt/2002/07-Tecnologicas/T-053.pdf

[16] Silveira, A.C., Aguayo, E., Chisari, M., Artés, F. (2011), "Calcium salts and heat treatment for quality retention of fresh-cut 'Galia' melon", Postharvest Biology and Technology, 62:77–84.

[17] Luna-Guzmán, I., Barrett, D.M. (2000), "Comparison of calcium chloride and calcium lactate effectiveness in maintaining shelf stability and quality of fresh-cut cantaloupes", Postharvest Biology and Technology, 19:61–72.

[18] Ranjbar, H., Hasanpour, M., Asgari, M.A., Sameei Zadeh, H., Baniasadi, A. (2007), "The effects of calcium chloride, hot water treatment and polyethylene bag packaging on the storage life and quality of pomegranate (cv: Malas-Saveh)", International Journal of Food Science and Technology, 4(2):1.

[19] Shahkoomahally, S., Ramezanian, A. (2013), "The effect of hot water and calcium solution dipping on quality in kiwifruit during storage", American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences, 13(10):1351-1356.

[20] Sharma, R.R., Singh, D., Pal, R.K. (2013), "Synergistic influence of pre-harvest calcium sprays and postharvest hot water treatment on fruit firmness, decay, bitter pit incidence and postharvest quality of royal delicious apples (*Malus x domestica* Borkh)", American Journal of Plant Sciences, 4:153-159.

[21] Santamaría-Basulto, F., Sauri-Duch, E., Espadas y Gil, F., Díaz-Plaza, R., Larqué-Saavedra, A., Santamaría, J.M. (2009), "Postharvest ripening and maturity indices for Maradol papaya" Interciencia, 34(8):583-588.

[22] Barnett, H.L., Hunter, B.B. (1986). Illustrated Genera of Imperfect Fungi. (7 ed.). New York, USA.: MacMillan Publishing Company, 218.

[23] Gutiérrez-Alfonso, J.G., Gutiérrez-Alfonso, O., Nieto-Ángel, D., Téliz-Ortiz, D., Zavaleta-Mejía, E., Delgadillo-Sánchez, F. (2004), "Manejo integrado de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides penz.*) del mango (*Magnifera índica* L.) durante la postcosecha", Revista Mexicana de Fitopatología, 22(3):395-402.

[24] Ong, M.K., Ali, A. (2015), "Antifungal action of ozone against Colletotrichum gloeosporioides andcontrol of papaya anthracnose", Postharvest Biology and Technology, 100: 113–119.

[25] Ayón-Reyna, L.E., Tamayo-Limón, R., Cárdenas-Torres, F., López-López, M.E., López-Angulo, G., López-Moreno, H.S., López-Cervántes, J., López-Valenzuela, J.A., Vega-García, M.O. (2015), "Effectiveness of Hydrothermal-Calcium Chloride Treatment and Chitosan on Quality Retention and Microbial Growth during Storage of Fresh-Cut Papaya", Journal of Food Science, 80(3):C594-C601.

[26] López-López, M., Vega-Espinoza, A., Ayón-Reyna, L., López-Valenzuela J., Vega-García, M. (2013), "Combined effect of hot water dipping treatment, N-acetylcysteine and calcium on quality retention

and enzymatic activity of fresh-cut apple", Journal of Food, Agriculture and Environment, 11(2):243-248.

[27] Hazbavi, I., Khoshtaghaza, M.H., Mostaan, A., Banakar, A. (2015), "Effect of postharvest hot-water and heat treatment on quality of date palm (cv. Stamaran)", Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences", 14(2):153–159.

[28] Saborío, D., Sáenz, V., Arauz, L.F., Bertsch, F. (2000), "Efecto del calcio en aplicaciones precosecha y poscosecha sobre la severidad de antracnosis y la calidad de frutos de papaya (Carica papaya)", Agronomía Costarricense, 24(2):77-88.

[29] Chailoo, M.J., Asghari, M.R. (2011), "Hot water and chitosan treatment for the control of postharvest decay in sweet cherry cv. Napoleon", Journal of Stored Products and Postharvest Research, 2(7):135-138.

[30] Ansari, N.A., Feridoon, H. (2007), "Postharvest application of hot water, fungicide and waxing on the shelf life on Valencia and local oranges of Saiavar", Asian Journal of Plant Sciences, 6(2):314-319.

[31] Djioua, T., Charles, F., Freire, M., Filgueiras, H., Ducamp-Collin, M.N., Sallanon, H. (2010), "Combined effects of postharvest heat treatment and chitosan coating on quality of fresh-cut mangoes (*Mangifera indica L.*)", International Journal of Food Science and Technology, 45:849-855.

DIAGNOSIS OF PLAGUES AND DISEASES IN NOPAL (*Opuntia ficus-indica* Berg.) IN MILPA ALTA, MEXICO CITY

(Diagnóstico de plagas y enfermedades en nopal (*Opuntia ficus-indica* Berg.) en Milpa Alta D.F.)

Edgar Obed Mejia Yáñez[*a], Guillermo Erik Membrila Lorenzo [a], Ana Victoria Barrios Reyna [a], Gabriela Silvestre Gómez [a], Paola López Cedillo [a], Venus Jiménez Castañeda [a+]

[a]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 Coyoacán, México D.F.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: vjimenez@correo.xoc.uam.mx

Área del Conocimiento: Fitopatología.

ABSTRACT
In Mexico, the nopal grows naturally, several species are distributed, with higher abundance in the center and northeast of the country, specifically in Milpa Alta and Tlalnepantla. Nopal vegetable crop in Milpa Alta was initiated in 1938. There are species of ornamental, fodder, fruit, vegetables and even guests to produce natural dyes. Nopal vegetable presents a series of phytosanitary problems that decrease the production and may result in lost crops, that is why in this research was held a diagnosis of pests and diseases in vegetable nopal (*Opuntia ficus - indica* Berg.) in Milpa Alta, Mexico city. Initially an analysis of the most common symptoms presented cactus plantation in a study area of 2500 m^2, with a total of 2568 plants, significant material was collected (stalks and parts thereof for damage caused by infectious agents and insect pests) were transported to the laboratory of plant pathology and entomology UAM- X for identifying such agents through taxonomic keys. Among the symptoms were as manifiesto, cladodes whith black spots; cladodes with points of golden color; cladodes with chewy secretions of yellowish color to black, finally cladodes with insects in white and cottony. In the area approached the following results were obtained, were detected 2 causative agents of the two major diseases, *Alternaria* sp. (Mal del oro), *Botrytis* sp (Mancha negra), as well as 2 insect pests, done *Cactophagus spinolae* Gyll (weevil worm) and *Dactylopius indicus* Green (cochineal).

Keywords: vegetable nopal, disease, pests, injury and incidence.

RESUMEN
En México, el nopal crece de forma natural, varias especies se distribuyen, con mayor abundancia en el centro y noreste del país, específicamente en Milpa Alta y Tlalnepantla. El cultivo de Nopal se introdujo por primera vez en Milpa Alta en 1938. Algunas especies de este cultivo son; ornamentales, para forrajes, algunos dan frutas, así como el uso del nopal verdura e incluso insectos que son utilizados para producir colorantes naturales. El cultivo de nopal verdura presenta una serie de problemas fitosanitarios, que disminuyen la producción y puede dar lugar a la perdida de cultivos, es por esto que esta investigación se llevó a cabo un diagnóstico de plagas y enfermedades en el cultivo de nopal verdura (*Opuntia ficus - indica* Berg.) en Milpa Alta, D.F. En primer lugar se recolecto material infectado,

con los síntomas más comunes que presentan la plantación en un área de estudio, con un total de 2568 plantas; las pencas y parte de ellas que presentan síntomas causados por agentes infecciosos, se trasladaron al laboratorio de fitopatología ubicado en la UAM Xochimilco, para la identificación de algún patógeno. Los síntomas más comunes que se presentaron fueron, cladodios con puntos negros, cladodios con puntos de color dorado, cladodios con secreción gomosa de color amarillento o negro, finalmente cladodios con insectos de color blanco con forma algodonosa. En la zona de estudio se obtuvieron que las principales enfermedades que afectan al cultivo de nopal verdura son: *Alternaria sp.* (Mal del oro), *Botrytis sp.* (Mancha negra), así como 2 plagas de insectos, *Metamasius cactophagus spinolae Gyll* (gusano picudo) y *Dactyloplus indica Green* (cochinilla).

Palabras Clave: nopal verdura, enfermedades, plagas, incidencia y severidad.

INTRODUCCIÓN

El nopal (*Opuntia ficus - indica* Berg.) es una planta perene, perteneciente a la familia de las Cactáceas cuyas características morfológicas son altamente específicas, debido a su gran viabilidad genética le confieren a este cultivo una notable capacidad de adaptación a los ambientes hostiles y desfavorables. Se considera originario del golfo de México y el Caribe, se encuentra distribuido en muchas zonas desérticas de Estados Unidos, México y América del Sur [4]. En Milpa Alta, al sur de la ciudad de México se encuentra la zona más importante productora de nopal verdura, tradicionalmente ha sido de los alimentos de mayor consumo del pueblo mexicano, tanto, que en los últimos años se ha incrementado su demanda, principalmente en las áreas urbanas. Lo anterior se refleja en la superficie cultivada en el país, la cual pasó de 5,134 ha en 1991 a 6,633 ha en 1992, hasta la actualidad. El nopal verdura como cultivo en Milpa Alta se inició en 1938. Fue en las últimas décadas del siglo pasado que los milpaltenses encontraron en la producción del nopal un cultivo mucho más rentable sustituyendo al maguey pulquero, maíz, frijol, chícharo, avena forrajera y haba según informan los vecinos de la región de Milpa Alta, por lo que la superficie destinada al cultivo del nopal verdura se incrementó considerablemente [2].

Debido a lo antes mencionado se suma que en las últimas décadas el nopal ha cobrado una importancia agrícola debido a sus propiedades medicinales de las que se menciona: antibiótico, regula el colesterol, prevención de diabetes, digestivos, estreñimiento, sistema circulatorio, previene obesidad y refuerza el sistema inmunológico, además de sus usos industriales como: cosmético [3].

Es por ello, que las plantaciones comerciales de nopal se han convertido, en algunas regiones, en un monocultivo, lo que ha favorecido que al igual que todas las hortalizas, el nopal presenta una alta incidencia de problemas fitosanitarios, que pueden llegar a causar daños económicamente significativos.

Noventa y dos especies de plagas, son las que dañan al cultivo del nopal verdura, en Norteamérica se reportaban por primera vez a principios del siglo XX, especialmente en México han señalado al menos once insectos plaga y seis enfermedades sin embargo, no todas las especies antes mencionadas alcanzan la categoría de insectos plaga en las plantaciones de nopal. De las plagas más importantes que afectan el nopal verdura, tanto a la planta como al fruto, son: Gusano picudo del nopal (*Cactophagus spinolae* Gyll), la grana o cochinilla (*Dactylopius indica* Green), entre otras. Estas plagas atacan principalmente en estado larvario, por lo cual es importante determinar su ciclo biológico para proceder a su control. Otro factor fundamental que incide en el desarrollo de esta cactácea lo constituyen las enfermedades, como son: mal de oro (*Alternaria sp*.), la pudrición de la epidermis, la antracnosis, mancha negra

(Botrytis sp.), el engrosamiento de cladodios, entre otros [1]. Es necesario mencionar que la presencia, incidencia y severidad de los daños varía de una región a otra, así como las prácticas culturales.

Con base a lo antes mencionado el objetivo de la presente investigación fue diagnosticar las plagas y enfermedades que afectan el cultivo de nopal verdura *Opuntia ficus-indica* Berg. en la delegación de Milpa Alta, ya que la incidencia de plagas y enfermedades en este cultivo implica un serio problema, porque la mayoría de las zonas se presentan condiciones óptimas en cuanto al clima y huéspedes para su establecimiento y propagación. Es preocupante la agresividad y el daño que causan, situación que conlleva a que se le considere como un problema fitosanitario de especial atención. Es por ello que se identificará y se determinará la incidencia y severidad de plagas y enfermedades asociadas al cultico de nopal verdura con el fin de evaluar los daños que pudieran ocasionar el cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de estudio

El sitio donde se llevó a cabo la presente investigación fue investigación fue en la delegación Milpa Alta, políticamente se encuentra al sureste de la Ciudad de México, sus límites son: al norte las delegaciones, Xochimilco y Tláhuac, al este con el Estado de México, al oeste con las delegaciones Xochimilco y Tlalpan, entre las coordenadas 19° 12’ 15’’ N latitud norte y 99°00’ 11’’W longitud oeste [8]. La delegación se caracteriza por una topografía montañosa con un intervalo latitudinal de 2,230 a más de 3,000 msnm. Con pendientes que van de 1 hasta 28°. El clima, de acuerdo con la clasificación climática de Koppen, modificada por García [5], es C (w2) (w), que corresponde al clima templado subhúmedo con lluvias escasas en verano, la temperatura media anual es de 14.4°C y precipitación anual 878.9 mm. La precipitación no es heterogénea, ya que en partes más bajas van de 580 a 1200 en las más altas [6]. El Señor Luis Alberto Sánchez Mesa, tiene un área destinada para el cultivo de nopal de 2500 m^2 en la delegación de Milpa Alta, específicamente en el Barrio San Francisco Tecoxpa, con las coordenadas 19° 12´15´´ latitud norte y 99° 00´ 11´´ longitud oeste, esta parcela se caracteriza por tener un suelo de origen volcánico, presentando unidades Andosoles en formación [7].

MÉTODO

En primer instancia se realizó un análisis sobre los síntomas más comunes que presentaba la plantación de nopal en un área de estudio, con un total de 2568 plantas, para ello se recorrió toda el área, se realizó un muestreo dirigido, tomando veinte muestras, las cuales tenían como manifiesto manchas negras, que atravesaban la penca con unos agujeros de 3 a 4 cm de afectación, presentaban lesiones secas y sin olor (fig. 1); posteriormente se tomaron cladodios con puntos de color dorado, en la base de las espinas y cambio de coloración en el cladodio a verde oscuro (fig. 2). De la base de las plantas se tomó secreción gomosa de color amarillento a negro, por último se tomaron muestras con insectos de color blanco y algodonoso en toda la penca (fig. 3).

Después se procedió al cultivo e identificación de hongos fitopatógenos, tomando una muestra del cultivo infectado de aproximadamente 1 cm^2, en el cual tenga mitad infectado y mitad sano, se colocan las muestras obtenidas en una vaso de precipitado y se le agregara hipoclorito de sodio al grado de que cubra las muestras durante 60 segundos, después se vacía y se le agrega agua estéril (este paso se repite 3 veces). A continuación se colocan los ejemplares resultantes en el agar de las cajas Petri (PDA) asegurándose de que las muestras estén bien sembradas en el agar. Estas se dejaran reposar en la estufa bacteriológica durante 48 horas.

Después del anterior, se identifican las colonias de hongos fitopatógenos, con el siguiente procedimiento: Se coloca 1 gota de lactofenol en el porta objetos y diurex, se toma micelio para ponerlo en la gota de lactofenol. Se ven las colonias de hongos e identificarlos en el microscopio (identificar micelio, hifas, septos, cuerpos fructíferos, etc.). Por último se realizará una resiembra de hongos, para tener colonias puras y poder tener una mejor observación.

Para la identificación de insectos plaga se recolectaron cladodios y partes de ellos que presentaban algún daño causado por insectos. Se transportaron al laboratorio de Entomología en frascos para evitar la salida de los mismos, para proceder a la identificación se tomó parte de la muestra que contenía al insecto y se colocó dentro de la caja petri, se observaron las muestras directamente al microscopio estereoscópico y se identificaron las principales características del insecto. Posteriormente se procedió a consultar la literatura sobre insectos de interés agrícola, para determinar el nombre común, nombre científico, ciclo de vida, y la etapa en la que el insecto causa daño. El método fue, el de comparación por fotografía y por características.

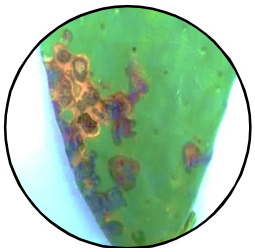


Fig. 1- Manchas



Fig. 2- Puntos de color dorado.



Fig. 3- Secreción



Fig. 4. Puntos algodonosos

RESULTADO

Después de los análisi fitopatologicos se detectaron 2 principales agentes patógenos, *Alternaría sp.* causante de mal de oro *(fig.4), Botrytis sp.* Causante de la mancha negra *(fig. 5)*, además de 2 insectos plaga, gusano picudo (*Metamasius cactophagus spinolae) (fig. 6)* y cochinilla (*Dactylopius indicus*) (fig.7). Cabe destacar que al principio del muestro de esta investigación, las afecciones eran solo a una parte de la parcela (no más de 100 plantas de nopal) y al hacer el conteo final, se observó que la gran mayoría de los individuos de su parcela cuenta con las manchas.

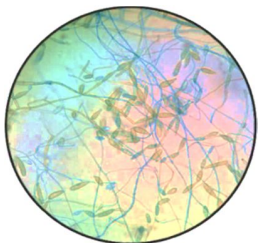


Fig. 5- Alternaría sp.



Fig. 6- Botrytis sp.

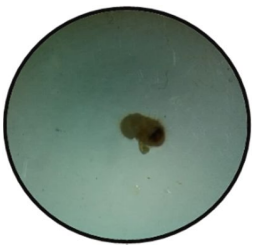


Fig. 7- Gusano picudo



Fig. 8- Grana cochinilla

Incidencia

Podemos determinar como "Incidencia" al 37% de individuos infectan infectados (*Opuntia ficus-indica* Berg.) que desarrollan una enfermedad (mal de oro, mancha negra, además de picudo, y cochinilla) a

lo largo de un periodo determinado (3 meses). De 2568 plantas de *Opuntia ficus- indica,* Berg., 37% presenta mal de oro (*Alternaría sp.*) y el 26% presenta mancha negra (*Botrytis sp.)* (fig 9), 29% presenta cochinilla (*Dactylopius indicus*) y el 8% presenta larva del gusano picudo (*Metamasius cactophagus spinolae)* (fig 10). Es decir que la enfermedad con más número de casos es *Alternaría sp.*, con una incidencia de 950 plantas aproximadamente infectadas, seguido de *Botrytis sp.*, con 667 plantas infectadas aproximadamente. Así mismo se determinó la incidencia de plagas entre las plantas de nopal, fue la cochinilla con 744 plantas, y por último el picudo con, 205 plantas afectadas.

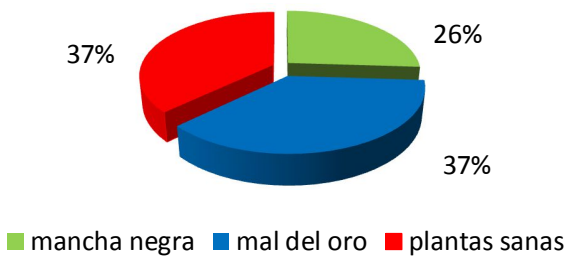


Fig 9- Incidencia de enfermedades

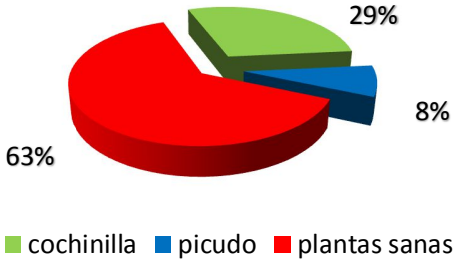


Fig 10- Incidencia de plagas

Severidad

Podemos determinar cómo daño, al grado de afección continua que sufre un individuo (*Opuntia ficus-indica* Berg.) por la interacción de un patógeno o agente primario visible o no (mal de oro, mancha negra, además de picudo, y cochinilla) Para determinar el daño en % del total de pecas de nopal, se estableció un rango de severidad o daño, dividido en tres estratos de la penca del nopal. Estrato bajo, estrato medio, y estrato alto. Se seleccionaron 10 plantas al azar de cada fila y se estimó el grado de severidad con el (tabla 1), después se procedió a hacer un análisis estadístico en donde se contempla que el 100% es un total de 2568 plantas de nopal en la parcela.

Tabla 1- Escala de severidad				
Cladodio sano 0%	Cladodio con severidad ligera 1-10%	Cladodio con severidad moderada 11-35%	Cladodio con severidad media 36-75%	Cladodio con severidad alta 76-90%
				

Para el daño de las pencas de nopal causados por *Alternaria sp.* (Tabla 2) podemos observar que de acuerdo a los rangos establecidos este patógeno, aproximadamente un 50% de toda la plantación de nopal están sanos, mientras el otro 50% en las tres principales partes de la penca tienen daño, un 29% de la plantación enferma presenta un daño ligero en los cladodios medios, y un 2.5% presenta un daño severo en cladodios medios y bajos, los cladodios altos difícilmente presentaron síntomas de las enfermedad, lo que se interpreta en que mal de oro, presenta daños severos en los cladodios bajos, lo que repercute directamente en la emergencia de nuevos cladodios. En contraste para la mancha negra, podemos observar (Tabla 3) que de acuerdo a los rangos establecidos un 100% de los cladodios altos no presento sintomatología de *Botrytis sp*. Mientras que los cladodios bajos presentaron un daño severo del 20% y los cladodios medios un 30% al igual que *Alternaría sp*. Aproximadamente la mitad de la plantación de nopal, estaba sana o libre de sintomatología causada por *Botrytis sp.*

Para los insectos plaga usando los mismo rangos, se obtuvo que *Dactylopius indicus* Green (Tabla 4) principalmente presentan rangos de daño ligero en un 30%, poco menos de la mitad de la plantación está totalmente libre de cochinilla, así mismo se pude observar que la proporción de daño por este insecto plaga, solo es en los cladodios bajos, y medios. Ya que un 98% de los cladodios altos está totalmente sano. Para el picudo del nopal *Metamasius cactophagus spinolae* podemos determinar, que al igual que para la cochinilla, para los cladodios altos un 100% de ellos, no presenta síntoma de larvas del picudo, en contraste solo de 6 a un 8% de los cladodios bajos presentan daños severos, esto se traduce a que la época de muestreo no coincide con la época de copula de dicho insecto a esto se debe que el daño causado por el mismo no sea significativo para toda la población de plantas de nopal. (Tabla 5)

Tabla 2- Severidad causada por Mal de oro (Alternaria sp.)			
Grado de severidad	Grado de severidad por cladodio		
	Bajo	Medio	Alto
Sano	55%	51%	1oo%
Ligero	29%	18%	-
Moderado	9%	18%	-
Medio	1.5%	1.5%	-
Severo	2.5%	2.5%	-

Tabla 3- Severidad causada por Mancha negra (*Botrytis* sp.)			
Grado de severidad	Grado de severidad por cladodio		
	Bajo	Medio	Alto
Sano	51%	20%	1oo%
Ligero	9%	5%	-
Moderado	9%	10%	-
Medio	15%	19%	-
Severo	20%	30%	-

Tabla 4- severidad causada por Cochinilla (*Dactylopius indica* Green)			
Grado de severidad	Grado de severidad por cladodio		
	Bajo	Medio	Alto
Sano	48%	51%	98%
Ligero	30%	20%	-
Moderado	9%	10%	-
Medio	5%	12%	-
Severo	8%	7%	-

Tabla 5- severidad causada por Picudo (*Metamasius cactophagus spinolae* Gyll)			
Grado de severidad	Grado de severidad por cladodio		
	Bajo	Medio	Alto
Sano	80%	90%	100%
Ligero	2%	1%	-
Moderado	2%	1%	-
Medio	8%	2%	-
Severo	8%	6%	-

DISCUSIÓN

Es importante mencionar que la identificación de hongos fitopatógenos, se obtuvo como resultado, *Alternaría sp.* y *Brotrytis sp.,* como agentes principales de las enfermedades que atacan a nopal verdura. Otro factor fundamental para el nivel de severidad fue sin duda la edad de los cladodios, además de que una parte de ellos presentaba más de una enfermedad en el mismo. Las pústulas frescas o nopalitos, rara vez presentaron daño. Cabe señalar que el daño de los cladodios maduros por *Alternaría sp. y Botrytis sp.,* está estrechamente relacionado con los lugares donde la cochinilla y el gusano picudo prefieren alimentarse, quizá la concentración de nutrientes en los cladodios maduros, como se han reportado en los estudios de nutrición en nopal [9,10,11] sea importante para definir los lugares de alimentación.

CONCLUSIONES

Al realizar esta investigación nos percatara que *Alternaría sp.,* es un hongo, con una incidencia alta al encontrarlo en un 37%, pero este agente puede ser más infeccioso asociado con otro tipo de agentes, como por ejemplo *Botrytis sp., q*ue se encontró en un 26% de incidencia, en un total de 2568 plantas. Con respecto a plagas identificadas, una de las más importantes es la cochinilla ya que está puede afectar a cualquier tipo de nopal con una incidencia del 29%. El gusano picudo del nopal afecta a este mismo en etapa de larva, el modo en que este insecto daña, es haciendo una serie de perforaciones para alimentarse, secretando substancias que a su vez son nocivas para el nopal. Este se encontró en un 8% de incidencia, pues la manera en que este insecto ataca puede crea reentradas para otros agentes infecciosos que pueden ser hongos, bacterias, etc.

AGRADECIMIENTOS

Al señor Luis Alberto Sánchez Mesa, por la disposición de tiempo y préstamo de la parcela para nuestra investigación.

REFERENCIAS

[1] Castañeda, R. (2001). Parámetros empleados para la identificación de los hongos conidiales. Pasado y presente en la taxonomía de los hifomicetes. *Protección vegetal*, *16*, 92-101.

[2] Cristina, B., & Marco, B. (1998). El maravilloso nopal: sus propiedades alimenticias y curativas. In I. Grijalbo (Ed.). México.

[3] Saag, I., Sanderson, G., Moyna, P., & Ramos, G. (1975). Cactacea mucilage composition. *Journal Science Foood Agriculture* (26), 993-100.

[4] Villareal, F., Rojas, M., V, A., & J, M. (1963). Estudio Químico sobre las Especies de nopales (Opuntia spp). *Ciencia*, *3* (22), 59-65.

[5] Bravo, H. (1978). Las cactáceas de México. 2ª ed. Vol. 1. UNAM. México.

[6] Flores, V. (2001). Producción, industrialización y comercialización de nopalito. Reporte de investigación. *Universidad Autónoma Chapingo* (58).

[7] García, E. (1988). In *Modificaciones al sistema del clasificación climática de Koppen* (p. 217). Mpéxico: Offet Lajos.

[8] IMTA. (1996). *Extractor rápido de información climatológica, Instituto Mexicano de Tecnología del Agua.* México.

[9] INEGI, a. (1995). *Anuarios Estadístico de la Delegación Milpa Alta, Instituto Nacional de estadística Geográfica e Informática.* México.

[10] Mc, G., & Parolis, H. (1981). The mucilage of Opuntia icus-indica, Part 2. *Carbohydrate Researcj* , 1462-1466.

[11] Martín, P. (1980). Vulcanología de la Sierra Chichinautzin. *Tesis de maestria, Facultad de Ciencias, UNAM México*.

IDENTIFICATION OF ASSOCIATED BACTERIA TO SOFT ROT SYMPTOMS IN *A. tequilana* by MALDI-TOF-MS AND 16S ADNr ANALYSIS

(Identificación de bacterias asociadas a los síntomas de la pudrición de cogollo en *A. tequilana* por MALDI-TOF-MS y 16S ADNr análisis)

Cristóbal Fonseca-Sepúlveda[a*], Gloria Macedo-Raygoza[a], Claudia Cisneros-Reyes[a], and Miguel Juan Beltrán-García[a+].

[a] Departamento de Química, Universidad Autónoma de Guadalajara, Av. Patria 1201 Lomas del valle, Zapopan, Jalisco.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: mbeltran71@hotmail.com

Área del Conocimiento: Fitopatología.

ABSTRACT
The blue Agave (*A. tequilana* Weber) is the source to produce tequila. Pathogenic fungi and bacteria that cause economic losses affects agave plants. After 20 years of studies of many research groups, the biotic and abiotic factors those influencing the development of Agave soft-rot are unknown. So far, it was described *Pectobacterium carotovora* (before *Erwinia* genus) as the cause of disease. However exist another reports mentioned other type of bacteria as responsible. In our laboratory we have interest to understand this disease, approaching abiotic stressors and the microorganisms that are associated with symptoms. Using modern identification techniques as proteomic analysis using MALDI-TOF mass spectrometry and the PCR sequencing product of the 16S rDNA. We identified 72 associated-bacteria with bud soft-rot in diseased plants and 25 in bud tissues of apparently healthy plants. An aqueous extract of plant material surface-sterilized with oxidizing agents, desiccants and then washed with sterile water was used to streak in nutrient agar plates. The water-washed was used as a sterility control to ensures that microorganisms isolated are inhabitants of the internal tissue in both conditions. We not found *P. carotovora*, but the following bacteria *Citrobacter freundii*, *B. pumilus, P. agglomerans, E. cowani, Pseudomonas syringae*, *P. stutzeri*, *Enterococcus casseliflavus* and others are associated with soft-rot. In the healthy tissues repeatedly we find *Klebsiella oxytoca* and *Pantoea agglomerans*, *Lactobacillus* species and 10 different genera more. The comparison between tissues indicates that *S. maltophila* is a recurrent bacterium that was not found in healthy tissue. Moreover we found to *P. agglomerans* and *E. cloacae*, E. *cancerogenus* in both healthy and diseased tissue. The *P. agglomerans* has been isolated as a seed-endophyte of *A. tequilana*. This suggests those microorganisms that having a beneficial endophyte behavior, becomes saprophytes or pathogens of its own host under some unknown conditions.

Keywords: Endophytes; *A. tequilana*; saprophytes, pathogen.

DEVELOPMENT OF A SCALE OF SEVERITY OF WILT CAUSED BY *Phytophthora capsici* L. IN POBLANO CHILI PLANTS

(Desarrollo de una escala de severidad de la marchitez causada por *Phytophthora capsici* L. en plantas de chile poblano)

Alfredo Reyes-Tena[a,b], Gabriel Rincón-Enríquez[a], Sylvia Patricia Fernández-Pavía[b], Luís López-Pérez[b], Evangelina Esmeralda Quiñones-Aguilar[a]*

[a] Biotecnología Vegetal del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A. C.
[b] Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: eqaguilar08@gmail.com

Área del conocimiento: Fitopatología.

ABSTRACT
The use of virulence scales little objective and accurate proves to be an important problem when evaluating the results of bioassays on bioprotection against pathogens like *Phytophthora capsici* (PC). In order to establish a severity or virulence scale qualitative ordinal of PC in poblano chile plants, it developed an experimental design completely randomized with two treatments (with and without inoculation PC) and 25 repetitions under greenhouse conditions. When the plants had an approximate size of 15 cm and 20 sheets, 25 plants were inoculated with a suspension of zoospores of CH11 strain PC set to $1x10^4 mL^{-1}$, this strain (highly pathogenic) isolated from a culture of chili in Michoacán. In the remaining 25 plants they are not inoculated PC. Every two days after inoculation of PC they were made destructive sampling of healthy and diseased plants for to register signs and disease progression. A written and photographic aerial and radical part description was made. The scale was subsequently validated with Koch's postulates, to the isolate the phytopathogen of diseased tissue and reinfected in pepper plants. A qualitative ordinal severity scale with six levels according to the severity and progression of the disease developed. The levels were: Level 0 (healthy plant), level 1 (mild wilting), Level 2 (moderate wilt), Level 3 (advanced wilt), Level 4 (very late blight) and Level 5 (severe wilting or dead plant). The objective and detailed description of the damage caused by PC shown in pepper plants, could allow the use of a better parameter to measure the severity of this disease in bioassays developed under specific experimental conditions.

Keywords: *Capsicum annuum,* pathogenicity, symptomatology, analysis of virulence.

RESUMEN
El uso de escalas de virulencia poco objetivas y precisas resulta ser un problema importante en la evaluación de resultados de bioensayos en bioprotección contra patógenos como *Phytophthora capsici* (PC). Con el fin de establecer una escala de severidad o virulencia ordinal cualitativa de PC en plantas de chile poblano, se desarrolló un diseño experimental completamente al azar con dos tratamientos (con y

sin inoculación de PC) y 25 repeticiones en condiciones de invernadero. Cuando las plantas tenían un tamaño aproximado de 15 cm y 20 hojas, 25 plantas fueron inoculadas con una suspensión de zoosporas de PC cepa CH11 a una concentración de $1x10^4$ mL^{-1}, esta cepa (altamente patógena) aislada de un cultivo de chile en Michoacán. En las 25 plantas restantes no se inoculó PC. Cada dos días después de la inoculación de PC se hizo un muestreo destructivo de plantas sanas y enfermas para registrar los signos y progresión de la enfermedad. Una descripción escrita y fotográfica de parte aérea y radical de la planta fue realizada. La escala fue posteriormente validada con los postulados de Koch, a partir de tejido enfermo se aisló al fitopatógeno y se reinfectó en plantas de chile. Una escala cualitativa ordinal con seis niveles fue desarrollada de acuerdo a la severidad y la progresión de la enfermedad. Los niveles fueron: nivel 0 (planta sana), nivel 1 (marchitez leve), nivel 2 (marchitez moderado), nivel 3 (marchitez avanzado), nivel 4 (marchitez muy avanzado) y nivel 5 (marchitez severa o plantas muertas). La descripción objetiva y detallada de los daños causados por PC en plantas de chile podría permitir el uso de un mejor parámetro para medir la severidad de esta enfermedad en bioensayos desarrollados en condiciones experimentales específicas.

Palabras Clave: *Capsicum annuum*, patogenicidad, sintomatología, análisis de virulencia.

INTRODUCCIÓN

Phytophthora capsici L. es un oomycete fitopatógeno que provoca la principal enfermedad a nivel mundial del cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.) [1]. La importancia en el manejo de ésta enfermedad radica en la necesidad de generar nuevas estrategias de control sustentables, entre ellas el control biológico por medio de microorganismos antagonistas [2]. Para la evaluación de la capacidad bioprotectora de diferentes agentes o métodos de control *in planta*, es necesario realizar ensayos bajo diferentes condiciones experimentales (laboratorio, invernadero o campo) [3]. Al momento de evaluar el nivel de daño de la enfermedad por efecto de diferentes tratamientos, se requiere del uso de escalas de severidad o virulencia del fitopatógeno en la especie vegetal, así como en las condiciones experimentales específicas donde se lleva a cabo el ensayo. En la literatura se han reportado algunas escalas de severidad de *P. capsici* en plantas de chile [4; 5; 6 y 7], la mayoría emplean niveles de 0 a 5 partiendo desde planta sana hasta planta muerta. Sin embargo, algunas descripciones de la sintomatología son fuertemente subjetivas y poco precisas, lo que podría afectar su interpretación y aplicación en ensayos similares. Otro detalle importante a tomar en cuenta son las condiciones experimentales donde fueron desarrolladas (temperatura, humedad, variedad o cultivar vegetal, edad de la planta, método de inoculación y concentración de zoosporas del fitopatógeno), estos factores podrían afectar la agresividad o el tipo de síntomas mostrado por las plantas. Por lo cual, para evaluar la severidad de ésta enfermedad en un ensayo *in planta* es recomendable el desarrollo anticipado de escalas de severidad en las mismas condiciones experimentales. Con base a lo anterior, en éste trabajo se tuvo como objetivo desarrollar una escala cualitativa ordinal de severidad de la marchitez causada por *P. capsici* en plantas de chile poblano bajo condiciones de invernadero.

METODOLOGÍA

En un invernadero tipo cenital plastificado de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo en Morelia Michoacán, México (latitud N 19°45'95"; longitud W 101°09'16"; altitud 1900 m), durante la temporada verano-2014 en condiciones naturales de luz (radiación total del 80%), temperatura (15-32°C) y humedad del 70%. Se germinaron semillas de chile poblano variedad San Luis, en charolas de aluminio con arena esterilizada (120°C/ 15 psi / 3h). Las semillas germinaron a los 12 días después de la

siembra. Las plántulas de chile fueron trasplantadas cuando presentaban crecimiento homogéneo y dos hojas verdaderas (30 días después de la siembra) en recipientes de unicel con 500 g de sustrato (mezcla de suelo: arena, 1:1, v/v) esterilizada (120°C/ 15 psi / 3 h), las cuales constituyeron las unidades experimentales (Figura 1).



Figura 1.- Aspecto general de las unidades experimentales empleadas para la generación de la escala de severidad de la marchitez en el cultivo de chile bajo condiciones de invernadero.

Se emplearon un total de 50 unidades experimentales (UE). A los 59 días después del trasplante (DDT), 25 UE fueron inoculadas con 1 mL de una suspensión de zoosporas de la cepa CH11 de *P. capsici* (cepa muy virulenta aislada del estado de Michoacán), ajustada a una concentración de $1X10^4$ zoosporas mL^{-1} [5], la cual se inoculó en la base del tallo (Figura 2). Para asegurar la infección del fitopatógeno, las plantas inoculadas con *P. capsici* se inundaron durante 24 h colocando las macetas en charolas de plástico con agua. A las 25 UE restantes no se les inoculó el fitopatógeno.



Figura 2.- Inoculación de *Phytophthora capsici* ($1X10^4$ zoosporas mL^{-1}) en la base del tallo de plantas de chile. Nótese que las UE fueron colocadas en una charola para tratar por 24 h con saturación de agua con el fin de promover la infección del patógeno.

Cuatro días después de la inoculación con *P. capsici*, se realizó un registro fotográfico y escrito de la

sintomatología que mostraron las plantas. Se tomó en cuenta los síntomas visuales como: caída de hojas (defoliación), hojas enrolladas y marchitas, hojas cloróticas, presencia de necrosis en las raíces, necrosis en la base del tallo y de hojas; finalmente la muerte de la planta. Para lo anterior se hicieron muestreos destructivos donde se eliminaron diariamente dos plantas infectadas con *Phytophthora capsici* y dos plantas controles para comparar la severidad de la enfermedad a nivel radical en plantas sanas y enfermas. Con base en la sintomatología de la enfermedad, se propuso una escala cualitativa ordinal de severidad con seis niveles (0-5). Finalmente la escala fue validada al reaislar al fitopatógeno de tejido enfermo y re-infectarse nuevamente en plantas sanas para el cumplimiento de los postulados de Koch (Figura 3).

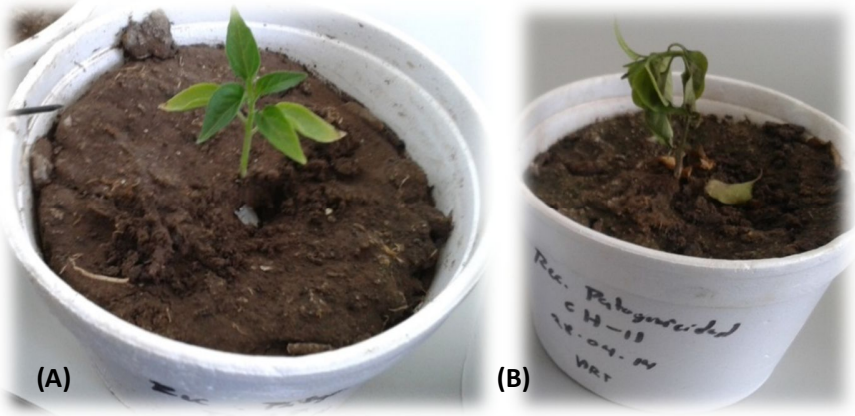
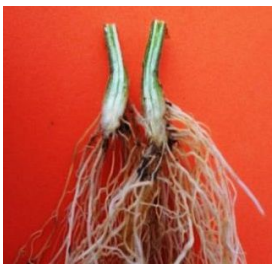


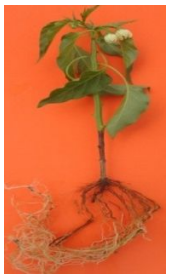
Figura 3.- Aspecto general de la pruebas para la comprobación de los postulados de Koch. (A) Re-infección de *P. capsici* en plantas sanas; (B) marchitez causada después de la re-infección.

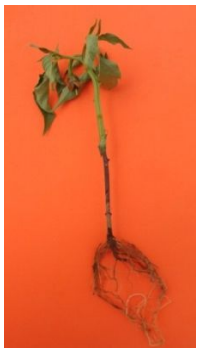
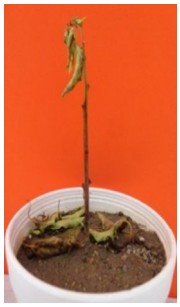
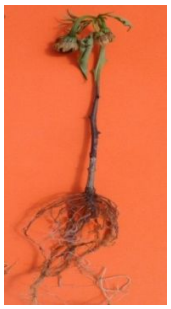
RESULTADOS

En la Tabla 1 se presenta la escala cualitativa ordinal de severidad de la marchitez provocada por *P. capsici* que se generó de acuerdo al registro de la sintomatología en plantas de chile poblano variedad San Luis bajo condiciones de invernadero. Esta escala contempló 6 niveles partiendo desde el nivel 0 (planta sana), hasta el nivel 5 (planta muerta), en la Tabla 1 se muestra el nivel de severidad de la marchitez en planta en maceta, planta completa y el sistema radical mediante imágenes comparativas entre los diferentes niveles de daño, así como la descripción detallada de los mismos.

Tabla 1. Propuesta de escala cualitativa ordinal de severidad (virulencia) de la marchitez provocada por *Phytophthora capsici* en plantas de chile poblano variedad San Luis en invernadero.

NIVEL	DESCRIPCIÓN	PLANTA EN MACETA	PLANTA COMPLETA	SISTEMA RADICAL
0	Planta sana: hojas turgentes y de color verde intenso, tallo erguido. Sistema radical sano y abundante, no se observa necrosis en haces vasculares.			

1	Marchitez leve: planta con hojas encorvadas, y poco turgentes. Tallo con necrosis en la zona basal, visible únicamente realizando un corte longitudinal. Necrosis en la zona basal del tallo.			
2	Marchitez moderada: planta con hojas encorvadas y poco turgentes, hasta un 20% de hojas desprendidas. Tallo con necrosis avanzada hasta un 20%. Necrosis en la zona basal las raíces secundarias y haces vasculares.			
3	Marchitez avanzada: planta con hojas encorvadas y poco turgentes, hasta un 50% de hojas desprendidas. Tallo con necrosis en hasta un 40%. Necrosis en raíces secundarias y haces vasculares hasta en un 40% de su longitud (pérdida del 30% del sistema radical). La planta puede desprenderse del sustrato con facilidad. El crecimiento se detiene.			

4	Marchitez muy avanzada: planta con hojas muy encorvadas, poco turgentes y con más de 50% desprendidas. Necrosis del tallo mayor a un 50% de su longitud. Sistema radical con necrosis casi en su totalidad, (pérdida del 50% del volumen radical). La epidermis de las raíces se desprende con facilidad. Se observa tejido degradado en los haces vasculares.			
5	Marchitez severa: planta muerta. Hojas secas con un 90 a 100% desprendidas. Tallo con necrosis casi en su totalidad, rígido. Sistema radical necrótico, raíces con epidermis desprendida (pérdida del 70% del volumen radical). Se observa tejido degradado en los haces vasculares.			

DISCUSIÓN

La escala resultante (6 niveles) partiendo desde el nivel 0 (planta sana) hasta el nivel 5 (planta muerta) concuerda con el número de niveles descritos en los trabajos reportados en la literatura [4; 5 y 6]. Kim y colaboradores en 1989, reportaron una escala de severidad con seis niveles de *P. capsici* en plantas de pimiento bajo condiciones de invernadero donde la concentración de zoosporas por mL que emplearon fue de $1X10^4$ mL^{-1}, sin embargo a diferencia de este trabajo, ellos inocularon 20 mL en el sustrato, lo cual representa una cantidad 20 veces mayor que la reportada en este estudio. Esto afectaría la velocidad de la infección y progresión de la enfermedad haciendo más difícil la distinción entre los distintos niveles evaluados. Por otro lado, Sanogo [7] emplea una escala de severidad por *P. capsici* propuesta por Ristaino [5] con modificaciones, para evaluar el daño de la enfermedad en plantas de pimiento sometidas a estrés salino. Esta escala conserva los mismos niveles de severidad que la escala propuesta por [5], sin embargo simplifica la descripción de la sintomatología únicamente a la presencia de necrosis

del tallo y el porcentaje de defoliación hasta planta muerta. Este tipo de modificaciones a escalas de severidad propuestas con anterioridad podrían permitir la estandarización a las condiciones experimentales en las que se desarrolla un ensayo, sin embargo la descripción detallada es necesaria para una evaluación con mayor precisión. Finalmente esta escala de severidad para *P. capsici* podría permitir una descripción más detallada de la sintomatología mostrada en el sistema radical de las plantas de chile (necrosis y pérdida del volumen radical), esto debido a que por lo general las escalas descritas en la literatura se basan en la descripción de la necrosis del tallo, clorosis, necrosis en hojas y defoliación.

CONCLUSIONES

Se generó una escala cualitativa ordinal de severidad (virulencia) de la marchitez provocada por *Phytophthora capsici* en plantas de chile poblano variedad San Luis bajo condiciones de invernadero, la cual podría ser empleada en la evaluación del daño de la enfermedad en ensayos sobre el control o manejo de la enfermedad bajo estas condiciones experimentales.

AGRADECIMIENTOS

Al Fondo Mixto de Fomento Científico y Tecnológico CONACYT-Gobierno del Estado de Aguascalientes por el financiamiento del proyecto "Desarrollo de una tecnología para el control biológico de la marchitez del chile por medio de actinomicetos nativos del estado de Aguascalientes" con el número de proyecto 2011-02-181930. A la Dra. Sylvia Patricia Fernández Pavia por facilitar la cepa CH11 de *Phytophthora capsici*. Alfredo Reyes-Tena, agradece a CONACYT por la beca para estudios de maestría.

REFERENCIAS

[1] Li, Z., Long, W., Zheng, J., Lei, J. (2007). "Isolation and identification of *Phytophthora capsici* in Guangdong province and measurement of their pathogenicity and physiological race differentiation", Front. Agric. China. 1: 377-381.

[2] Segarra, G., Avilés, M., Casanova, E., Borrero, C., Trillas, I. (2013). "Effectiveness of biological control of *Phytophthora capsici* in pepper by *Trichoderma asperellum* strain T34", Phytopathol. Mediterr. 52: 77-83.

[3] Ozgonen, H., Erkilic, A. (2007). "Growth enhancement and phytophthora blight (*Phytophthora capsici* Leonian) control by arbuscular mycorrhizal fungal inoculation in pepper", Crop Prot. 26: 1682-1688.

[4] Kim, Y.J., Hwang, B.K., Park, K.W. (1989). "Expression of age-related resistance in pepper plants infected with *Phytophthora capsici*", Plant Dis. 73: 745-747.

[5] Ristaino, J.B. (1990). "Intraespecific variation among isolates of *Phytophthora capsici* from pepper and cucurbit fields in North Carolina", J. Phytopathol. 80: 1253-1259.

[6] Kook-Lee, B., Seok-Kim, B., Wong-Chang, S., Kook-Wang, B. (2001). "Aggressiveness to pumpkin cultivars of isolates of *Phytophthora capsici* from pumpkin and pepper", Plant Dis. 85: 497-500.

[7] Sanogo, S. (2004). "Response of chile pepper to *Phytophthora capsici* in relation to soil salinity", Plant Dis. 88: 205-209.

RUST SEVERITY (*Uromyces ciceri arietini* Grognon) IN CHICKPEA LEAVES

(Severidad de la roya (*Uromyces ciceri arietini* Grognon) en hojas de garbanzo)

Carlos Patricio Sauceda-Acosta*[a], Raúl Hipólito Sauceda-Acosta[b], Jose Guadalupe Quintana-Quiroz[a], Francelia Acosta-Cota[c], Alberto Borbón-Gracia[b], Bardo Heleodoro Sánchez-Soto[c+].

[a] Colegio de Ciencias Agropecuarias - Facultad de Agricultura del Valle del Fuerte, Universidad Autónoma de Sinaloa.
[b] Campo Experimental Valle del Fuerte, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias
[c] Facultad de Agricultura del Valle del Fuerte, Universidad Autónoma de Sinaloa.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: bardosanchez@hotmail.com

Área del Conocimiento: Fitopatología.

ABSTRACT
Visual estimation of disease severity needs to be replaced by objectives, repeatable methods to provide quantitative information. Digital image processing and analysis (PAI) is an alternative, so that the objective of this study was to measure the severity of rust (*Uromyces ciceri arietini* Grognon) in chickpea (*Cicer arietinum* L.) leaves cvs. Blanco Sinaloa 92, Costa 2004, Jumbo and Blanoro. The evaluation was by PAI and compared with the visual estimate (EST, %) in 24 naturally infected leaves, collected at random. The leaves image color was obtained with scanner, PAI was performed using ImageJ 1.48r software free. Leaf area (mm^2) damaged area (mm^2), number, size (mm^2) and shape of the lesions was measured. The actual severity (MED, %) was calculated. Both methods were correlated ($R^2 = 0.77$, $P \leq 0.01$), but there overestimation with EST. There were differences in the average size of the lesions in genotypes Blanco Sinaloa 92 and Costa 2004 ($H = 8.42$, $P \leq 0.038$). The number of lesions was 0 - 54 and the size ranged from 0.05 to 1.43 mm^2. The severity of rust in chickpea leaves can be measured by PAI and is a fast and accurate option.

Keywords: Estimation, lesions, severity, images.

RESUMEN
La estimación visual de la severidad de las enfermedades requiere ser sustituida por métodos objetivos, repetibles, que proporcionen información cuantitativa. Una alternativa es el procesamiento y análisis de imágenes digitales (PAI), por lo que el objetivo del presente estudio fue medir la severidad de la roya (*Uromyces ciceri arietini* Grognon) en garbanzo (*Cicer arietinum* L.) cvs. Blanco Sinaloa 92, costa 2004, Jumbo y Blanoro. La evaluación fue mediante el PAI y se comparó con la estimación visual (EST, %), realizada en 24 hojas infectadas en forma natural, colectadas al azar. La imagen a color de las hojas se obtuvo con escáner, el PAI se realizó con el programa libre Imagej 1.48r. Se midió el área de la hoja (ATH, mm^2), área dañada (ADH, mm^2), número (NTL), tamaño (TAM, mm^2) y forma de las lesiones. Se calculó la severidad real (MED, %). Ambos métodos estuvieron correlacionados ($R^2 = 0.77$, $P \leq 0.01$), pero hubo sobrestimación con EST. Hubo diferencias en el tamaño medio de las lesiones en los genotipos

Blanco Sinaloa 92 y Costa 2004 (H = 8.42, P ≤ 0.038). El número de lesiones fue de 0 a 54 y el tamaño fue desde 0.05 a 1.43 mm^2. La severidad de roya en garbanzo se puede medir mediante PAI y es una opción rápida y precisa.

Palabras Clave: Estimación, lesiones, severidad, imágenes.

INTRODUCCIÓN

La roya en garbanzo causada por *Uromyces ciceri arietini* (Grognon) Jacz es una enfermedad que se presenta en todas las áreas productoras de garbanzo y puede causar pérdidas en rendimiento y calidad. Las infecciones al final del ciclo del cultivo tiene poco efecto sobre los componentes de rendimiento, pero en niveles de severidad altos y en etapas tempranas de desarrollo del cultivo las perdidas llegan a ser considerables [1].

Las pústulas en tallos y hojas son de tamaño variable y pueden llegar a cubrirlos en su totalidad, los primeros signos de la enfermedad aparecen en las partes bajas de las plantas al iniciarse la floración. La severidad de la roya se puede evaluar con el empleo de claves diagramáticas que muestran un aumento progresivo de la enfermedad. La evaluación visual se utiliza debido a su sencillez, rapidez y bajo costo, pero que presenta limitaciones en cuanto a repetitividad, confiabilidad y precisión [2].

La cuantificación confiable y exacta es necesaria en la selección de nuevos cultivares, en el estudio de los factores que afectan el desarrollo de una enfermedad, en la evaluación de la eficacia relativa de alguna medida de control y en la definición de umbrales económicos [3]. La medición real es cada vez más utilizada y factible debido al avance en el desarrollo de tecnologías, en la actualidad existen numerosos estudios sobre el procesamiento de imágenes digitales (PAI) para la identificación y cuantificación de las enfermedades; además, permiten conocer el número, tamaño, color y forma de las lesiones [4, 5]. Aunque la estimación visual es común porque el procesamiento de imágenes requiere de intervención por el usuario y el alto precio de los programas especializados [6]. El objetivo del presente estudio fue medir la severidad de la roya en garbanzo mediante PAI.

METODOLOGÍA

Los foliolos de diez hojas de garbanzo infectadas en forma natural con roya se colectaron el 8 de marzo de 2015 en plantas de los cultivares Blanco Sinaloa 92, costa 2004, Jumbo y Blanoro. Se realizó la evaluación visual de la severidad (EST) con escala arbitraria (1 a 100%) en el cultivar Blanco Sinaloa 92 y para todos se hizo una estimación con el uso de la escala de nueve clases (Cuadro 1) propuesta por BIGMP (Biodiversity and Integrated Gene Management Program International. Legume International nurseries and trials) para evaluar la respuesta de genotipos a la roya [7].

Cuadro 1. Escala para evaluar la respuesta de la severidad de la roya en garbanzo.

Clases	Calificación	Descripción del síntoma y daño
1	Altamente resistente (AR)	Pústulas no visibles
3	Resistente (R)	Pocas pústulas, detectadas después de una cuidadosa exploración
5	Moderadamente (MR) resistente	Pústulas expandidas sobre hojas y fácilmente observables, pero sin daño aparente
7	Susceptible (S)	Pústulas muy expandidas y daños, pocas pústulas sobre peciolos y tallos

9	Altamente susceptible (AS)	Pústulas extendidas sobre toda la planta, muerte de algunas hojas y otras partes de la planta

La severidad de la enfermedad en cada genotipo, se calculó mediante la siguiente fórmula.

$$\text{Severidad (\%)} = \sum\left(\frac{1(n)+3(n)+5(n)+7(n)+9(n)}{9N}\right)100.$$

Dónde: 1, 3, 5, 7 y 9 = clases de la escala propuesta para evaluar el daño de la roya en garbanzo.
n= número de hojas que se calificaron en la clase de escala propuesta (Cuadro 1).
N= número total de hojas evaluadas.

Para medir la severidad de las mismas muestras de foliolos, se digitalizaron con escáner de cama plana, se guardaron en formato jpeg a color (RGB), con 300 ppp de resolución (2544 x 3508 pixeles) y se estimó la escala (11.81 pixeles por mm). El procesamiento de las imágenes fue con el software Imagej Ver. 1.48r. La segmentación de las imágenes en el espacio de color HSB, la diferenciación entre área sana y enferma se obtuvo mediante el ajuste de los umbrales, para H (tono) el mínimo fue 5 y el máximo 17, para S (saturación) 101 y 223, para B (brillo) 57 y 158. Se midió el área de la hoja (AS), el área dañada (AD), el número (NTL) y forma de las lesiones (0=polígono alargado, 1=cilíndrica). La severidad obtenida mediante el PAI (AD/AS)*100) se consideró como la real (MED).

Los datos se analizaron con Infostat 2015 [8], los valores de severidad, el tamaño, numero, perímetro y forma de las lesiones no presentaron normalidad y homogeneidad de varianzas, ni con transformación, por lo que se utilizó ANDEVA no paramétrico de Kruskal-Wallis (H), con los valores medios de la severidad medida y estimada se comparó mediante regresión.

RESULTADOS

La severidad (MED) fue desde cero hasta 1.21 %, sin diferencias significativas entre genotipos (H^2= 7.05, P = 0.0697). Los foliolos midieron de 485.27 a 3028.69 mm^2. El número de lesiones fue de 0 a 54 y el tamaño fue desde 0.05 a 1.43 mm^2. Las lesiones muestran forma circular con valores alrededor de 0.7.

La severidad evaluada con el método visual sobrestima hasta en 376.19 %, con mayor sobrestimación a menor severidad (Figura 1). La sobrestimación de la severidad mediante la evaluación visual cuando los niveles de infección son bajos ya se ha reportado [11]. Asimismo condiciones como fatiga, falta de concentración y de experiencia incrementa el carácter subjetivo de la estimación visual [12]. Hay correlación lineal positiva entre la severidad medida (MED) con el PAI y la estimada (EST) con el método visual (R^2 = 0.77, P ≤ 0.01) y entre la MED y las diferencias porcentuales de las estimaciones (R^2 = 0.90, P ≤ 0.01).

La escala arbitraria utilizada para evaluar roya en el cultivar Blanco Sinaloa 92 mostró una estrecha relación positiva con la severidad medida (Figura 2), pero con sobrestimación desde 287.64 hasta 755.37 %. El tamaño medio de las lesiones fue mayor en Blanco Sinaloa 92 y Costa 2004 (H = 8.42, P ≤ 0.038).

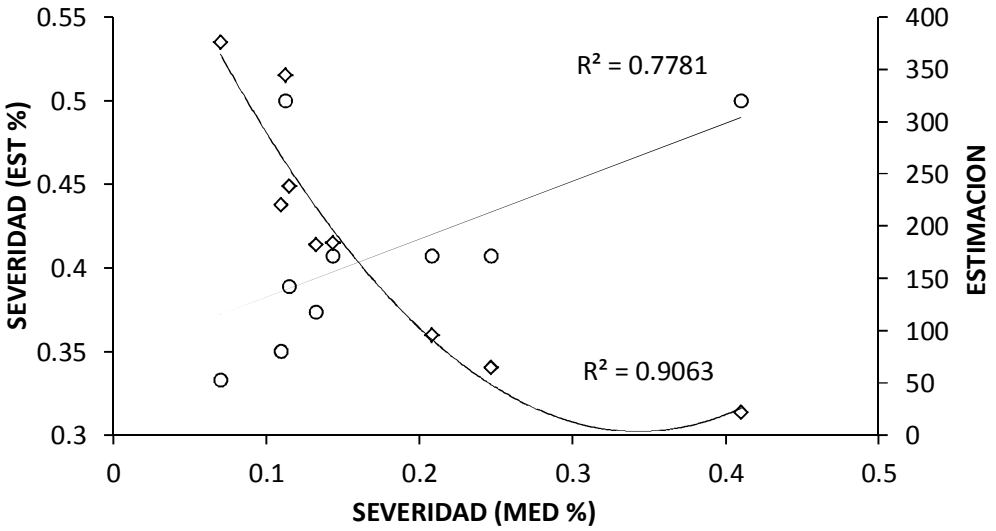


Figura 1. Relación entre la severidad medida con PAI (MED) y estimada con base en la escala BIGMP (EST= 0.4818(MED) + 0.3026) y regresión cuadrática negativa con las diferencias porcentuales entre la MED y las diferencias porcentuales de las estimaciones (ESTIMACION = 4386.8(MED)^2 - 2978.4(MED) + 512.29).

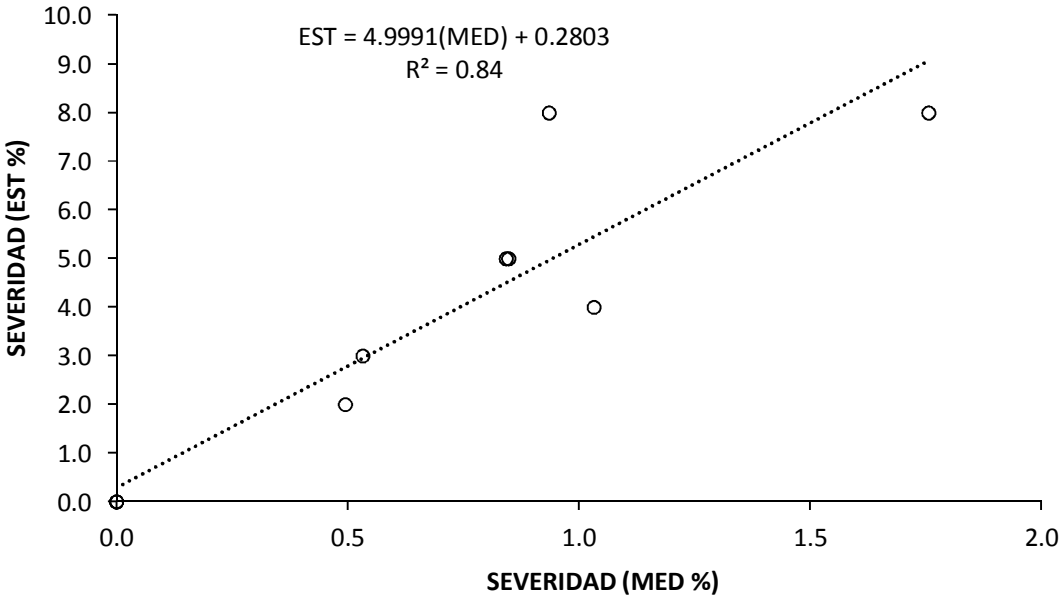


Figura2. Relación entre la severidad medida con imágenes (MED) y estimada con base a la escala arbitraria (EST).

DISCUSIONES

El tamaño de las lesiones obtenidas en este estudio son más pequeñas a las reportadas en trigo para roya de la hoja de 0.7 y 4.7 mm2 [9], donde también se han obtenido lesiones con tamaño mínimo de

0.48 y máximo 3.4 mm2 [10]. El nivel de severidad influye en el tamaño de las lesiones porque cuando es alto, ocurre las pústulas se unen y forman áreas de mayor tamaño.

La estrecha relación que existe entre la severidad medida y la estimada con la escala BIGMP pone en manifiesto la utilidad de esta escala descriptiva para evaluar la severidad de la roya en garbanzo, al igual que con el uso de escalas diagramáticas se mejora la precisión y la exactitud en la estimación de la severidad de roya en soya [13]. Las estimaciones visuales con la escala arbitraria muestran relación directa con la MED, sin embargo, existe una carencia en la exactitud, la cual se reduce con la escala BIGMP.

La medición de la severidad con el PAI es rápida, se requieren aproximadamente 25.64 s para todo el proceso, aunque el tiempo depende del hardware y software utilizado, así también del tamaño de las imágenes. El PAI también permite precisión porque mide la superficie total de la hoja y el área dañada real. Las estimaciones visuales son de utilidad dependiendo de la necesidad de precisión del estudio y debido a que las escalas diagramáticas mejoran dicha exactitud, es factible crear una escala para roya en garbanzo mediante el PAI, tal como se ha realizado para diversas enfermedades [14, 15, 16].

CONCLUSIONES

La medición de severidad de roya en garbanzo se puede medir mediante el procesamiento de imágenes digitales, además permite caracterizar las lesiones.

REFERENCIAS

[1] Sillero, J. C., Moreno A. I. and Rubiales D. (2012). Identification and characterization of resistance to rust (Uromyces ciceris-arietini (Grognot) Jacz. & Boyd) in a germplasm collection of Cicer spp. Euphytica. 188:229–238.

[2] Navarro J. R. y Arauz L. F. (1999). Exactitud y repetitividad de dos métodos para la evaluación de la severidad de enfermedades fungosas en el fruto de la papaya (Carica papaya). Agr. Costarricense 23(1):89-96.

[3] Kranz, J. (1988). Measuring Plant Disease. In: J. Kranz, and J.Rotem, (Eds.). Experimental Techniques in Plant Disease Epidemiology, Berlin:Springer. pp. 35-50.

[4] Zhang, F. (2013). Feature Extraction Method for Wheat Diseases Based on Multi-fractal Spectrum. Proceedings of the 2nd International Conference on Computer Science and Electronics Engineering. Paris, France. Pp 3061-3064.

[5] Rathod, A. N., B. A. Tanawal and Shah V. H. (2013). Image Processing Techniques for Detection of Leaf Disease. Inter. Journal of Advanced Research in Computer Science and Software Engineering 3(11):397-399.

[6] Barbedo, J. G. A. (2013). Digital image processing techniques for detecting, quantifying and classifying plant diseases. SpringerPlus. 2:660.

[7] Cárdenas, T. R. M. y de la Fé M. C. F. (2013). Respuesta de genotipos de garbanzo (Cicer arietinum Lin.) a la roya (Uromyces ciceris-arietini (Grognot) Jacz. & Boyd) y su relación con el tipo de hoja. Cultivos Tropicales. 34(4): 50-54.

[8] Di Rienzo, J. A., Casanoves F., Balzarini M. G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C. W. (2015). InfoStat versión 2015. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL http://www.infostat.com.ar

[9] Robert, C., Bancal M. O. and Lannou C. (2002). Wheat leaf rust uredospore production and carbon and nitrogen export in relation to lesion size and density. Phytopathology 92:762-768.

[10] Robert, C., Bancal, M. O. and Lannou, C. (2004). Wheat leaf rust uredospore production on adult plants: Influence of leaf nitrogen content and Septoria tritici blotch. Phytopathology 94:712-721.

[11] Kwack, M. S., Kim E. N., Lee H., Kim, J.-W., Chun, S.-C., Kim K. D. (2005) Digital image analysis to measure lesion area of cucumber anthracnose by Colletotrichum orbiculare. J. Gen. Plant Pathol. 71:418-421.

[12] Mirik, M., G. J. Michels Jr., S. Kassymzhanova-Mirik, N.C. Elliott, V. Catana, D.B. Jones and Bowling R. (2006). Using digital image analysis and spectral reflectance data to quantify damage by greenbug (Hemitera: Aphididae) in winter wheat, Computers and Electronics in Agriculture, 51(1–2): 86-98.

[13] Godoy, V. C., L. Koga J. and M. Canteri G. (2006). Diagrammatic scale for assessment of soybean rust severity. Fitopatologia Brasileira, 31(1): 63-68.

[14] Pedroso, C., Lage D. A. C., Henz G. P. and Café-Filho A. C. (2011). Development and validation of a diagrammatic scale for estimation of anthracnose on sweet pepper fruits for epidemiological studies. Journal of Plant Pathology. 93(1), 219-225.

[15] Scapin, B. C. R., Angelotti F., Vieira R. A., Bogo A., Tessmann D. J. and Perreira de Bem B. (2014). Elaboration and validation of a diagrammatic scale to assess downy mildew severity in Grapevine. Ciência Rural, Santa Maria. 44 (8):1384-1391.

[16] Michereff, S. J., Noronha M. A., Lima G. S.A., Albert I. C. L., Melo E. A. and Gusmão L. O. (2009). Diagrammatic scale to assess downy mildew severity in melon. Horticultura Brasileira. 27: 076-079.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

EVALUATION OF BIOLOGY EFECTIVINESS ON RESCATE 20 S INSECTICIDE FOR CONTROLLING WHITE FLY (*Bemisia tabaci)* ON JALAPEÑO PEPPER (*Capsicum annuum*) IN ZAMORA, MICHOACAN

(Evaluación de la efectividad biológica del insecticida Rescate 20 ps (acetamiprid) para el control de mosca blanca (*Bemisia tabaci*) en chile jalapeño en Zamora, Michoacán)

Pedro Posos Ponce[+a], Adrian Montoya Ramos[b], Benito Monroy Reyes[a], Omar Alejandro Posos Parra*[c] Gustavo Enciso Cabral[a].

[a] Departamento de Producción Agricola del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Guadalajara.
[b] Facultad Agroforestal, Universidad de Guantánamo.
[c] Departamento de Bioingenierías del Tecnológico de Monterrey, Campus Guadalajara.

*Autor que presentó.
+Autor para correspondencia: ppozos@prodigy.net.mx

ABSTRACT
In order to evaluate Rescate 20 S Acetamiprid Insecticide for controlling white fly *(Bemisia tabaci),* both immature stages and adult it was established a trial near to Zamora, Michoacán. It was set using a randomized block design with eight treatments and four replicas. The crop was Jalapeño pepper *(Capsicum annuum)* "Grande" variety. There were evaluated six Acetamiprid dosages, from 150 to 400 g. of commercial product versus Endosulfan Insecticide at 1.5 L/ha dosages. There were realized five samples, one previous and four in post-application and also three applications with an interval of 7 days between them. Best dosages for controlling white fly *Bemisia tabaci* adults were Acetamiprid at 350 and 400 g. of active ingredient/hectare. Best dosages to control immature stages were 200 to 400 g. of active ingredient/hectare. No one treatment caused phytotoxicity on crop.

Keywords: Acetamiprid, *Bemisia tabaci*, Pepper, Endosulfan.

RESUMEN
Con el fin de evaluar el insecticida Rescate (Acetamiprid) para el control de Mosca Blanca (*Bemisia tabaci*), tanto de adultos como de estados inmaduros, se estableció un experimento en la zona de Zamora, Michoacán, utilizando diseño de bloques al azar con ocho tratamientos y cuatro repeticiones. El cultivo fue Chile Jalapeño (*Capsicum annuum*) Variedad Grande, donde se evaluaron 6 dosis de acetamiprid que van desde 150 hasta 400 g. de producto comercial por hectárea, comparándolo con el insecticida endosulfán en dosis de 1.5 litros por hectárea. Se realizaron cinco muestreos, uno previo y cuatro de postaplicación, además se realizaron tres aplicaciones con intervalos de 7 días entre ellas. Para controlar adultos de mosca blanca *Bemisia tabaci* las mejores dosis fueron las de 350 y 400 g. de ingrediente activo de acetamiprid por hectárea. Para el control de las ninfas los mejores tratamientos fueron a partir de 200 g. hasta los 400 g. de Acetamiprid. Ningún tratamiento causó fitotoxicidad al cultivo.

Palabras Clave: Acetamiprid, *Bemisia tabaci*, Chile, Endosulfán.

INTRODUCCIÓN

En la región Centro-Sur del estado del país (Jalisco-Michoacán), se cultivan alrededor de 6,385 hectáreas de chile jalapeño, *Capsicum annuum* L. [1], el cual es uno de los cultivos principales de la región para consumo interno del país y de exportación, empleando a casi cuatro millones de jornales al año [2]. La presencia de mosca blanca en los sembradios es a causa de diversos factores, por lo tanto, es clasificada como un problema de alta importancia. Uno de sus complicaciones más frecuentes en los cultivos es el daño directo ocasionado por ninfas y adultos, ya que al succionar la savia de las plantas, llegan a causarles debilitamiento, de tal manera que puede ocasionar la muerte de la planta, sobre todo en sembradíos con altas poblaciones. Además las mielecillas que excretan en ambos estadios biológicos sirven como sustrato para el desarrollo de la fumagina, la cual al cubrir el área foliar provoca trastornos en la fotosíntesis y en la respiración, reduciendo el vigor de la planta [3] y [4]. También se alimenta de la savia de las hojas y es uno de los principales transmisores de virus y gemivirus [5]. Un ataque no controlado de estos insectos, dependiendo de su nivel de incidencia, puede causar grandes pérdidas al cultivo. Por otra parte el picudo del chile, *Anthonomus eugenii* Cano, y la mosca blanca *Bemicia tabaci* son las principales plagas que atacan al cultivo de las diferentes variedades de chile que se cultivan en México y sur de Estados Unidos [6] y [7]. El daño causado por el adulto de dicha especie es al momento de alimentarse directamente de las flores y frutos, mientras que la larva se alimenta directamente de la parte interna del fruto y causa una madurez prematura y caída de éste [8] y [9]. El uso intensivo de insecticidas químicos convencionales es la práctica más común para controlar esta plaga en México, y la aplicación es dirigida solo a los adultos [10]. El manejo inadecuado de este insecto empleando plaguicidas eleva los costos de producción por no aplicarlos a en el momento adecuado por lo que se incrementa el número de aplicaciones, hasta 15 por ciclo [11] y [12]. Además, el uso continuo de una sola clase de insecticidas puede generar resistencia a dichos grupos químicos e incrementar la contaminación ambiental [13]. Algunos insecticidas convencionales han sido estudiados con el fin de evaluar la susceptibilidad y nlos iveles de resistencia [14], [15], [16], [17], [18] y [19]. También, cierta tendencia ha sido aplicar plaguicidas que tienen un efecto de control focalizado sobre el insecto ó plaga de interés, pero sin efecto perjudicial a enemigos naturales, un ejemplo de dichos plaguicidas es el *Bacillus thuringiensis* (Bt), que son clasificados como insecticidas biorracionales [20], y en la pasada década, se han estudiado sus alcances para el control del plagas en el culitvo chile [15], [21], [22], [23], [24] y [25]. Se han llevado acabo estudios de insecticidas en varias regiones del país; sin embargo, no se ha reportado ninguno específico para la región de Zamora, Michoacán. En base a los daños causados por mosca blanca en el cultivo de chile se planteó el siguiente objetivo, evaluar la efectividad biológica del Insecticida Rescate 20% (acetamiprid) en comparación de un testigo regional y de un testigo absoluto, para el combate de mosca blanca *Bemisia tabaci* en el cultivo de chile jalapeño *Capsicum annuum* en el poblado de Zamora, Michoacán.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento quedó establecido en la zona de La Ladera, municipio de Zamora, Michoacán en el predio del señor Alejandro Melgoza. En un cultivo de chile jalapeño *Capsicum annuum* variedad Grande con 30 días de trasplantado.

Los tratamientos evaluados se muestran en la *tabla 1*.

Tabla 1. Tratamientos evaluados.

Tratamiento	Dosis por Hectarea	Gr. i.a./ha.
1. Rescate* (acetamiprid)	150 g. P.C.	30.0

2. Rescate (acetamiprid)	200 g. P.C.	40.0
3. Rescate (acetamiprid)	250 g. P.C.	50.0
4. Rescate (acetamiprid)	300 g. P.C.	60.0
5. Rescate (acetamiprid)	350 g. P.C.	70.0
6. Rescate (acetamiprid)	400 g. P.C.	80.0
7. Thiodan 35 CE (endosulfan)	1.5L/ha	525.0
8. Testigo Absoluto	0.0	0.0

El experimento se llevó a cabo bajo el diseño de bloques completamente al azar con ocho tratamientos y cuatro repeticiones. El tamaño de cada unidad experimental fue de cuatro surcos (con una separación de 1.0 metros), y 6 metros de largo para dar una área de 24.0 m^2 por unidad experimental; utilizado cuatro repeticiones nos da 96.00 m^2 por tratamiento, haciendo un total de área efectiva del ensayo completo de 768 m^2 evaluando ocho tratamientos. El ensayo se estableció del 18 de agosto al 19 de septiembre del año 2014. La aplicación se llevó a cabo cuando el cultivo contaba con 30 días de haberse trasplantado y con la presencia de la plaga. Se llevaron a cabo tres aplicaciones de los tratamientos con un intervalo de 7 días, teniendo un gasto de agua de 210 L/ha, en la primera aplicación; 245 L/ha, en la segunda aplicación y 330 L/ha en la tercera aplicación.

Se realizaron cinco evaluaciones, una previa antes de la primera aplicación y tres más a los 7 días posteriores de cada una de las aplicaciones. Y una última a los 14 días después de la última aplicación.

Método de Evaluación

1. Porcentaje de eficacia biológica.

Del surco central de cada unidad experimental se determinó el número de adultos y ninfas por hoja, realizándolo de la siguiente manera:

a) Adultos.

A temprana hora del día se tomaron al azar 10 hojas de cada unidad experimental y se cuantificó el número de adultos, para así tener en promedio 40 hojas muestreadas por tratamiento.

b) Ninfas.

Una vez terminado el muestreo respectivo de adultos, se muestreó nuevamente cada unidad experimental y se tomaron al azar 10 hojas del surco central de cada unidad experimental, las que se colocaron en bolsas de papel de estraza, a su vez estas en una hielera y se procedió a trasladarlas al laboratorio para así más tarde con ayuda de un microscopio estereoscopio Carl Zeiss, cuantificar el número de ninfas y adultos por hoja.

Una vez terminado lo anterior, se procedió a calcular la eficacia biológica mediante la fórmula de Abbott [26].

$$\% \, Eficacia = \frac{(A - B)}{A} * 100$$

donde:

A = No. adultos o ninfas vivas en el testigo.

B = No. adultos o ninfas vivas en el tratamiento.

Análisis Estadísticos

Una vez obtenida toda la información del ensayo se procedió a realizar los Análisis de Varianza y Pruebas de Medias de Tukey al 5% de significancia con el apoyo del paquete estadístico Agricultural Research Management [27].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el muestreo previo se tenía una población de 2.0 adulto por hoja y de 2.6 ninfas por hoja. En el testigo sin aplicar, al final se obtuvo una población de 8.9 adultos por hoja y 8.2 ninfas por hoja. Considerándose una incidencia de plaga suficiente para poner a prueba los tratamientos en cuestión, lo que significa que la presión de la plaga durante el experimento fue suficiente para medir la efectividad biológica de los productos en cuestión. Con los datos del muestreo previo, se realizó el análisis de varianza y no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, lo cual permitió establecer el experimento bajo el diseño experimental antes propuesto.

La *Tabla 2* corresponde al porciento de control de adultos de mosca blanca, se observa que después de tres aplicaciones de los tratamientos con intervalos de 7 días no se observan diferencias significativas entre los tratamientos; sin embargo, sí hay diferencias numéricas entre los tratamientos. Hay que señalar que los mejores tratamientos después de tres aplicaciones y en intervalos de 7 días, fueron: el tratamiento 5 Rescate (acetamiprid 70.0 g. i.a./ha) y el tratamiento 6 Rescate (acetamiprid 80.0 g. i.a./ha) con un control promedio de 88%, seguidos del tratamiento 3 Rescate (acetamiprid 50.0 g. i.a./ha) y el tratamiento 4 Rescate (acetamiprid 60.0 g. i.a./ha) con 82% de control promedio; sin embargo, el tratamiento 1 Rescate (acetamiprid 30.0 g. i.a./ha), seguido del tratamiento 2 Rescate (acetamiprid 40.0 g. i.a./ha) con 77% de control después de los cuatro muestreos y tres aplicaciones. Posteriormente de la segunda aplicación, ya los controles fueron más consistentes en las dosis bajas que corresponden a estos tratamientos. Finalmente el testigo comercial, el tratamiento 7 Thiodan (endosulfan 525.0 g. i.a./ha). mostró controles del 71% durante el desarrollo del experimento. Estos resultados coinciden con los resultados obtenidos por [28] en donde evaluaron diferentes métodos de control de mosca blanca en chile y tomate. A su vez [29] realizaron diagnósticos de los insecticidas utilizados para controlar mosca blanca en chile donde coinciden que los neonicotinoides son los compuestos que han demostrado la mayor eficacia de control tanto en adultos como ninfas.

Hay que hacer notar que después de tres aplicaciones hay un efecto acumulativo del producto en la planta lo que permite espaciar las aplicaciones en periodos de 14 días, ya que los controles fueron muy similares al último muestreo después de la tercera aplicación.

Tabla 2. Análisis de Varianza y Pruebas de Medias de Tukey al 5% de significancia para el control de adultos de Mosca Blanca *(Bemisia tabaci).*

Tratamiento	g. i.a./ha.	Previo	7 DDA 1ª. Aplc.	7 DDA 2ª. Aplic.	7 DDA 3ª. Aplic.	14 DDA 3ª. Aplic.
1. Rescate	30.0	1.8 a	1.7**/53.0*b	1.0/83.0 b	1.3/78.0 b	1.8/78.0 b
2. Rescate	40.0	2.2 a	1.5/58.0 b	1.0/83.0 b	1.0/82.0 b	1.1/86.0 b
3. Rescate	50.0	2.4 a	1.0/74.0 b	1.0/83.0 b	0.9/83.0 b	1.1/87.0 b
4. Rescate	60.0	2.4 a	1.0/74.0 b	0.9/86.0 b	0.9/84.0 b	0.9/89.0 b
5. Rescate	70.0	1.9 a	0.7/81.0 b	0.7/89.0 b	0.5/92.0 b	0.7/91.0 b

6. Rescate	80.0	2.2 a	0.7/81.0 b	0.6/90.0 b	0.6/89.0 b	0.7/92.0 b
7. Thiodan 35 CE	525.0	2.4 a	1.4/60.0 b	1.4/78.0 b	1.2/79.0 b	1.2/86.0 b
8. Testigo Absoluto	0.0	2.0 a	3.6 a	6.3 a	5.7 a	8.2 a

*Porciento de control
** Adultos por tratamiento

Para el caso del porciento de control de ninfas de mosca blanca, se observa que a pesar de que no hay diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos, sí se observan diferencias numéricas (ver *Tabla 2*). Hay que señalar que todos los tratamientos a base de Rescate (acetamiprid) presentaron controles por arriba de 80% a excepción del tratamiento 7 correspondiente al testigo regional a base de Thiodan (Endosulfan 525 g. i.a./ha) con un control promedio de 77%. Hay que señalar que los tratamientos a base de Rescate se comportaron de la siguiente manera: el tratamiento 1 Rescate (acetamiprid 30.0 g. i.a./ha) mostró 80% de control, seguido del tratamiento 2 Rescate (acetamiprid 40.0 g. i.a./ha) y el tratamiento 3 Rescate (acetamiprid 50.0 g. i.a./ha) con 85% de control promedio; posteriormente el tratamiento 4 Rescate (acetamiprid 60.0 g. i.a./ha) y el tratamiento 5 Rescate (acetamiprid 70.0 gr. i.a./ha) con 91% de control promedio, y finalmente el mejor fue el tratamiento 6 Rescate (acetamiprid 80.0 g. i.a./ha) con 95% de control promedio después de tres muestreos y tres aplicaciones. Estos resultados coinciden con las investigaciones realizadas por [30], donde reportan que después de un estudio minucioso, se observo que los agricultores utilizan varias alternativas de control: el 38% utiliza metamidofós, el 28% utiliza imidacloroprid, el 14% cipermetrina, el 7% deltametrina, el 3,5% malatión y el 1% tiociclam; con excepción de aquellos que emplean imidacloroprid, acetamiprid, deltametrina y tiociclam, el resto de ellos (64%) utiliza insecticidas de baja o nula acción contra la mosca blanca.

En el último muestreo que se realizó a los 14 días después de la tercera aplicación, los controles se mantuvieron muy similares a los de los 7 días después de la tercera aplicación, lo que posiblemente indica es que después de dos o tres aplicaciones semanales seguidas, estas se pueden espaciar a aplicaciones cada 14 días como se observa en la *tabla 2* y *tabla 3*. Los resultados obtenidos fueron similares a los obtenidos por [31] en donde evaluaron diferentes insecticidas nicotinoides para el control de mosca blanca *Bemisia tabaci* en chile dulce bajo cubierta.

Tabla 3. Análisis de Varianza y Pruebas de Medias de Tukey al 5% de significancia para el control de ninfas de mosca blanca *(Bemisia tabaci).*

Tratamiento	**g. i.a./ha**	**Previo**	**7 DDA 1ª. Aplic.**	**7DDA 2ª. Aplic.**	**7 DDA 3ª. Aplic.**	**14 DDA 3ª. Aplic.**
1. Rescate	30.0	2.5 a	2.5**/64.0* b	0.9/87.0 b	1.1/85.0 b	1.4/84.0 b
2. Rescate	40.0	2.8 a	2.4/66.0 b	0.5/93.0 b	0.8/89.0 b	0.9/90.0 b
3. Rescate	50.0	3.0 a	1.9/72.0 b	0.5/93.0 b	0.6/91.0 b	0.9/90.0 b
4. Rescate	60.0	3.1 a	1.1/84.0 b	0.5/94.0 b	0.6/92.0 b	0.8/91.0 b
5. Rescate	70.0	3.0 a	1.1/84.0 b	0.4/94.0 b	0.3/96.0 b	0.5/94.0 b
6. Rescate	80.0	2.5 a	0.6/91.0 b	0.3/96.0 b	0.3/95.0 b	0.4/95.0 b
7. Thiodan 35 CE	525.0	2.4 a	2.4/66.0 b	2.1/70.0 b	1.2/84.0 b	1.1/88.0 b

8. Testigo Absoluto	0.0	2.6 a	7.0 a	7.1 a	7.4 a	8.9 a

*Porciento de control
** Adultos por tratamiento

CONCLUSIONES

1. En el experimento se presentó una incidencia considerable de mosca blanca *Bemisia tabaci* que fue de 5 adultos y 7 ninfas en promedio por hoja en el testigo sin aplicar, después de cinco muestreos, lo que permitió someter a prueba los diferentes tratamientos a base de Rescate 20% P.S. (acetamiprid).

2. Los mejores tratamientos para controlar adultos de mosca blanca fueron: en un primer grupo el tratamiento 5 Rescate (acetamiprid 70.0 g. i.a./ha) y el tratamiento 6 Rescate (acetamiprid 80.0 g. i.a./ha) con 88% de control promedio; en un segundo grupo tendríamos a el tratamiento 3 Rescate (acetamiprid 50.0 g. i.a./ha) y el tratamiento 4 Rescate (acetamiprid 60.0 g. i.a./ha) con 82% de control promedio.

3. Los mejores tratamientos para controlar ninfas de mosca blanca fueron el tratamiento el 6 Rescate (acetamiprid 80.0 g. i.a./ha) con 95% de control promedio, el tratamiento 4 Rescate (acetamiprid 60.0 g. i.a./ha) y el tratamiento 5 Rescate (acetamiprid 70.0 g. i.a./ha) con un control promedio de 91%, que son controles muy similares a los anteriores.

4. La dosis más baja de Rescate (acetamiprid) con un control significativo a mosca blanca *Bemisia tabaci* correspondiente al tratamiento 2 Rescate (acetamiprid 40.0 g. i.a./ha) y el tratamiento 3 Rescate (acetamiprid 50.0 g. i.a./ha) con 85% de control.

5. Ninguno de los tratamientos causó fitotoxicidad al cultivo.

6. Cuando se tengan poblaciones bajas de mosca blanca, se recomienda aplicar la dosis baja de Rescate (acetamiprid 30.0 g. i.a./ha).

7. El testigo regional, el tratamiento 7 Thiodan (endosulfan 525.0 g. i.a./ha) presentó un control promedio 77% después de tres aplicaciones.

REFERENCIAS

[1] **SAGARPA.** 2010. Servicio de información estadística agroalimentaria y pesquera (SIAP). http://www.siap.sagarpa.gob.mx/.

[2] **Luján, F. M., F. J. Quiñones, P., N. Chávez, S., C. Guigón, L., G. Ávila Q., y G. F. Acosta R. 2006.** *Manejo integral de chile jalapeño enfocado a incrementar su rentabilidad y sostenibilidad. Publicación especial número 12.* INIFAP — Delicias, Chihuahua, México.

[3] **Bellows, T. S., Jr. *et al.*, 1994.** Description of a species of *Bemisia (Homoptera: Aleyrodidae).*

[4] **Borror, D.J.; Ch. A: Triplehorn y N.F. Jhonsons, 1989.** An Introduction to the study of insects. Sixth Edition. Saunders College Publishing. USA. P. 312-349.

[5] **Posos Ponce, P., & Félix Fregoso, E.** (2004). *Mosquita blanca*. Guadalajara, Jal.: Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Departamento de Producción Agrícola.

[6] **Bujanos, R. 1993.** *Barrenillo del chile. Manejo integrado. Folleto para productores No. 1. Campo Experimental Norte de Guanajuato.* SARH, INIFAP, México.

[7] **Arcos, G., J. Hernández, D. E. Uriza, O. Pozo, y A. Olivera. 1998.** *Tecnología para producir chile jalapeño en la planicie costera del golfo de México. INIFAP-PRODUCE.* Secretaría de Agricultura, México. Folleto Técnico 24.

[8] **Rodríguez, A. M. L. 1991.** *Predicción de poblaciones de picudo del chile Anthonomus eugenii Cano (Coleoptera: Curculionidae) en función de sus requerimientos térmicos y su relación fenológica cultivo plaga.* Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias Agrícolas-UACH, México.

[9] **Riley, D. G., and A. N. Sparks. 1995.** *The pepper weevil and its management. Publication L5069.* Texas AgriLife Extension, Texas A&M University, College Station.

[10] **García-Nevárez, G., F. J. Quiñones-Pando, M. Luján-Favela, y N. Chávez-Sánchez. 2010.** *Manejo integrado de picudo del chile. Folleto técnico número 36.* INIFAP-Delicias, Chihuahua, México.

[11] **Pacheco, M. F. 1985.** Plagas de los cultivos agrícolas en Sonora y Baja California. INIA- Campo Agricola Experimental Valle del Yaqui. Libra Técnico 1.

[12] **Díaz, O., B. E. 1994.** *Determinación del periodo crítico de protección química contra el picudo del chile en el Valle de San Quintín, B. C. Informe de investigación.* Campo Experimental de la Costa de Ensenada-INIFAP.México.

[13] **CATIE. 1993.** *Guía para el manejo integrado de plagas del cultivo del chile. Programa de mejoramiento de cultivos tropicales. Serie técnica. Informe técnico/CATIE 201.* Turrialba, Costa Rica.

[14] **Velasco, P. H. 1969.** Evaluación de pérdidas, preferencia de ovoposición del picudo o barrenillo del chile (*Anthonomus eugenii* Cano), efectividad de varios insecticidas y reacción de diferentes variedades a su ataque.*Agricultura téenica en México* 2: 499–507.

[15] **Rolston, L. H. 1977.** Insecticide test in laboratory and field against the pepper weevil, *Anthonomus eugenii* Cano. *J. Ga. Entomol. Soc.* 12: 114–117.

[16] **Quiñones, P. F. J., y A. Flores M.** Toxicidad de insecticidas en poblaciones de picudo del chile *Anthonomus eugenii* Cano (Coleoptera: Curculionidae) en el estado de Chihuahua. *En* Memorias del XXVI Congreso Nacional de Entomología, Veracruz, Ver., México.

[17] **López, T. M. 1996.** *Susceptibilidad a insecticidas en dos poblaciones de campo de adultos del barrenillo del chileAnthonomus eugenii Cano (Coleoptera: Curculionidae) procedentes de San Luis Potosí, México.* Tesis de Maestría, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Edo. de México.

[18] **Servin, R., R. Aguilar, J. L. Martinez, E. Troyo, and A. Ortega. 2002.** Monitoring of resistance to three insecticides on pepper weevil (*Antonomus eugenii*) in populations from Baja California Sur, *México Interciencia*27: 691.

[19] **Servin, R., J. Garcia H., A. Tejas R., J. L. Martínez, E., and M. A. Toapanta. 2008.** Susceptibility of pepper weevil (*Antonomus eugenii* Cano) (Coleoptera: Curculionidae) to seven insecticides in rural areas of Baja California Sur, Mexico. *Acta Zoológica Mexicana* 24: 45–54.

[20] **Rossel. G., C. Quero, J. Coll, and A. Guerrero. 2008.** Biorational insecticides in pest management. *J. Pestic. Sci.*33: 103–121.

[21] **Seal, D. R., and D. J. Schuster. 1995.** Control of pepper weevil, *Anthonomus eugenii* in West-Central and South Florida. *Proceedings of the Florida State Horticulture Society* 108: 220–225.

[22] **Valenzuela-Cornejo, P., J. U. Enríquez-López. 1996.** *Evaluación de insecticidas para el control del "Picudo del chile" Anthonomus eugenii, Cano. En Memorias. VI Latinoamericano y XXXI Nacional Congreso de Entomología.*Mérida, Yucatán, México.

[23] **Palma, R. M., y L. Serrano. 1997.** Efecto de extractos botánicos sobre el picudo del chile (*Anthonomus eugenii*Cano) resultados preliminares en El Salvador. *Agronomía Mesoamericana* 8: 99–107.

[24] **Cortez-Mondaca, E. 2009.** *Insecticidas biorracionales para el control de picudo del chile. Memoria del Simposio nacional de manejo integrado de picudo del chile.* INIFAP — JLSV, México.

[25] **Cortez-Mondaca, E., y E. Cabanillas-Durán. 2004.** Insecticidas biorracionales para el control del "Picudo del chile" *Anthonomus eugenii* (Coleoptera: Curculionidae). *En* M. A. Morales, G. M. P. Ibarra, G. A., D. P. Rivera, y C. S. Stanford [eds.], Entomología Mexicana Vol. 3. Colegio de Postgraduados y Sociedad Mexicana de Entomología, A.C.

[26] **Abbott, W. S.** 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18: 267-267

[27] **R. Gylling, S.** (2000). Agriculture Research Manager (Version 3). South Dakota: Gylling Data Management, Inc.

[28] **Hilje, L. (2001).** Avances hacia el manejo sostenible del complejo mosca blanca-geminivirus en tomate, en Costa Rica. *Manejo integrado de plagas*, *61*, 69-80.

[29] **Araya, L., Carazo, E., & Cartín, V. (2005).** Diagnóstico del uso de insecticidas utilizados contra Bemisia tabaci (Gennadius) en tomate y chile en Costa Rica.*Manejo Integrado Plagas y Agroecol*, *75*, 68-76.29

[30] **Nunes, C., Lucas, E., & Coderre, D. (2005).** Diagnóstico sobre el conocimiento y manejo de *Bemisia tabaci* por los productores del norte nicargüense. *Manejo Integrado de plagas y Agroecología*, *76*, 75-79.

[31] **Hernández Pridybailo, A. (2011).** Evaluación y monitoreo en el control de mosca blanca (*Bemisia tabaci* G.) en cultivo de chile dulce (*Capsicum annuum* L.) bajo ambiente protegido en Pueblo Nuevo de Zarcero, provincia de Alajuela, Costa Rica. *Boletín del Programa Nacional Sectorial de Producción Agrícola bajo Ambientes Protegidos (Costa Rica). (Set-Oct*, *5*(30), 2-5.

ISOLATION OF *Fusarium spp*. IN THE PRODUCTION OF PRE-BASIC SEED OF POTATO (*Solanum tuberosum*)

(Aislamiento de *Fusarium spp.* en la producción de semilla prebásica de papa *Solanum tuberosum*)

Gloria Cristina Rodríguez-Cárdenas[a*+]

[a] Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Michoacán (CIIDIR-IPN-MICH).

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: cristyrdgz@gmail.com

Área del Conocimiento: Fitopatología

ABSTRACT
The cultivation of potato in Mexico is the seventh most important agricultural product in the country. The main problem in the cultivation of potato production is the presence of diseases, since they impair the commercial quality of tubers and decreases the yield. To achieve a better potato crop production must ensure the quality of the seed tuber, the tissue culture technique is widely used in obtaining disease-free tubers. However, in the process of production of tuber seed in a greenhouse, it may have infestations in the substrate, caused by pathogens that can affect negatively the quality of the pre-basic seed potato. The diagnosis is the first step for the control of pathogenic organisms, therefore, the objective of this study was to isolate and identify plant pathogens that affect the pre-basic seed potato, for which samples were taken from tubers that had damage in the texture of the skin "scabs". Were cuts of the epidermis of tubers which showed conditions, were placed in Petri dishes with medium potato dextrose agar (PDA) at temperature of 25° C for a period of 72 h. The grown mycelium was transferred successively to PDA culture medium to obtain a pure culture. The isolates were characterized in terms of the following cultural observations: pigmentation and appearance of the aerial mycelium. It was noted the morphology of the macroconidia and microconidia form. Of the characterisations made 12 isolates were identified from *Fusarium spp.* This work aims to not only the isolation of pathogens, molecular identification will subsequently be held and will evaluate native bacterial strains during production process of pre-basic seed potato.

Keywords: Phytopathological diagnosis, tubers seed, *Fusarium spp*., dry rot.

RESUMEN
El cultivo de papa en México es el séptimo producto agrícola más importante del país. El principal problema en el proceso de producción de papa es la presencia de enfermedades, ya que deterioran la calidad comercial de los tubérculos y el rendimiento de la planta. Para lograr un mejor control del cultivo de papa se debe asegurar la calidad del tubérculo semilla, la técnica de cultivo *in-vitro* es ampliamente utilizada en la obtención de tubérculos libres de enfermedades. Sin embargo, en el proceso de producción de tubérculo semilla se puede tener infestaciones en el sustrato, a causa de organismos patógenos que pueden afectar de manera negativa la calidad de la semilla prebásica de papa. El primer paso para el control de los organismos patógenos es el diagnóstico, por lo tanto, el objetivo de esta

investigación fue aislar e identificar fitopatógenos que afectan a la semilla prebásica de papa, para lo cual se tomaron muestras de tubérculos que presentaban daños en la textura de la epidermis “costras”. Se realizaron cortes de la epidermis de los tubérculos que presentaron afecciones, se colocaron en cajas Petri con medio papa dextrosa agar (PDA) a temperatura de 25°C por un periodo de 72 h. El micelio crecido fue transferido sucesivamente a medio de cultivo PDA hasta obtener un cultivo puro. Los aislamientos fueron caracterizados en cuanto a las siguientes observaciones culturales: pigmentación y aspecto del micelio aéreo. Se observó la morfología de los macroconidios y la forma de microconidios. De las caracterizaciones realizadas se identificó a 12 aislamientos de *Fusarium spp*. Este trabajo pretende no solo el aislamiento de patógenos, posteriormente se realizará la identificación molecular y se evaluarán cepas de bacterias biocontroladoras, durante el proceso de producción de semilla prebásica de papa.

Palabras Clave: Diagnóstico fitopatológico, tubérculos semilla, *Fusarium spp*., Podredumbre seca.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de papa en México es el séptimo producto agrícola más importante del país, se cultiva en 22 estados de la República, principalmente en la zona Norte y Noroeste. Se siembran anualmente cerca de 55 359 Ha de papa, ocupando el sexto lugar en importancia como alimento de consumo anual *per cápita* de 13.6 kg. Una de las grandes limitantes en la producción de papa es el desarrollo de enfermedades, ya que producen pérdidas importantes en los rendimientos y calidad de los productos y afectan gravemente la comercialización tanto en el mercado interno como el externo [1]. La papa como semilla asexual presenta problemas para su multiplicación y mantenimiento, actualmente se realiza el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales para la producción de semilla tubérculo de papa, es una técnica que es ampliamente utilizada en la obtención de plantas libres de enfermedades, se utiliza para la conservación de germoplasma, para el intercambio internacional de material genético y como apoyo en la propagación masiva de tubérculo semilla de papa de alta calidad fitosanitaria y genética [2]. Sin embargo, en el proceso de producción de tubérculo semilla se puede tener infestaciones en el sustrato, a causa de organismos patógenos. Una de las principales enfermedades que afectan severamente la calidad de los tubérculos semilla de papa es la Pudrición seca causada por el hongo *Fusarium spp.* es una de las principales enfermedades que se presentan en los tubérculos semilla almacenados, es causadas por patógenos provenientes de los campos de cultivo. Cuando se almacenan semillas que se originan en plantas enfermas, estos llevan consigo la infección en sus formas diversas, ya sea como estructuras de propagación (conidias, micelio) o de conservación (esclerocios, clamidosporas, oosporas), pueden estar presentes en la superficie, en la tierra adherida a los tubérculos o en el interior de los tubérculos almacenados [3]. De acuerdo a Wharton y Kirk [4] las pérdidas asociadas con la podredumbre seca se han estimado en un rango de 6% a 25%, y en ocasiones las pérdidas tan grandes como 60% han sido reportados durante el almacenamiento a largo plazo. El primer paso para el control de los organismos patógenos es el diagnóstico, por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue aislar e identificar fitopatógenos que afectan a la semilla prebásica de papa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los minitubérculos se obtuvieron de una empresa de cultivo *in-vitro*, Invernamex, ubicada en el Estado de México. Se analizaron 30 muestras, el aislamiento de los fitopatógenos se realizó a partir de semilla tubérculo, se tomaron muestras de tubérculos que presentaban daños en la textura de la epidermis

"costras". Se realizaron cortes de la epidermis de los tubérculos que presentaron afecciones, previo desinfección superficial, se colocaron en cajas Petri con medio papa dextrosa agar (PDA) y se incubaron a temperatura de 25°C por un periodo de 72 h. El micelio crecido fue transferido sucesivamente a medio de cultivo PDA, posteriormente se resembró por corte de punta de hifa en medio PDA por triplicado y se incubó a 25°C por 15 días. Se midió el diámetro para la colonia de cada aislado en cultivo cada 24 h partir del primer día, se consideró crecimiento rápido > 7 cm al día 7 que dejó de crecer. Los aislamientos fueron caracterizados en cuanto a las siguientes observaciones culturales: pigmentación y aspecto del micelio aéreo. Se observó la morfología de los macroconidios, presencia, ausencia y forma de microconidios y clamidiosporas. A partir de las caracterizaciones realizadas se identificó a distintas especies de *Fusarium.*

RESULTADOS

Los minitubérculos examinados presentaron en la epidermis lesiones hundidas y profundas de color marrón claro a marrón oscuro y pudrición seca en algunos minitubérculos. De las muestras analizadas se obtuvieron 12 aislamientos de *Fusarium spp*., que de acuerdo a las características morfológicas y microscópicas, así como a las claves taxonómicas de Booth [5] y Nelson *et al*., [6], se identificaron a las especies *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani*. Las estructuras reproductivas de los aislamientos observados fueron micelio, microconidios, macroconidios y clamidiosporas. Todos los aislamientos presentaron micelio con apariencia algodonosa, sin embargo hubo coloraciones distintas entre las colonias, los aislamientos identificados como *Fusarium oxysporum* presentaron una pigmentación del micelio en tonos violeta, violeta intenso y naranja claro. Las cepas aisladas e identificadas como *Fusarium solani* presentaron diversas coloraciones, blanco grisáceo, amarillo claro, rosa, rojo y café claro (Tabla 1, Figura 1). La caracterización microscópica se basó en las características de macroconidios, microconidios y clamidiosporas (Tabla 2). En los aislamientos identificados como *F. oxysporum* se observaron macroconidios fusiformes, largos, moderadamente curvados similares a la forma de una hoz, con varias células, pluriceptados, de 3 a 5 septas transversales, con la célula basal elongada y la célula apical atenuada. Los microconidios presentaron formas ovaladas, elipsoidales, ovoelípticos, cilíndricas, curvadas y alargadas, asimismo se identificó la presencia de clamidosporas. En los aislamientos identificados como *F. solani* se observaron macroconidios curvados, limonados, largos, delgados, con forma de media luna y entre 3 a 5 septos. Las células basales se identifican claramente en los extremos. Se identificaron microconidios abundantes, ovales, en forma de media luna, alargadas, sin septos y en algunos aislamientos se encontraban en largos conidióforos, también en esta especie se identificó la presencia de clamidosporas.

Tabla 1. Caracterización cultural de los aislamientos de *Fusarium spp.*

Aislamientos	Tasa de crecimiento	Pigmentación	Micelio aéreo
1. *Fusarium solani*	Rápido	Blanco grisáceo	Liso
2. *Fusarium solani*	Rápido	Café, beige	Algodonoso
3. *Fusarium solani*	Lento	Naranja amarillo claro	Liso
4. *Fusarium oxysporum*	Rápido	Violeta claro	Ligeramente algodonoso
5. *Fusarium oxysporum*	Rápido	Violeta oscuro	Ligeramente algodonoso
6. *Fusarium oxysporum*	Rápido	Naranja pálido	Algodonoso

7. *Fusarium solani*	Rápido	Amarillo beige	Algodonoso
8. *Fusarium solani*	Rápido	Blanco grisáceo	Algodonoso
9. *Fusarium oxysporum*	Rápido	Violeta oscuro	Ligeramente algodonoso
10. *Fusarium solani*	Lento	Rojo intenso	Algodonoso
11. *Fusarium oxysporum*	Rápido	Violeta pálido	Ligeramente algodonoso
12. *Fusarium oxysporum*	Rápido	Violeta oscuro	Algodonoso

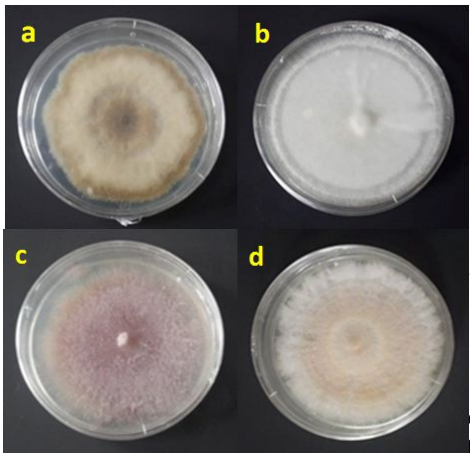


Figura 1. Caracterización de cultivos de aislamientos de diversas especies de *Fusarium spp*. crecidos en medio de cultivo PDA. *F. solani* (a y b) *F. oxysporum* (c y d).

Tabla 2. Caracterización morfológica de los aislamientos de *Fusarium spp*.

Aislamientos	Macroconidio	Microconidio
1. *F. solani*	Curvadas, tres septos	Ovales
2. *F. solani*	Largas, curvadas, cinco septos	Ovales
3. *F. solani*	Largas, delgadas, curvadas cuatro septos	Curvadas
4. *F. oxysporum*	Curvadas en forma de hoz, cinco septos	Ovales, alargadas
5. *F. oxysporum*	Fusiformes, largas, moderadamente curvadas en forma de hoz, cinco septos	Hialinas, elipsoidales
6. *F. oxysporum*	Fusoides, cinco septos	Ovoelípticos
7. *F. solani*	Forma de media luna, cinco septos	Abundantes y ovales
8. *F. solani*	Limonadas alargadas	Ovales
9. *F. oxysporum*	Abundantes, falcados, cinco septos	Cilíndricos
10. *F. oxysporum*	Largas, moderadamente curvadas, cinco septos	Ovoides
11. *F. oxysporum*	Fusiformes, cinco septos	Ovales, alargadas
12. *F. oxysporum*	Alargadas, cuatro septos	Cilíndricos, hialinos

DISCUSIÓN

Los resultados de nuestros ensayos *in vitro* concuerdan con los obtenidos por otros autores García, Al-Mughrabi, Recep [7, 8, 9] donde obtuvieron de tubérculos de papa diversas especies de *Fusarium spp*., entre los principales responsables de la pudrición seca en semilla de campo y almacenaje coinciden con la presencia de *F. oxysporum* y *F. solani*. Jiménez y Dissanayake [10, 11] han reportado estas especies como causantes de la pudrición basal del ajo y cebolla respectivamente. En esta investigación se observó una amplia diversidad morfológica que mostraron los aislados de *Fusarium*, que se identificaron como *F. solani* y *F. oxysporum*. Al realizar la caracterización cultural en función de la coloración del micelio se observó una amplia variabilidad de colores, los aislamientos de *Fusarium oxysporum* presentaron una pigmentación del micelio en tonos violeta, violeta intenso y naranja claro. Las cepas aisladas identificadas como *Fusarium solani* presentaron coloraciones, blanco grisáceo, amarillo claro, rosa, rojo y café claro. Una variación en el color del micelio fue reportado por García [12], donde señala que existen algunas especies que producen variaciones en la tonalidad e intensidad, debido a la gran variabilidad en sus características morfológicas y culturales incluso en aislamientos de la misma especie. Existen adaptaciones y cambios morfológicos en *Fusarium spp.* que van variando su genotipo y por lo tanto su fenotipo, dificultando cada vez más su clasificación taxonómica, por ello es necesario utilizar criterios de caracterización tanto morfológicos como moleculares. Los pasos a seguir en esta investigación son la identificación molecular y posteriormente se realizarán pruebas de patogenicidad para analizar el grado de virulencia de las cepas aisladas, debido a que *Fusarium spp*. posee varios atributos celulares y moleculares, que en conjunto pueden conferir grados diferentes de virulencia y se evaluarán cepas de bacterias biocontroladoras que inhiban el crecimiento de estos patógenos.

CONCLUSIONES

A partir de los tubérculos semilla de papa, originados por la técnica de cultivo de tejidos, se obtuvieron 12 aislamientos de *Fusarium spp.* De acuerdo a las características morfológicas y culturales se identificaron a dos especies; *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani*, los cuales pueden considerarse como responsables de la pudrición seca de la semilla prebásica de papa.

REFERENCIAS

[1] CONPAPA (2014). Recuperado el 02 de mayo del 2015. http://www.conpapa.org.mx/

[2] Mosquera, H.A.E., Hoyos, J.M., Molina, L.A. (2013). "Estudio técnico-económico para la producción de minitubérculo semilla de papa (*Solanum tuberosum)*". Revista de Ciencias Agrícolas, 11: 1-8.

[3] Ibarra, P., & Cinco, J. (2014). Sustratos orgánicos alternativos para la producción de tubérculo-semilla de papa en invernadero. (Tesis Doctoral, Colegio de Postgraduados), 22-85

[4] Wharton, P.S., Kirk, W.W. (2014). "Evaluation of biological seed treatments in combination with management practices for the control of *Fusarium* dry rot of potato". Biological Control, 73: 23-30.

[5] Booth, C. (1977). *Fusarium*. Laboratory guide to the identification of the major species. Commonwealth Mycological Institute.

[6] Nelson, P.E., Toussoun, T. A., Marasas, W.F.O. (1983). *Fusarium* species: an illustrated manual for identification.

[7] García B.L., Grajales, A., Cárdenas, M.E., Sierra, R., Lozano, G., Garavito, M.F., Restrepo, S. (2011). "Aislamiento y caracterización de dos cepas de *Fusarium oxysporum* causantes de la pudrición seca en *(Solanum tuberosum)* en Colombia", Rev Iberoam Micol, 166-172.

[8] Al-Mughrabi, K.I. (2010). "Biological control of *Fusarium* dry rot and other potato tuber diseases using *Pseudomonas fluorescens* and *Enterobacter cloacae*", Biological Control, 53(3): 280-284.

[9] Recep, K., Fikrettin, S., Erkol, D., Cafer, E. (2009). "Biological control of the potato dry rot caused by Fusarium species using PGPR strains". Biological Control, *50*(2): 194-198.

[10] Jiménez, M.A., Ulacio, D., Perdomo, W., Briceño, E. (2009). "Microbiota y nematodos asociados con la rizósfera y raíz en el cultivo de ajo *(Allium sativum* L.)", Bioagro, 3: 209-216.

[11] Dissanayake, M.L.M.C., Kashima, S., Tanaka, R. (2009). "Pathogenic variation and molecular characterization of *Fusarium* species isolated from wilted Welsh onion in Japan", Journal of General Plant Pathology, *75*: 37-45.

[12] García, J.M.D., Shagarodsky, T., Fresneda, J.A., Fundora, Y.H., González, J. (2007). "Caracterización de especies del género *Fusarium* en el cultivo del garbanzo *(Cicer arietinum)* en las provincias ciudad Habana y La Habana", Temas de Ciencia y Tecnología, 32(11): 63-66.

BACTERIOPHAGES: A POTENTIAL ALTERNATIVE FOR THE BIOLOGICAL CONTROL OF BACTERIAL SPOT IN THE CULTIVATION OF *Capsicum annuum* L.

(Bacteriófagos: una alternativa potencial para el control biológico de la mancha bacteriana en el cultivo de *Capsicum annuum* L.)

María del Consuelo de Jesús López-Vielma[a], Evangelina Esmeralda Quiñones-Aguilar[a], Gabriel Rincón-Enríquez[a*+]

[a] Biotecnología Vegetal del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A. C.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: grincone@gmail.com

Área del Conocimiento: Fitopatología.

ABSTRACT
Mexico is the second largest producer of pepper (*Capsicum annuum* L.) worldwide. Chile growing confronts various phytosanitary problems, with the bacterial spot caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (Xv), one of the main diseases causing low yields. Overuse of antibiotics has caused resistance in strains of Xv, giving as a result an inefficient and harmful to the environment of disease control. The use of bacteriophage is a potential alternative to this problem. The aim of this work was to isolate strains and their bacteriophages partners Xv of pepper producing regions in Jalisco, Michoacán and Zacatecas. Xv strains were isolated using medium NYGA and identified by phenotype in Xan-D selective medium and amplification of the 16S-23S intergenic region (ITS) and the gene *estA* by PCR. Bacteriophage isolation was done by bacterial enrichment and adding 100 g of soil. The detection and isolation of bacteriophages was performed by the method of double soft agar plates. The lytic viruses were separated by single multiplication plaques in liquid medium. A bank of 7 strains of Xv was associated 24 isolates of bacteriophage. Bacteriophages have diversity of sizes of lysis plaques and 16 of them showed lytic activity against most strains of Xv. These bacteriophages could be used to develop a product that integrates the management of bacterial spot on pepper cultivation in western Mexico.

Keywords: Bacterial viruses; *Xanthomonas*; biocontrol; organic agriculture.

RESUMEN
México es el segundo productor de chile (*Capsicum annuum* L.) a nivel mundial. El cultivo de chile se enfrenta a diversos problemas fitosanitarios, siendo la mancha bacteriana causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* una de las principales enfermedades que provocan bajos rendimientos. El uso desmedido de antibióticos ha ocasionado la resistencia de Xv, dando como consecuencia un control ineficiente y dañino al ambiente de esta enfermedad. El empleo de bacteriófagos es una alternativa potencial a este problema. El objetivo del presente trabajo fue aislar cepas de Xv y sus bacteriófagos en regiones productoras de chile en Jalisco, Michoacán y Zacatecas. Las cepas de Xv se aislaron empleando medio NYGA y se identificaron mediante el medio selectivo Xan-D, así como la amplificación de la región inter-génica 16S-23S (ITS) y el gen *estA.* El aislamiento de bacteriófagos se hizo mediante

enriquecimiento bacteriano y agregando 100 g de suelo. La detección y aislamiento de los bacteriófagos fue realizada mediante el método de doble placa en agar suave. Los virus líticos fueron separados por multiplicación de calvas únicas en medio líquido. Un banco de 7 cepas de Xv se asoció a 24 aislamientos de bacteriófago. Los bacteriófagos mostraron diversidad de tamaños de placas de lisis y 16 de ellos mostraron actividad lítica contra la mayoría de cepas de Xv. Estos bacteriófagos podrían ser utilizados para desarrollar un producto que se integre al manejo sanitario de la mancha bacteriana en el cultivo del chile en el occidente de México.

Palabras Clave: Virus de bacterias; *Xanthomonas*; biocontrol; agricultura orgánica.

INTRODUCCIÓN

El chile (*Capsicum annuum* L.) es una especie de la familia de las solanáceas. *C. annuum* es de comportamiento anual o perenne, con tallos erectos y ramificados de color verde obscuro, el sistema de raíces puede llegar a 1.20 m en profundidad y lateralmente, las plantas tienen una altura promedio de 60 cm, las hojas son planas y de forma ovoide alargada y las flores son hermafroditas. Los frutos son de color verde, pero en el caso de los pimientos se puede madurar al color rojo, amarillo, anaranjado, morado u otros colores. *C. annuum* var. *annuum* agrupa la mayoría de las variedades cultivadas en México, como son: "ancho", "serrano", "jalapeño", "morrón", "mirasol", entre otros. Los frutos muestran gran diversidad de forma, sabor, color, pungencia, adaptación, etc [1]. El consumo de chile es de gran importancia no solo en México, sino también a nivel mundial. Tiene aplicaciones en la industria cosmética y farmacéutica, haciendo del chile un producto muy versátil y con gran potencial económico. México se sitúa en el segundo lugar de producción de chile a nivel mundial detrás de China [2]. La producción nacional en 2012 alcanzó cerca de 2.4 millones de toneladas con un valor de más de 13 mil millones de pesos [3]. El rendimientos promedio de chile en México es de 18 ton ha^{-1}, el cual es superior al promedio mundial (15.3 ton ha^{-1}), pero muy por debajo comparado con las más de 50 ton ha^{-1} que producen algunos países como Bélgica, Reino unido y Países Bajos. Actualmente el cultivo de chile se enfrenta a diversas problemáticas en el proceso de producción agrícola, entre los cuales se encuentran los factores físico-ambientales como son heladas, sequías y lluvias intensas además de problemas fitosanitarios como son las afectaciones debido a enfermedades como las pudrición de raíz ocasionada por un complejo de hongos y oomycetos (*Fusarium* sp., *Pythium* spp., *Rhizoctonia* sp. y *Phytophthora* sp.); enfermedades causadas por virus como el "virus del mosaico del tabaco" y las causadas por bacterias, como la mancha bacteriana provocada por *Xanthomonas campestris* [4] actualmente reclasificadas como *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (Xv). Xv es una bacteria Gram negativa, tiene forma de varilla con un solo flagelo polar y su temperatura óptima de crecimiento se ubica entre 25 y 30°C [5]. Xv produce un pigmento amarillo, característico de algunas especies de este género [6]. En el cultivo de chile Xv se manifiesta ocasionando manchas necróticas con halos cloróticos a su alrededor, ocasionando la defoliación del cultivo y en algunos casos de los frutos. Cuando los frutos no son abortados, éstos quedan expuestos y son dañados por el sol. Tradicionalmente el control de enfermedades bacterianas en chile se ha tratado utilizando compuestos a base de cobre y antibióticos como estreptomicina, oxitetraciclina y gentamicina, sin embargo, Carrilo-Fasio [7] menciona la existencia de cepas de *X. campestris* insensibles a compuestos de cobre y resistentes a antibióticos. Por otro lado [8] mencionaron la detección de genes que le confieren resistencia a Xv a compuestos de cobre, éste hecho ha ocasionado una falta de control de la enfermedad en los campos donde se cultivan chiles, teniendo grandes pérdidas económicas por los bajos rendimientos y altos costos de producción. Además de lo anterior, una de las tendencias mundiales en la producción de alimentos es practicar una

agricultura amigable con el medio ambiente y no perjudicial para los humanos. Todo lo anterior conduce a buscar y proponer alternativas para controlar enfermedades bacterianas en plantas de una manera amigable con el ambiente y que no generen resistencia por parte de los patógenos. El control biológico puede ser una solución viable a este problema. Un ejemplo de control biológico efectivo lo mencionan [9] donde utilizaron bacteriófagos para el biocontrol de *Ralstonia solanacearum* en tomate; observando que todas las plantas tratadas con bacteriófagos no mostraron síntomas de marchitamiento durante el periodo experimental, mientras que las plantas que no tuvieron tratamiento con bacteriófagos se marchitaron 18 días después de la infección. Los bacteriófagos son virus específicos de bacterias y requieren de éstas para su replicación [10]. La replicación de los bacteriófagos ocasiona la destrucción de la bacteria hospedera. Por lo cual el objetivo de este estudio fue aislar cepas de Xv y sus bacteriófagos asociados en regiones productoras de chile en Jalisco, Michoacán y Zacatecas.

METODOLOGÍA

Se colectaron muestras de suelo y de tejido de chile con mancha bacteriana en predios en los estados de Jalisco, Michoacán y Zacatecas. Se realizaron un total de 12 colectas. Las regiones muestreadas fueron las siguientes: 1) La Plata, Mascota, Jalisco (tres fechas de muestreo durante septiembre y octubre de 2013) en las variedades de chile Condor, Aristoteles, Bravo y Allende. 2) Yurécuaro, Michoacán (Noviembre 2013 y 2014) en la variedad Duque. 3). Troncoso y San Isidro Zacatecas (Octubre 2013 y Septiembre 2014) en la variedad Mirasol criollo. Los aislamientos bacterianos se realizaron tomando partes afectadas de tejido y se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio al 2.5 % durante 3 minutos. Posteriormente se realizaron dos lavados con agua destilada estéril (121 °C durante 20 min). La muestra de tejido fue macerada en un mortero estéril, al cual previamente se agregaron 2 mL de agua destilada estéril. Se recuperó 1 mL del sobrenadante y se realizaron diluciones seriadaslas cuales fueron sembradas en medio NYGA y incubadas 48 h a 28°C. El aislamiento de las colonias se realizó con base al fenotipo típico de Xv (coloración amarilla) sobre medio NYGA. Para la caracterización se empleó el medio selectivo Xan-D propuesto por [11], donde las colonias que presentan coloración verde amarillenta y un halo de hidrólisis después de 96 h a 28°C se consideraron como posibles cepas de Xv. A partir de medio líquido NYG de los aislamientos de Xv se hizo la extracción de ADN con la metodología descrita por [12]. Se realizó un análisis *in silico* para determinar el tamaño de fragmento esperado de la amplificación de la región intergénica 16S y 23S (ITS). La identificación de los aislamientos se realizó mediante la amplificación del ITS 16S y 23S [13] utilizando los oligos G1 (GAA GTC GTA ACA AGG) y L1 (CAA GGC ATC CAC CGT) y la región del gene *estA* empleando los oligos Xc-lip-F2 (TAT GTG ATG GTG CCG ACC ATTC) y Xc-lip-R2 (GGA CTT CGC GGT CCA CGT CGT AGC) [11]. Para la reacción de PCR se emplearon 20 ng de ADN por 12.5 µL de reacción. Las muestras se migraron en un gel de agarosa a 0.8% a 85 V durante 1h y al 1% con Gel Red®. Como control positivo se utilizó la cepa *X. campestris* pv. *vesicatoria* BV5-42 (861). El aislamiento de los bacteriófagos se llevó a cabo mediante un ensayo de enriquecimiento a partir de muestras de suelo. 100 g de suelo se mezclo con 100 mL de medio de cultivo NYG estéril y se inoculó con 600 µL de cultivo bacteriano de los distintos aislamientos de Xv en fase media logarítmica (med-*log*). Se dejaron en incubación durante 18-24 horas en obscuridad. Posteriormente se recuperó el sobrenadante y se centrifugó a 8000 x g durante 20 min. Se recuperó nuevamente el sobrenadante y se filtró con membrana de 0.22 µm. Después de obtener la muestra enriquecida, se procedió a la detección y aislamiento de los bacteriófagos, lo cual se realizó mediante un ensayo de doble placa en agar suave [14]. Para el ensayo de doble placa se tomó 1mL de la muestra enriquecida y se agregaron 600 µL del aislamiento de Xv de la cual se deseaba aislar bacteriófagos, dejando reposar durante 10 minutos, después se agregaron 3 mL de agarosa al 0.7% y vertió sobre una

caja con medio NYGA. Después se dejó secar y se llevó a incubación durante 24 horas a 28°C. Pasado el tiempo de incubación se identificaron las diferentes morfologías de las calvas detectadas sobre las placas. Las calvas se aislaron y se propagaron en medio NYG inoculado con el cultivo bacteriano de la cepa empleada en el aislamiento.

RESULTADOS

Se observaron colonias que presentaron coloración verde-amarillenta en medio Xan-D, así como halos que indicaban la hidrólisis de la leche y puntos blancos debido a áreas cercanas a las colonias bacterianas (Figura 1A). Las colonias con las características anteriormente descritas fueron preseleccionadas y se procedió con ellas a realizar el análisis molecular de esos aislamientos bacterianos.

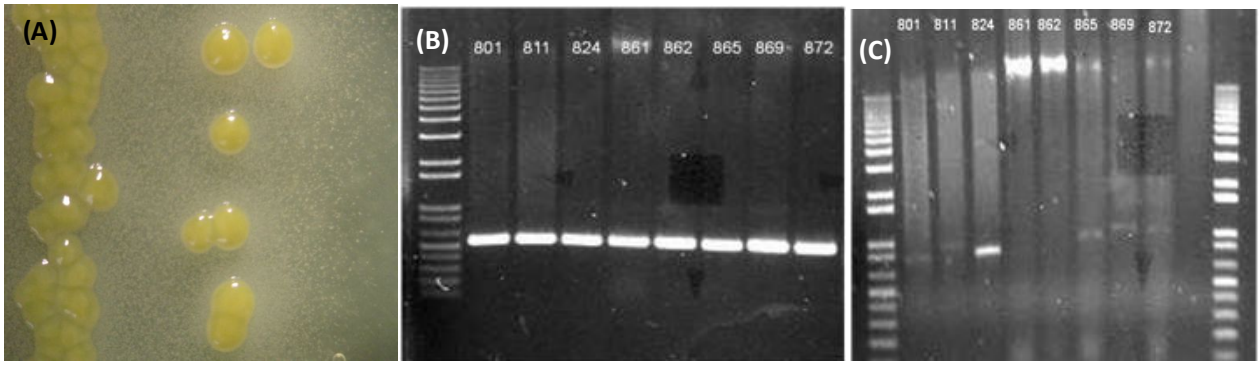


Figura 1.- Características morfológicas y moleculares de cepas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* aislados del cultivo de chile enfermo por mancha bacteriana. (A) Fenotípico típico de una colonia bacteriana de Xv creciendo sobre medio XanD. (b) Amplificación del ITS (583 pb), la cepa 861 es la cepa BV5-42 de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*. (C) Amplificación de un fragmento del gen *estA* (777 pb).

La caracterización molecular del banco de aislamientos de Xv logró determinar que 7 aislamientos mostraron los patrones esperados de cepas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*. En la Figura 1 se muestran las cepas de Xv con el patrón típico del ITS (583 pb) (Figura 1B) y el gen *estA* (777 pb) (Figura 1C). Además resulta importante resaltar que la cepa de referencia BV5-42 mostro el mismo patrón a las cepas aisladas. Por lo cual se considero a estos 7 aislamientos como cepas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*. A partir de estas cepas se procedió a realizar el aislamiento de los bacteriófagos asociados a ellas. Se logro formar un banco de 24 aislamientos de bacteriófagos (Figura 2, Tabla 1). En la Figura 2 se muestra el ensayo de doble placa y las calvas (placas de lisis) de diferentes morfologías.

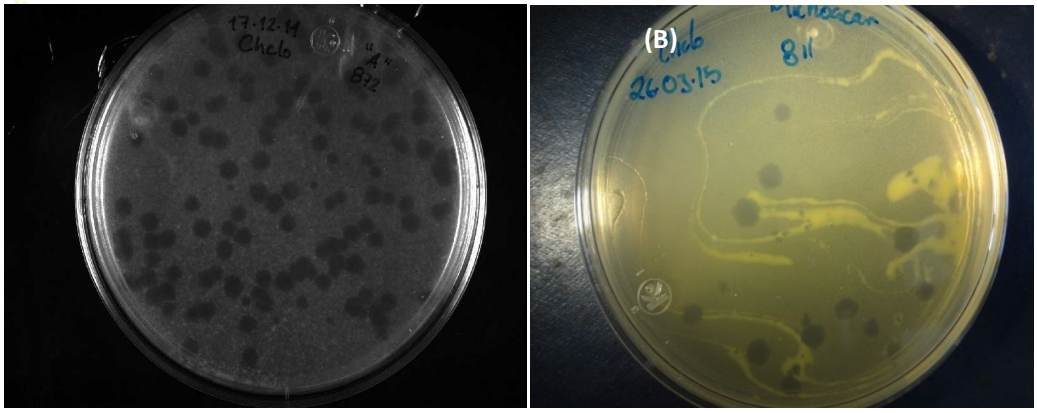


Figura 2.- Calvas o placas de lisis típicas de bacteriófagos creciendo sobre distintas cepas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*. Se muestran calvas de inhibición sobre tapetes bacterianos de cepas aisladas en Michoacán (A) y Jalisco (B).

Tabla 1. Resumen de bacteriófagos aislados para 6 cepas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* provenientes de distintos regiones productoras de chile en México.

Cepa	Sitio de aislamiento	Bacteriófagos aislados
801	Jalisco, Michoacán	6,2
811	Michoacán	2
824	Jalisco, Michoacán	1,2
865	Jalisco, Michoacán	2,1
869	Jalisco, Michoacán	3,3
872	Jalisco	2

Se conformó un banco de 24 bacteriófagos para 6 de las cepas aisladas como se muestra en la Tabla 2. Los sitios empleados para el enriquecimiento donde se identificaron las calvas corresponden a los estados de Jalisco y Michoacán. En los enriquecimientos provenientes de los suelos de Zacatecas, no se identificaron calvas. Se realizó una prueba de rango de infección con los bacteriófagos aislados para identificar la capacidad de los bacteriófagos a lisar las distintas cepas bacterianas. Se encontraron 16 bacteriófagos capaces de producir lisis en 6 de las 7 cepas bacterianas aisladas (Tabla 2).

Tabla 3. Pruebas de rango de infección de los 16 bacteriófagos (columna verde) sobre las 8 cepas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (hilera amarilla).

	801	811	824	861	862	865	869	872	
1.1	SI	SI	SI	-	-	SI	SI	SI	MICHOACÁN
1.2	SI	SI	SI	-	-	SI	SI	SI	MICHOACÁN
1.3	SI	SI	SI	-	-	SI	SI	SI	JALISCO
1.4	SI	SI	SI	-	-	SI	SI	SI	JALISCO
1.7	SI	SI	SI	-	-	SI	SI	SI	MICHOACÁN
1.8	SI	SI	SI	-	-	SI	SI	SI	MICHOACÁN
1.9	SI	SI	SI	-	-	SI	SI	SI	MICHOACÁN
1.1	SI	SI	SI	-	-	SI	SI	SI	MICHOACÁN
2.1	SI	SI	SI	-	-	SI	SI	SI	JALISCO
2.2	SI	SI	SI	-	-	SI	SI	SI	JALISCO
2.6	SI	SI	SI	-	-	SI	SI	SI	MICHOACÁN
2.7	SI	SI	SI	-	-	SI	SI	SI	MICHOACÁN
2.8	SI	SI	SI	-	-	SI	SI	SI	JALISCO
2.9	SI	SI	SI	-	-	SI	SI	SI	MICHOACÁN
2.1	SI	SI	SI	-	-	SI	SI	SI	MICHOACÁN
2.12	SI	SI	SI	-	-	SI	SI	SI	JALISCO

SI = El bacteriófago lisa a la cepa bacteriana. - = El bacteriófago no lisa a la cepa bacteriana.

DISCUSIÓN

Las técnicas empleadas para la identificación permitieron descartar rápidamente las cepas que no correspondían a *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*. Los cambios de coloración al verde-amarillento en las colonias sembradas en medio Xan-D se deben al azul de bromotimol y los halos alrededor de las colonias corresponden a la hidrólisis de la leche. Los puntos blancos cercanos a las colonias son debido a la lipólisis del Tween 80. Los fragmentos obtenidos de la amplificación de la región ITS (583 pb) corresponden a los patrones esperados de acuerdo al análisis bioinformático realizado previamente. Las cepas amplificaron el fragmento del gen *estA* (777 pb) esperado para Xv. En los tejidos enfermos provenientes de Jalisco y Michoacán así como en los suelo colectados en esos cultivos se encontró una diversidad de cepas y bacteriófagos. El tejido de chile proveniente de Zacatecas no presentó características claras y típicas de la enfermedad, por lo que se procedió a aislar la bacteria del suelo. Se identificó una cepa proveniente de Zacatecas, sin embargo, el suelo proveniente de ese lugar no presentó bacteriófagos para las cepas bacterianas aisladas. Los 16 bacteriófagos que presentaron lisis, mostraron un amplio rango de infección al infectar 6 de las 7 cepas bacterianas aisladas. No se encontraron bacteriófagos que infectaran la cepa de referencia empleada BV5-42 (861) y la 862 aislada en Zacatecas.

CONCLUSIONES

La diversidad de cepas bacterianas aisladas permitió tener una variación de bacteriófagos líticos que pueden ser empleados para generar un producto de control biológico que se pueda aplicar para el control de la mancha bacteriana en cultivos de chile en las regiones donde fueron aislados.

REFERENCIAS

[1] Montes, S. (2010). Recopilación y análisis de la información existente de las especies del género *Capsicum* que crecen y se cultivan en México.

[2] Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (2012).

[3] Secretaría de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación (2012).

[4] Chew, M. (2008). Principales enfermedades del chile (*Capsicum annuum* L.). Matamoros: SAGARPA.

[5] Brandury, J.F. (1984). Genus II Xanthomonas Dowson 1939. Bergey´s Manual of Systematic Bacteriology 199-210.

[6] Pernezny, K., Roberts, P.D., Murphy, J.F., Goldberg, N.P. (2003). Compendium of pepper diseases APS Press. American Phytopathological Society St. Paul, MN, USA. 63 pp.

[7] Carrillo, F.J., García, E.R., Molar, A.R., Márquez, Z.I., Millán, O.S., Gaxiola, E.G. (2001). "Sensibilidad a Cobre de Cepas de *Xhantomonas campestris* pv. *versicatoria*, (Doidge) Dye, en Sinaloa, México", Revista Mexicana de Fitopatología 19(1): 72-77.

[8] Garder, S., Bender, C.L. (1991). "DNA probes for detection of copper resistance genes in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*", Appl. Environ. Microbiol. 57: 2435-2439.

[9] Fujiwara, A., Fusisawa, A., Hamasaki, R., Kawasaki, T., Fujie, M., Yamada, T. (2011). "Biocontrol of *Rasoltonia solanacearum* by treatment with lytic bacteriophages", Applied and Enviromental Microbiology 77: 4155-4162.

[10] Kutter, E., Sulakvelidze, A. (2005). Bacteriophages biology and applications. CRC PRESS.

[11] Lee, Y., Sung, A., Liu, T., Lee, Y. (2009). "*Xanthomonas* spp. Isolation and detection of phytopathogenic medium and *est*A-Specific PCR for combination of chromogenic differential", Applied and Environmental Microbiology 75: 6831-6838.

[12] Chen, W., Kuo, T. (1993). "A simpled and rapid method for the preparation of Gram-negative bacterial genomic DNA", Nucleic Acid Research 21: 3.

[13] Jensen, M.A., Webster, J.A., Straus, N. (1993). "Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplifien ribosomal DNA spacer polymorphisms", Applied and Environmental Microbiology 59: 945-952.

[14] Kropinski, A.M., Mazzocco, A., Waddell, T.E., Lingohr, E., Johnson, R.P. (2009). "Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay", *In* Clokie, M. R. J. y A. M. Kropinski (eds.), Bacteriophages: Methods and Protocols, New York: Humana Press, 501: 69-76.

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF *Pseudomonas aeruginosa,* CAUSAL AGENT OF SOFT ROT IN *Polianthes tuberosa*

(Aislamiento y caracterización de *Pseudomonas aeruginosa,* agente causal de pudrición blanda en *Polianthes tuberosa*)

Beatriz Genoveva Guardado-Fierros[a], Gabriel Rincón-Enríquez[a], Evangelina Esmeralda Quiñones-Aguilar[a*+]

[a]Biotecnología Vegetal del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A. C.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: eqaguilar08@gmail.com

Área del Conocimiento: Fitopatología.

ABSTRACT
The tuberose (*Polianthes tuberosa*) is one of the most important floriculture crops in the state of Morelos. The production of this crop is affected by various pests and diseases. One of the diseases causing major losses is soft rot caused by *Pseudomonas aeruginosa* (Pa), ubiquitous and multi-host bacteria. Pa is capable of infecting humans, animals, plants and insects and it has been isolated from various plant species such as onion, radish, potato, lettuce and celery, like sewage, so it is a source of inoculum for floriculture crops. The objective of this work was to isolate and identify Pa from rhizosphere soil of tuberose, from Morelos. Soil samples were taken in the rhizosphere of diseased tuberose plants with soft rot in Puente de Ixtla, Morelos. Pa isolation was performed by the method of serial dilutions 1:10 into selective medium Kings B, where *Pseudomonas* presents a green fluorescent phenotype, 31 isolates were characterized molecularly by ITS and 29 were positive according to the size of the ITS into the genome published for this bacteria, pathogenicity and virulence of the 29 isolates was also determined, the results showed soft rot; therefore Pa bacterial isolates were defined as phytopathogenic.

Keywords: Soft rot; plant pathogenic bacteria; molecular identification by ITS.

RESUMEN
El nardo (*Polianthes tuberosa*) es uno de los cultivos más importantes de la floricultura en el estado de Morelos. La producción de este cultivo se ve afectado por varias plagas y enfermedades. Una de las enfermedades que causan pérdidas importantes es la pudrición blanda provocada por *Pseudomonas aeruginosa* (Pa), bacteria ubicua y multi-huésped. Pa es capaz de infectar seres humanos, animales, plantas e insectos y se ha aislado a partir de varias especies de plantas como la cebolla, el rábano, papa, lechuga y apio, así como en las aguas residuales, lo que constituye una fuente de inóculo para los cultivos florícolas. El objetivo de este trabajo fue aislar e identificar Pa de suelo de la rizosfera de nardo de Morelos. Las muestras de suelo fueron tomadas de la rizosfera de plantas nardo enfermas por pudrición blanda en Puente de Ixtla, Morelos. El aislamiento de Pa se realizó por el método de diluciones seriales 1:10 en medio selectivo Kings B, donde *Pseudomonas* presenta un fenotipo verde fluorescente,

31 aislados se caracterizaron molecularmente por ITS y 29 fueron positivos a Pa de acuerdo con el tamaño del ITS del genoma publicado de esta bacteria. También se determinó la patogenicidad y la virulencia de los 29 aislamientos de Pa, los resultados mostraron la pudrición blanda; por lo tanto, los aislados bacterianos de Pa fueron considerados como fitopatógenos.

Palabras Clave: Pudrición blanda; bacterias fitopatógenas; Identificación molecular por ITS.

INTRODUCCIÓN

Pseudomonas aeruginosa (Pa) es una bacteria Gram-negativa perteneciente a la rama gama de las proteobacterias, misma a la que pertenecen las enterobacterias como *Escherichia coli*. En los últimos años se ha observado un incremento en la incidencia de cepas de Pa resistentes a diversos antibióticos de última generación, lo que la hace una de las bacterias difíciles de erradicar. Pa es una de las tres principales bacterias nosocomiales importantes, Pa es patógena oportunista, la predominancia de esta bacteria radica principalmente en su multiresistencia y su gran arsenal de factores de virulencia. Pa es una de las principales causantes de infecciones en pacientes enfermos con cáncer, trasplantes, quemados y en pacientes con fibrosis cística. Sin embargo su rango de hospederos no solo se limita a ser patógena oportunista humana, sino que también se ha reportado como entomopatogena en *Drosophila* sp. y *Galleria mellonella.* En nematodos *Caenorhabditis elegans* y como fitopatógena se ha reportado en lechuga (*Lactuca sativa*) y *Arabidopsis thaliana*, esta última es utilizada para estudiar los factores de virulencia, los cuales se cree son los mismos para infecciones vegetales y animales. Rivera [1] identifico a *P. aeruginosa* como patógena en el cultivo ornamental del nardo (*Polianthes tuberosa*) producido en el estado de Morelos. Pa es aparentemente la causante de la pudrición blanda en los bulbos de este cultivo. La identificación de esta bacteria se basa principalmente en pruebas bioquímicas y fisiológicas como: fermentación de azucares, prueba oxidasa, motilidad, oxidación de azucares, descarboxilación de lisina, crecimiento a 42°C. También pueden ser identificadas mediante métodos genéticos, utilizando PCR, RFLP, etc. Sin embargo estos deben ser combinados con pruebas bioquímicas o morfológicas. Identificar a Pa de una manera rápida y oportuna, puede salvar miles de vidas humanas, de igual manera, una prueba rápida puede evitar el riego de contaminar cultivos vegetales con aguas contaminadas con la bacteria evitando daños tanto a cultivos, como a personas involucradas en su manejo y posterior consumo. Por lo cual el objetivo del presente trabajo fue aislar e identificar a *P. aeruginosa* a partir de pudriciones blandas del cultivo del nardo de Morelos.

METODOLOGÍA

En la Figura 1 se muestra la estrategia metodológica general para el cumplimiento de los objetivos planteados en este estudio. Para la caracterización de Pa, por medio de la técnica de ITS e ITS-RFLP se siguió el protocolo propuesto por [2], para los métodos de extracción de ADN y PCR se siguieron los métodos propuestos por [3]. Las pruebas de patogenicidad y virulencia se realizaron siguiendo lo propuesto en [1].

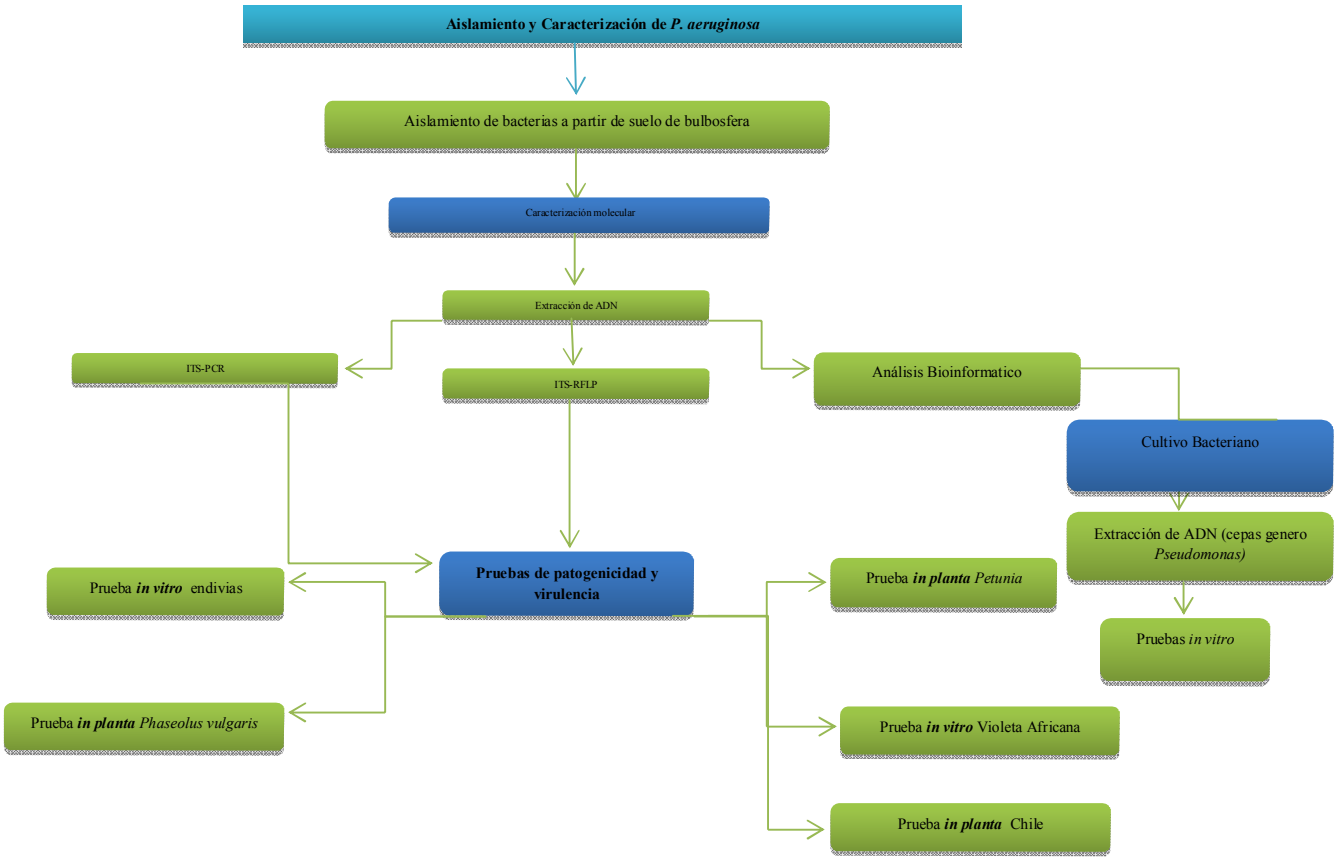


Figura 1. Esquema general de la metodología seguida para el aislamiento y caracterización del agente causal de la pudrición blanda del bulbo o cormo del nardo.

RESULTADOS Y DISCUSION

Se obtuvieron 31 aislados típicos de *P. aeruginosa* a partir del suelo rizosférico de nardos con pudrición blanda del predio de Puente de Ixtla, Morelos (18°39'16.64"N / 99°21'59.10"O). Los aislamientos mostraron coloración verde-amarilla en medio KB similar a la cepa de referencia de *P. aeruginosa* (Figura 2), por lo que fueron seleccionados para su caracterización molecular mediante la técnica de ITS [2].

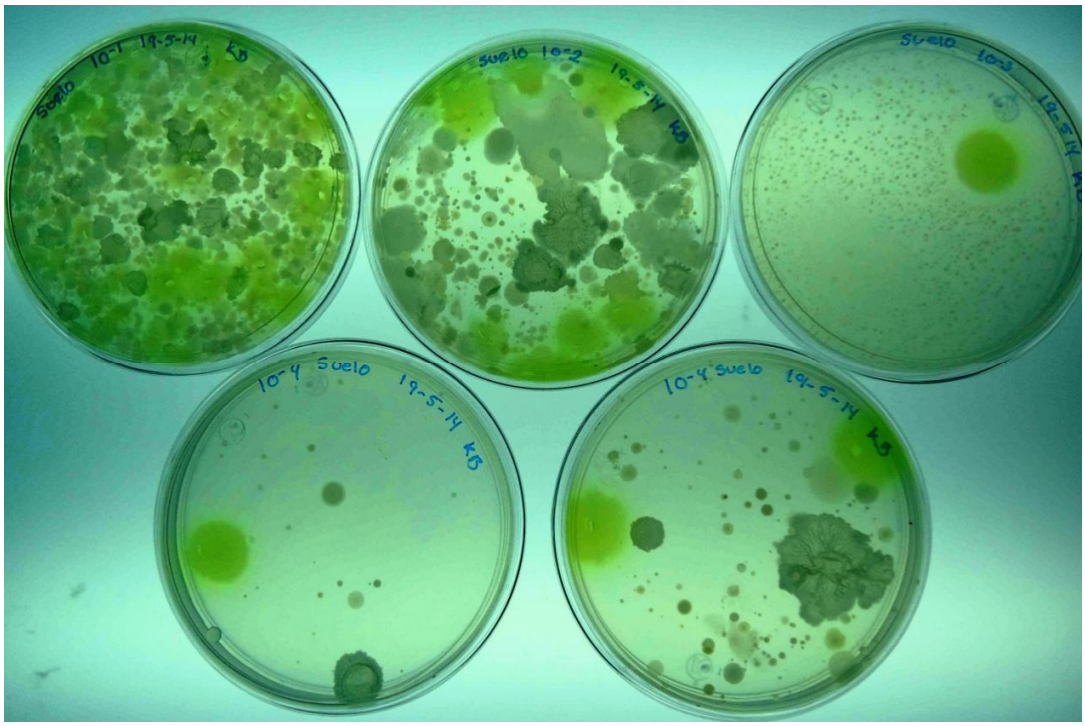


Figura 2. Crecimiento verde-amarillo típico de *P. aeruginosa* sobre medio KB. El aislado se realizó a partir de suelo rizosférico de nardos enfermos por pudrición blanda.

La amplificación de la región intergénica (ITS) de *P. aeruginosa* es de 558 pb de acuerdo a una determinación *in silico* en el genoma de *P. aeruginosa*. De los 31 aislamientos presumiblemente aislados como *P. aeruginosa* solo 29 amplificaron la banda esperada de 558 pb (Figura 3a). Para determinar con mayor precisión que los 29 aislamientos seleccionados con los ITS de *P. aeruginosa,* se realizó un análisis de ITS-RFLP. La digestión del fragmento del ITS se realizó con la enzima *CfoI*, de acuerdo a una digestión *in silico* generaría 5 fragmentos característicos de *P. aeruginosa* (221, 143, 104, 72 y 18 pb) en comparación con *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (cepa 1448A) (306, 202, 106 y 18 pb) (Figura 3). Posterior a la digestión de los ITS de los 29 aislamientos pertenecientes a *P. aeruginosa* se encontró que el patrón de fragmentos coincidió con el patrón típico de *P. aeruginosa*, por lo que se concluyó que estos aislamientos son cepas de *P. aeruginosa*.

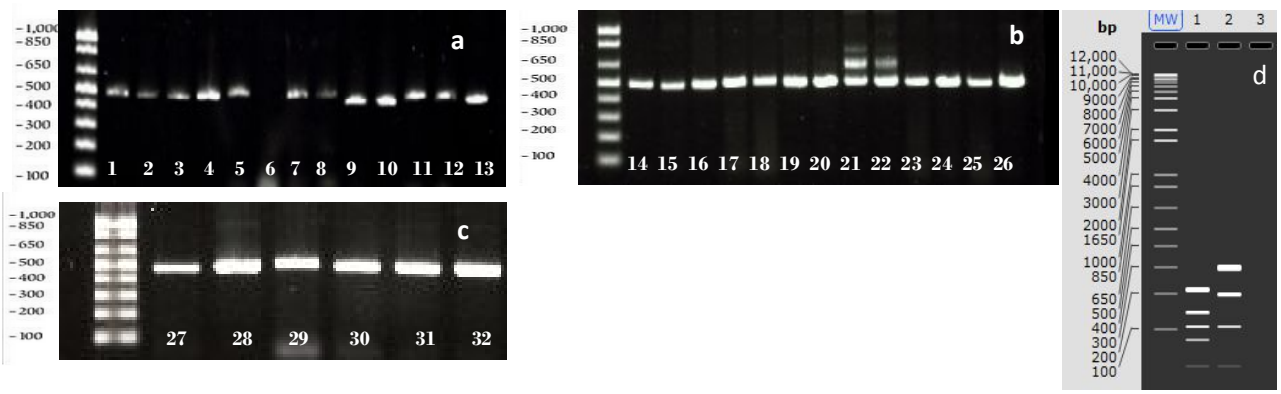


Figura 3. Patrones típicos de ITS de *Pseudomonas aeruginosa* de los distintos aislamientos a partir de rizosfera de nardo proveniente de plantaciones de Morelos. (a). Amplificación de cepas Pa (línea 1) y asilamientos 1 al 12 (línea 2 a 13); (b) aislamientos 13 a 25 (línea 15 a 26); (c) aislamientos 26 a 31(línea 27 a 32); (d) ITS-RFLP: Digestión del ITS con *CfoI in silico* del amplificado de las cepas de *P. aeruginosa* (carril 1) y *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (carril 2).

Con el fin de corroborar que las cepas empleadas de *Pseudomonas* correspondían a los patovares se realizó una amplificación del ITS de esos patovares. Peters [4] realizaron un estudio de caracterización de *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*, utilizando como testigos a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* y *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, en donde se puede observar que el fragmento de ADN amplificado para los ITS fue de 250 pb, lo cual coincidió con lo encontrado en este estudio, en este mismo sentido en *Pseudomonas syringae pv*. tomato mostró una amplificación igual a lo obtenido en este trabajo (600 pb) [5]. Mientras tanto para las cepas de *Pseudomonas syringae* pv. *glycine*, *phaseolicola* y *tomato* su fragmento de ADN amplificado fue verificado mediante un análisis *in silico*, lo cual coincidió con lo encontrado en el producto de la PCR.

Finalmente, respecto a las pruebas de patogenicidad realizadas en hojas de endivias (*Cichorium endivia*) se encontró que solo 27 cepas de las 29 fueron fitopatógenas, dado que fueron capaces de provocar pudrición blanda (Figura 4B). Por otro lado también se encontró una diversidad en el grado de la enfermedad por parte de las diferentes cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. Las cepas 7 y 23 mostraron solo una respuesta hipersensible en la hoja. Mientras que las cepas 4, 9, 11, 12, 17 y 22 maceraron por completo las hojas de endivias, mientras que el resto de las cepas solo presentó algún grado de virulencia sobre hojas de endivias (Figura 4A).

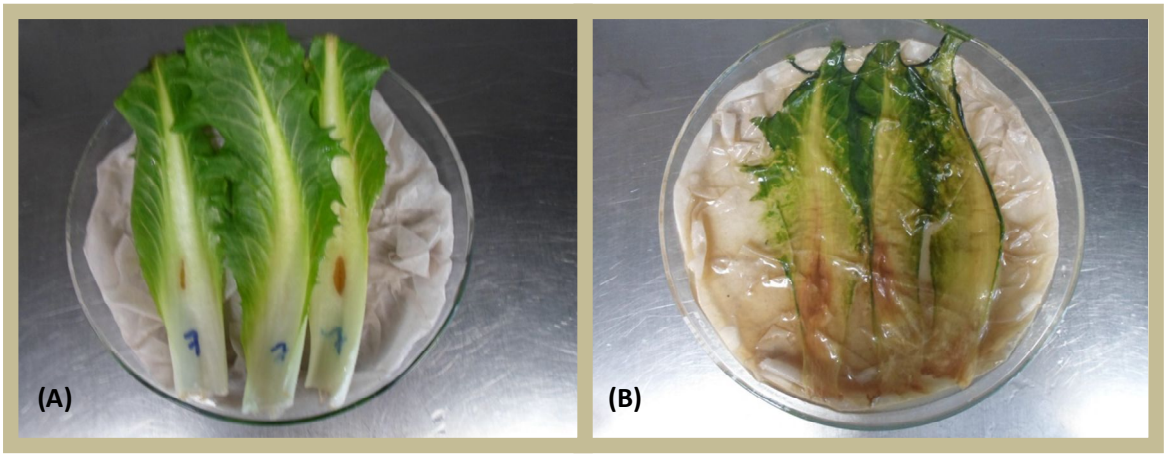


Figura 4. Muestra representativa de las pruebas de patogenicidad y virulencia del banco de cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. (A) La cepa 7 solo es capaz de inducir un mínimo de pudrición blanda mientras que la cepa 17 (B) causa una pudrición blanda completa de todas las hojas de endivias después de 5 días de incubación a 28°C.

Pruebas de patogenicidad sobre otras plantas hospederas mostraron distintos resultados, para frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) la cepa 17 mostró mayor patogenicidad con síntomas similares a la cepa 1448A de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, sin embargo fueron menores a los provocados por la cepa BV157 de *Pseudomonas aeruginosa*. Las pruebas realizadas en petunia (*Petunia* sp.) y chile (*Capsicum annuum* L.) no mostraron síntomas de enfermedad; finalmente un ensayo realizado *in vitro* en violeta africana (*Saintpaulia ionantha*) mostró que varias cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (entre ellas la 17) maceraban al 100 % hojas de esta especie ornamental.

CONCLUSIONES

Se aislaron e identificaron 29 cepas como *Pseudomonas aeruginosa* a partir de suelo de rizosfera de nardos enfermos por pudrición blanda. 27 de las cepas aisladas de *Pseudomonas aeruginosa* son fitopatógenas y presentan un distinto grado de virulencia.

AGRADECIMIENTOS

Al Fondo Mixto de Fomento Científico y Tecnológico CONACYT-Gobierno del Estado de Morelos por el financiamiento del proyecto "Uso del axihuitl o hierba de agua (*Eupatorium* sp) para control de enfermedades de nardo (*Polianthes tuberosa*) y cultivos ornamentales en agricultura protegida" con el número de proyecto MOR-2009-C02-120296. Beatriz Guardado-Fierros, agradece a CONACYT por la beca para estudios de maestría.

REFERENCIAS

[1] Rivera, L. (2011). Estudio del agente causal de la pudrición blanda en nardo del estado de Morelos. (Tesis para obtener el titulo de Licenciado en Biologia. UdeG, Guadalajara Jalisco, México).

[2] Jensen, M. A., J. A. Webster, N. Straus. (1993). "*Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphism*". Microbiology 59: 945-

952.

[3] Sambrook, J., E.F., Fritsch, T. Maniatis, Sambrook, J. (2001). "*Molecular cloning: a laboratory manual*". 3er Edition. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory.

[4] Peters, B., Ash G., Cother E., Hailstones D., Noble D., Urwin, N. (2004). "*Pseudomonas syringae pv. maculicola in Australia: pathogenic, phenotypic and genetic diversity*". Plant Pathology 53: 73-79.

[5] Rahme, L.G., Stevens, E.J., Wolfort, S.F., Shao, J., Tompkins, R. G., Ausubel, F., *et al.* (1995). "*Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals*". Science 268: 1899-1902.

PRODUCTION OF BACTERICIDAL SUBSTANCES IN AXIHUITL BY EFFECT OF MYCORRHIZATION AND ORGANIC MATTER

(Producción de sustancias bactericidas del axihuitl por efecto de la micorrización y materia orgánica)

Susana García-Téllez[a,b], Evangelina Esmeralda Quiñones-Aguilar[a], Luís López-Pérez[b], Sylvia Patricia Fernández-Pavía[b], Gabriel Rincón-Enríquez[a*+]

[a] Biotecnología Vegetal del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A. C.
[b] Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: grincon@ciatej.mx.

Área del Conocimiento: Fitopatología.

ABSTRACT
Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) are obligate symbiotic microorganisms associated with the roots of plants. This association may change the concentration of secondary metabolites produced by plants. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of different AMF commercial and native inoculum, and organic matter (MO) added to the soil on the concentration of bactericidal substances produced axihuitl (*Eupatorium aschembornianum* Sch.) plants. Under greenhouse conditions, one experiment of mycorrhizal inoculums: one commercial use (*R. intraradices*, Ri), two natives of Michoacán (Las Campesinas and Cerro del Metate), three of Morelos (Copalcohuitl, Tezontitla and Antiguas Vias del Tren) and two sources of matter was evaluated organic to 5, 2.5 and 0% v/v (cane rum compost and soil rich in organic matter originating from Morelos). The axihuitl plants in the experiment Ri treating with compost cane or soil rich showed the greatest vegetative growth, while Antiguas Vias del Tren treatments with 5% and 2.5% of cane as a source of organic material, had the highest percentage of mycorrhizal colonization of 61 and 60% respectively. The extracts of axihuitl showed bactericidal activity at a concentration of 60 mg mL^{-1} against *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* (Psph), were: Ri with 5% of cane; Las Campesinas and Ri 5% of soil rich in organic matter originating from Morelos. These treatments showed 100% inhibition of Psph growth *in vitro*.

Keywords: Arbuscular mycorrhizal fungi, bacterial plant extract, *Eupatorium aschembornianum* Sch, *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*.

RESUMEN
Los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) son microorganismos simbióticos obligados asociados a las raíces de las plantas. Esta asociación puede cambiar la concentración de metabolitos secundarios producidos por las plantas. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de diferentes inóculos de HMA comercial y nativos, y materia orgánica (MO) agregada al suelo sobre la concentración de sustancias bactericidas producidas por plantas de axihuitl (*Eupatorium aschembornianum* Sch.). En condiciones de invernadero, un experimento fue realizado con: 1) inóculos de micorrizas; uno comercial

(*R. intraradices*, Ri), dos nativos de Michoacán (Las Campesinas y Cerro del Metate), tres nativos de Morelos (Copalcohuitl, Tezontitla y Antiguas Vias del Tren); 2) dos fuentes de la materia orgánica al 5% v/v (composta de caña azúcar y el suelo rico en materia orgánica procedente de Morelos). Las plantas de axihuitl en el experimento tratadas con Ri y composta caña o suelo rico mostraron el mayor crecimiento vegetativo, mientras que los tratamientos inoculados con Antiguas Vías del Tren y con 5 o 2.5% de composta de caña como fuente de materia orgánica, tuvieron el mayor porcentaje de colonización micorrícica, 61 y 60%, respectivamente. Los extractos del axihuitl que mostraron actividad bactericida a una concentración de 60 mg mL^{-1} frente a *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* (Psph), fueron: Ri con 5% de composta de caña; Las Campesinas y Ri con suelo rico en materia orgánica procedente de Morelos al 5%. Estos tratamientos mostraron una inhibición del 100% del crecimiento de Psph *in vitro*.

Palabras Clave: Hongo micorrizicos arbuscular, extracto vegetales bactericida, *Eupatorium aschembornianum* Sch, *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*.

INTRODUCCIÓN

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) son organismos del suelo que se asocian mutualistamente a las raíces de la gran mayoría. Además, promueven el incremento de la biomasa vegetal y modifican la concentración de metabolitos secundarios [1]. Sin embargo, los efectos funcionales de la colonización de los HMA han sido examinados solo en aproximadamente un 10% de las plantas hospederas [2] y los trabajos relacionados con el estudio de la interacción micorriza arbuscular (MA) enfocados al incremento de los metabolitos secundarios en plantas, aún son insuficientes [3]. Actualmente se realizan evaluaciones de la respuesta en el incremento de la concentración de principios activos en plantas medicinales, cuando son inoculadas con los HMA [4]. Muchos de los compuestos naturales, derivados de los metabolitos secundarios contienen ingredientes medicinales [5], como en las especies del género *Eupatorium*, distribuidas en todo el mundo y cuyas propiedades han sido utilizadas como medicamentos tradicionales. De las 1200 especies registradas, sólo se han investigado unas pocas hasta el momento, pero aún, muchas han recibido poca o nula atención en estudios fitoquímicos y biológicos, motivo por el cual debe enfocarse la búsqueda de los componentes bioactivos más potenciales (Li *et al*., 2008). Ante este hecho, en la planta silvestre, conocida como axihuitl (*Eupatorium aschembornianum* Sch.) se han encontrado compuestos con actividad bactericida, con base en pruebas realizadas en la especie bacteriana *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* [6]. Este fitopatógeno pertenece al grupo de bacterias que son capaces de ocasionar daños graves a plantas de frijol [7]. El axihuitl pertenece a la familia *Asteraceae* (*Compositae*), es una planta silvestre, también conocida como hierba de agua. Morfológicamente, tiene abundantes hojas con forma de corazón, con onditas alrededor de la hoja y contiene una especie de filamentos, es de tallo grueso y áspero al tocarlo, con manchas pequeñas en todo su alrededor y se da en varas grandes. Se le puede encontrar fácilmente en la época de lluvias y su periodo de floración ocurre entre los meses de noviembre a febrero en Tepoztlán Morelos México [6]. Por ello, el implemento del extracto del axihuitl como “bioplaguicida”, podría aplicarse en la agricultura orgánica y puesto que su origen es vegetal, es de bajo impacto ambiental. Pueden beneficiar al ambiente, dado que a diferencia de los productos químicos, estos son biodegradables, lo que provoca un impacto mínimo sobre el ambiente, son efectivos contra enfermedades y no tienen restricciones toxicológicas [8]. Por este motivo y considerando que los HMA pueden modifican la concentración de los metabolitos secundarios, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de distintos inóculos de hongos micorrízicos arbusculares y diferentes niveles de materia orgánica sobre la concentración de compuestos bioactivos sobre el crecimiento de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Psph). Para ello,

se establecieron experimentos en los que, se aplicaron distintos inóculos de HMA nativos del estado de Michoacán y de Morelos, así como un inóculo comercial, en tres fuentes y tres concentraciones de materia orgánica para plántulas de axihuitl bajo condiciones de invernadero. Se evaluó la efectividad bactericida de los extractos sobre Psph en condiciones *in vitro*, la hipótesis de trabajo fue que las plantas de axihuitl micorrizadas mostrarían una actividad bactericida (concentración mínima inhibitoria) menor a la reportada (80 mg mL^{-1}). Por lo cual el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de distintos inóculos de hongos micorrízicos arbusculares y materia orgánica en la concentración de compuestos bioactivos con efecto bactericida contra Psph y en la promoción del crecimiento.

METODOLOGÍA

Se estableció un experimento bifactorial en un diseño completamente al azar. Los factores estudiados fueron: 1. HMA (7 niveles): dos consorcios nativos del estado de Michoacán (Las Campesinas and Cerro del Metate), tres consorcios nativos del Estado de Morelos (Copalcohuitl, Tezontitla and Antiguas Vias del Tren), un inóculo comercial (*Rhizophagus intraradices*) y un control sin HMA. 2. Materia orgánica (MO) (dos niveles): composta a base de cachaza de caña (5%, v/v) y suelo de parcelas de cultivo del axihuitl de Morelos (5% (v/v)) y un control sin MO. De la combinación de los niveles de los dos factores se generaron 21 tratamientos y se realizaron 10 repeticiones, conformando un total de 210 unidades experimentales. El experimento se mantuvo en invernadero durante 6 meses. La unidad experimental estuvo conformada por macetas con arena estéril (120°C durante tres horas tres días consecutivos) de 1.5 Kg y una planta por macetas. Se inocularon 80 esporas de HMA de los distintos consorcios de HMA. El experimento se mantuvo en condiciones de invernadero bajo una malla sombra con apertura 80-20 ubicado en la UMSNH. El experimento fue evaluado hasta los 180 días después de establecido el experimento. Para la obtención de los extractos del axihuitl se emplearon el tallo y las hojas del axihuitl completamente secas, protegidas de la luz. La parte aérea se fraccionó en trozos más pequeños y se molió. A partir de este material se realizo una extracción con acetona por maceración por dos semanas en la Figura 1A se presenta de manera esquemática la preparación de los extractos. Para evaluar la actividad biológica de los extractos contra *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Psph) se realizo mediante el método propuesto por Godinez, de manera resumido se presenta en la Figura 1B.

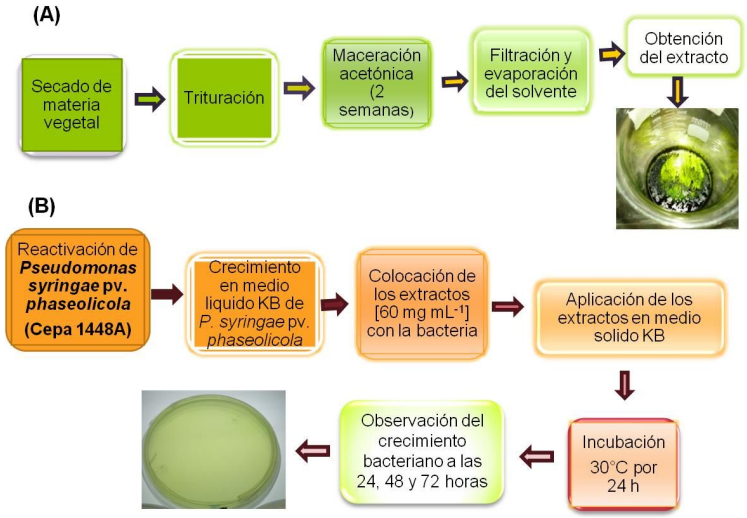


Figura 1.- Esquema general de la preparación de los extractos acetonicos del axihuitl (A) y de su evaluación de actividad bactericida contra *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (B).

Al final del experimento se registraron datos de longitud de raíz, volumen radical, pesos fresco y seco; colonización micorrizica [9, 10]. Los datos de esta variables fueron analizados estadísticamente mediante análisis de varianza y prueba múltiple de comparación de media Tukey a un nivel de significancia del 5% (*P≤0.05*) empleando el programa Statgraphics Centurión XV.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 2 se muestran plantas de axihuitl representativas de los distintos tratamientos. Dado que para hacer el extracto y evaluar su efectividad como bactericida es necesario tener material biológico resulta importante cuantificar el efecto de los distintos tratamientos sobre el crecimiento vegetal. Como se puede observar en la Figura 2 las plantas que contaron con MO mostraron mayor crecimiento.



Figura 2.- Plantas de axihuitl 120 días después de establecido el experimento bajo condiciones de invernadero. (A) Plantas de axihuitl tratadas con composta a base de cachaza de caña al 5%. (B) Plantas de axihuitl adicionadas con suelo de Morelos al 5%. (C) Plantas de axihuitl sin materia orgánica.

El efecto anteriormente comentado se complementa con los datos de la Tabla 1. En dicha tabla se observa que los tratamientos presentaron diferencias estadísticamente significativas en las distintas variables de crecimiento, además se observa que las plasnatas de axihuitl presentaron colonización por parte de los distintos consorcios de HMA. T1 *(R. intraradices* con composta 5%) presentó mayor volumen y longitud de raíz, así como mayor peso seco total, a diferencia de los demás tratamientos, mientras que el área foliar fue mayor en el tratamiento T2 (RI com 2.5%). El incremento en cuanto a la biomasa vegetal con *R. intraradices* ya se ha observado en trabajos con plantas medicinales, presentando incluso, un crecimiento 3 veces mayor al tratamiento que no se inoculó con el HMA [11].

Tabla 1. Efecto de los HMA y materia orgánica en el crecimiento de las plantas de axihuitl a los 180 días después de establecido el experimento bajo condiciones de invernadero.

Tratamiento Inóculo de HMA / MO	Volumen raíz (mL)	Longitud raíz (mm)	Colonización micorrízica (%)	Peso (g)	
				Fresco	Seco
T1 RI SM 5%	5.1 a	51.2 a	18 ef	24.0 a	4.6 a
T2 RI com 2.5%	2.4 b	47.8 a	28 de	15.0 b	3.6 a
T3 RI com 0%	0.8 bcd	38.3 a	36 de	3.9 fg	1.0 bc
T4 Ca SM 5%	1.5 bcd	50.1 a	20 ef	8.2 def	2.1 ab
T5 Ca com 2.5%	2 bc	50.9 a	57 ab	15.0 b	3.9 a

T6 Ca com 0%	0.8 cd	41.2 a	26 de	5.0 ef	1.6 bc
T7 CM com 5%	1.6 bcd	47.7 a	38 cd	7.2 def	1.8 bc
T8 CM com 2. 5%	1.5 bcd	47.3 a	51 ab	13.2 bc	3.2 a
T9 CM SM 0%	0.8 cd	37.8 a	34 de	5.1 ef	1.4 bc
T10 CO com 5%	1.3 bcd	43.8 a	22 de	6.2 def	1.6 bc
T11 CO com 2.5%	1.7 bcd	43.5 a	50 bc	10.7 cd	3.0 ab
T12 CO SM 0%	1 bcd	39.3 a	31 de	5.0 ef	1.3 bc
T13 AV com 5%	1.6 bcd	38.0 a	61 ab	8.5 def	2.1 ab
T14 AV com 2.5%	2.1 bc	44.8 a	60 ab	14.7 b	3.9 a
T15 AV SM 0%	0.1 d	7.6 b	40 cd	1.1 g	0.5 c
T16 Te com 5%	1 bcd	44.5 a	40 cd	6.8 def	4.5 b
T17 Te com 2.5%	2.7 b	40.0 a	54 ab	14.72 b	4.2 a
T18 Te SM 0%	0.9 bcd	44.8 a	54 ab	6.1 ef	1.2 bc
T19 Sin HMA/Com 5%	1.2 bcd	46.05 a	-	8.0 def	2.1 ab
T20 Sin HMA/Com 2.5%	0.8 cd	37.41 a	-	4.0 fg	0.9 bc
T21 Sin HMA/SM 0%	0.5 d	37.87 a	-	3.5 fg	0.9 bc

RI (*Rhizophagus intraradices*), Ca (Campesinas), CM (Cerro del Metate), Co (Copalcohuitl), AV (Antiguas Vías del Tren), Te (Tezontitla), HMA (hongo micorrízico arbuscular), Com (composta), SM (Suelo de Morelos). Medias con letras diferentes por columnas indican diferencias estadísticamente significativas según Tukey (*P< 0.05*).

Los extractos acetonicos de axihuitl se aplicaron a una concentración de 60 mg mL^{-1} para evaluar si el compuesto bactericida se incrementó su concentracion por efecto de la prsencia de los HMA en las raices, ya que esta concentración aplicada es menor a la concentración ya conocida como mínima inhibitoria (80 mg mL^{-1}). Los extractos acetonicos que presentaron un incremento en la actividad bactericida fueron obtenidos de los tratamientos: T1 (*R. intraradices* con cachaza 5%), T2 (*R. intraradices* con suelo de Morelos 5%) y T5 (Campesinas con Suelo de Morelos 5%) (Tabla 2).

Tabla 2. Prueba de efectividad biológica de extractos acetonicos de axihuitl contra *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* bajo condiciones *in vitro*.

TRATAMIENTO	PRESENTÓ INHIBICIÓN BACTERIANA		
	[80 mg mL^{-1}]	[60 mg mL^{-1}]	[40 mg mL^{-1}]
T1(*R. intraradices* / cachaza 5%)	-	si	no
T2(*R. intraradices* / Suelo Morelos 5%	-	si	no
T3 (*R. intraradices* / MO 0%)	no	no	-
T4 (Campesinas / cachaza 5%)	no	no	-
T5(Campesinas / Suelo Morelos 5%)	-	si	no
T6 (Campesinas / MO 0%)	no	no	-
T7 (Cerro Metate / cachaza 5%)	no	no	-
T8 (Cerro Metate / Suelo Morelos 5%)	no	no	-
T9 (Cerro Metate / MO 0%)	no	no	-
T10 (Copalcohuitl / cachaza 5%)	no	no	-
T11 (Copalcohuitl / Suelo Morelos 5%)	no	no	-
T12 (Copalcohuitl / MO 0%)	no	no	-
T13 (Antiguas vias del tren /cachaza 5%)	no	no	-
T14 (Antiguas vias / Suelo Morelos 5%)	si	no	-
T15 (*R. intraradices* / MO 0%)	no	no	-
T16(Tezontitla / cachaza 5%)	no	no	-
T17 (Tezontitla / Suelo Morelos 5%)	si	no	-
T18 (*Tezontitla* / MO 0%)	no	no	-
T19 (Sin HMA/ cachaza 5%)	no	no	-
T20 (Sin HMA/ Suelo Morelos 5%)	si	no	-
T21 (Sin HMA/ MO 0%)	si	no	-

RI (*Rhizophagus intraradices*), Ca (Campesinas), CM (Cerro del Metate), Co (Copalcohuitl), AV (Antiguas Vías del Tren), Te (Tezontitla), HMA (hongo micorrízico arbuscular), Cachaza (composta), SM (Suelo de Morelos).

Estos resultados parecen apoyar el hecho de que el incremento del crecimiento por efecto de los HMA también presentó un efecto en la inhibición de la bacteria, sin embargo esto no se observó en todos los tratamientos, por lo cual, el incremento del compuesto bactericida pudiera estar más relacionado al efecto de alguna especie en particular de HMA contenida en los consorcio de HMA empleados como inóculos en los tratamientos donde se muestra inhibición del crecimiento de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*.

CONCLUSIONES

Rhizophagus intraradices promueve el crecimiento vegetal de plantas de axihuitl y mostro tener un efecto sobre el incremento del compuesto bioactivo, de extractos acetonicos de axihuitl, que participa en la inhibición del crecimiento bacteriano de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* bajo condiciones *in vitro*.

AGRADECIMIENTOS

Al Fondo Mixto de Fomento Científico y Tecnológico CONACYT-Gobierno del Estado de Morelos por el financiamiento del proyecto " Uso del axihuitl o hierba de agua (*Eupatorium* sp.) para control de enfermedades del nardo *Polianthes tuberosa* y cultivos ornamentales en agricultura protegida" con el número de proyecto MOR-2009-C02-120296. Susana García-Téllez, agradece a CONACYT por la beca para estudios de maestría.

REFERENCIAS

[1] Pedone, B.M.V.L., Lins, M.A., Coehlo, L.R., Santana, S.A., Silva, F.S.B., Maia, L.C. (2012). "Mycorrhizal technology and phosphorus in the production of primary and secondary metabolites in cebil (*Anadenanthera colubrine* (Vell.) Brenan) seedlings", J Sci Food Agric. 93: 1479-1484.

[2] Montaño, N.M., Alarcón, A., Camargo, R.S.L., Hernández, C.L.V., Álvarez, S.J., et al. (2012). "Research on arbuscular mycorrhizae in México: an historical synthesis and future prospects", Symbiosis DOI 10.1007/s 13199-012-0184-0.

[3] Falcón, O.E., Riera, N.M.C., Rodríguez, L.O. (2013). "Efecto de la inoculación de hongos micorrizógenos sobre la producción de posturas forestales en dos tipos de suelo", Cultivos Tropicales 34(3): 32-39.

[4] De la Rosa, M.C.J. (2009). Micorriza arbuscular y abiótica en el contenido de alcaloides (Vinblastina y Vincristina) de *Catharanthus roseaus* (L) G. Don. (Tesis, COLPOS, Montecillo, Edo. de México). 117 p.

[5] Lewinsohn, E., Gijzen, (2009). "Phytochemical diversity: The sounds of silent metabolism", Plant Science 176: 161-169.

[6] Godínez, V.A.M. (2012). Efecto antimicrobiano *in vitro* de extractos de *Eupatorium aschembornianum* sobre *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. (Tesis de Licenciatura, Universidad de Guadalajara. Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías. Guadalajara, Jalisco). p. 98.

[7] Young, J.M., Allen, C., Countinho, T., Denny, T., Elphinstone, J., Fegan, M., et al. (2008). "Plant-pathogenic bacteria as biological weapons - real threats?", Phytopathology 98: 1060-1065.

[8] Chirinos, J. (2009). "Uso de extractos naturales como una alternativa ecológica para el control de enfermedades en plantas", INIA Divulga 14: 40-42.

[9] Phillips, J.M., Hayman, D.S. (1970). "Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection", Trans. Br. Mycol. Soc. 55: 158-160.

[10] McGonigle, T., Miller, M., Evans, D., Fairchild, G., Swan, J. (1990). "A new method wich gives and objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi", *New Phytologist* 115: 495-501.

[11] Araim, G., Saleem, A., Arnason, J.T., Charest, C. (2009). "Root colonization by an arbuscular mycorrizal (AM) fungus increases growth and secondary metabolism of purple coneflores *Echinacea purpurea* (L.) Moench", J. Agric. Food Chem. 57: 2255-2258.

GENETIC VARIABILITY OF STRAINS OF *Fusarium solani* ISOLATED FROM STEM ROT OFAGAVE (*Agave tequilana* WEBER var. Azul) PLANTS WITH WILT SYMPTOMS

(Variabilidad genética de aislados de *Fusarium solani* obtenidos de pudriciones de tallo de plantas de agave (*Agave tequilana* Weber var. azul) con síntomas de marchitez)

Viviana Montaño-Becerra[a]*, Martín Eduardo Ávila- Miranda[a+], Norma Alejandra Mancilla-Margalli[a], Pedro Posos-Ponce[b]

[a]División de Estudios de Posgrado e Investigación, Instituto Tecnológico de Tlajomulco Jalisco
[b] Departamento de Producción Agrícola, Centro Universitario de Ciencia Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: avilamiranda@yahoo.com

Área del Conocimiento: Fitopatología.

ABSTRACT
Mexican tequila is the alcoholic beverage most significant in the world and is made by rule from "pineapples" obtained from the agave plant (*Agave tequilana Weber var. azul*) .The wilt is one of the most important problems of the agave plant protection tequila. So far it is reported in a publication with arbitration, the pathogen *Fusarium oxysporum*, is capable of inducing a vascular wilt in the crop. However, it has also been reported, which were obtained isolates strains of *Fusarium solani*, from necrotic lesions of root, crown and base of the stem, plants wilt incidence of agave. In this work we tried to determine the genetic diversity of nineteen isolates obtained F.solani tequila agave plants exhibiting stem rot and wilt symptoms, from different municipalities of four producing areas of agave in Jalisco. DNA molecular markers used were: Traces gene rep-PCR using the primers REP; ITS1-5.8-ITS2 sequencing and fragment elongation factor EF-1α translation. ITS1-5.8-ITS2 sequences were compared with sequences available in the GenBank database using the program MegaBLAST; to the EF-1α gene GenBank addition, also they compared with sequences available in the database of Fusarium-ID data. The two databases indicated that sixteen isolates are very similar to sequences reported for F.solani. The analysis of the similarity of the sequences of the two amplified fragments and the similarity between the Rep-PCR fingerprints indicate varying degrees of genetic diversity among isolates, resulting in the formation of four groups, although all were obtained from necrotic lesions induced to agave plants. This seems consistent with the wide variety of hosts reported for this species and could be an indirect indicator of variability of its virulence agave plants.

Keywords: ITS1-5.8S-ITS2; rep-PCR; EF-1α

RESUMEN
El tequila es la bebida alcohólica mexicana de mayor trascendencia en el mundo y se elabora por norma a partir de “piñas” obtenidas del agave tequilero (Agave tequilana Weber var. azul). La marchitez, es el problema fitosanitarios más importante de este cultivo. Esta reportado que el fitopatógeno F. oxysporum, es capaz de inducir una marchitez tipo vascular en el cultivo de agave. Sin embargo,

también ha sido reportado, que con frecuencia se han obtenido aislamientos del hongo Fusarium solani, a partir de lesiones necróticas de raíz, corona y base del tallo, en plantas con incidencia de marchitez del agave. En este trabajo se determinóla diversidad genética de diecinueve aislados de F.solani obtenidos de plantas de agave tequilero que presentaban pudrición del tallo y síntomas de marchitez, procedentes de distintos municipios de cuatro zonas productoras de agave en Jalisco. Los marcadores moleculares de DNA utilizados para determinar esta diversidad fueron: Huellas génicas rep-PCR, utilizando los iniciadores REP; secuenciación del fragmento ITS1-5.8-ITS2 y secuencia del factor de elongación de la traducción 1α (EF-1α).Las secuencias ITS1-5.8-ITS2 se compararon con secuencias disponibles en la base de datos GenBank utilizando el programa MegaBLAST; para el gen EF-1α además del GenBank, también se compararon con secuencias disponibles en la base de datos Fusarium-ID. Las dos bases de datos indicaron que dieciséis de los aislados son muy similares a secuencias reportadas para F.solani. El análisis de la similaridad de las secuencias de los dos fragmentos amplificados y de las huellas génicas obtenidas por el marcadorRep-PCR, indican diferentes grados de diversidad entre aislados, dando lugar a la conformación de cuatro grupos de diversidad génica, aun cuando todos fueron obtenidos de lesiones necróticas inducidas a plantas de agave. Esta evidente diversidad génica, parece concordar con la gran diversidad de hospederos reportados para este fitopatógeno y pudiera ser un indicativo indirecto de su variabilidad en nivel de virulencia al cultivo de agave.

Palabras Clave: ITS1-5.8S-ITS2; rep-PCR; EF-1α

INTRODUCCIÓN

El tequila es la bebida alcohólica mexicana de mayor trascendencia en el mundo, que se elabora a partir de “piñas” obtenidas del *Agave tequilana Weber var*azul. Aun cuando este cultivo se considera muy rústico y resistente a enfermedades, últimamente ha mostrado sufrir daños muy severos por esta causa [1]. La marchitez es el problema fitosanitario que más limita la producción de agave tequilero [2]. Los síntomas reportados para esta enfermedad incluyen, marchitez, encarrujamiento de hojas, secado de las hojas más viejas, pudrición de tallo y de la raíz y si la planta es empujada lateralmente, cae fácilmente debido a una severa necrosis de la raíz [3]. Desde hace algunos años, se reporta a *Fusarium oxysporum*como el agente etiológico de esta enfermedad [4]. Así, en el año 2010 se corroboró la capacidad patogénica de aislados de *F. oxysporum* obtenidos del tallo de plantas de agave tequilero con síntomas de marchitez. El estudio anterior corroboró en invernadero, la inducción de una marchitez de tipo vascular en plantas de agave procedentes de cultivo *in vitro*, evidenciándose daño en los haces del xilema, pero sin provocar la necrosis masiva de raíces observadas en campo, síntoma que es comúnmente reportado para describir la marchitez del agave. Sin embargo, en este estudio fueron identificados aislados de *Fusarium solani* obtenidos de raíces, corona y base del tallo necrosadas, de plantas con incidencia de marchitez del agave en campo [5].

Fusarium solani es un hongo filamentoso que se distribuyen ampliamente en los suelos, y es el agente causal de varias enfermedades cuyos síntomas principales son pudrición de raíces, tallos y el marchitamiento de las partes superiores de la planta. *F. solani* se sub-clasifica en formas especiales (*phaseoli*, *pisi*, cucurbitae, *batatas*, *radicícola*, *robiniae*, *mori*, *piperis*, *eumartii, zanthoxyli, hibisco y lycopersici*) basado en hospederos especificos [6]). Las variaciones en el grado de virulencia en formas especiales, así como la diversidad genética en aislamientos de diferentes orígenes revelan que *F. solani*es un complejo de varias especies filogenéticas responsables de fitopatogenicidad diferente, probablemente correlacionada a diversidad genética [7]. Hasta el momento *F. solani* solo se ha aislado pero no se ha asociado con la denominada marchitez del agave [8]. Por lo cual este trabajo busco analizar la diversidad genética de 19 aislados de *Fusarium solani*, obtenidos de plantas de agave

tequilero que presentaban pudrición del tallo y síntomas de marchitezde cinco zonas productoras de Jalisco. Los marcadores moleculares utilizados incluyeron: ADNr espaciadores transcritos internos (ITS1-ITS2), factor uno alfa de elongación (EF-1α) y secuencias de DNA repetitivas (rep-PCR) para su caracterización. El marcador EF-1α, actualmente es considerado el marcador esencial en análisis multigénicos, con alto nivel de resolución para el género *Fusarium*, que discrimina especies aun dentro de complejos de especies. El gen ribosomal y sus espacios intergénicos, debido a que tienen una organización conservada en todos los eucariontes que contienen regiones muy conservadas (18S, 5.8S y 28S), que permiten un fácil diseño de iniciadores en regiones conservadas que a su vez están separadas por secuencias muy variables denominadas espacios intergénicos ITS y el IGS que se consideran una huella genómica para cada hongo[9]. Además,rep-PCR que utiliza iniciadores que hibridan con secuencias de DNA repetitivas (secuencias rep) de muchos microorganismos, incluidos los hongos, evidenciando polimorfismo resultado de la variabilidad en la repetición y la distancia entre copias contiguas causadas por inserciones o deleciones de DNA. La secuencia repmás utilizada en hongos es REP (secuencias repetitivas palindromicasextragenicas) [10, 11].

METODOLOGÍA

Cepas fúngicas. Diecinueve aislados de *F. solani* que se utilizaron en este estudio se obtuvieron de raíces, corona y base del tallo, en plantas de agave con incidencia de marchitez, localizadas en diferentes campos comerciales de cinco municipios de Jalisco (Tabla 1). Los aislados se purificados como cultivos monospóricosdespués de corroborarse su ubicación taxonómica a especie, con metodologías reportadas por [12].

Extracción de ADN genómico. De cada aislado se generó micelio durante 10 días en oscuridad a 28°C, que se utilizó para realizar la extracción del DNA genómico utilizando el kit comercial ZR Plant/Seed DNA MiniPrep®.

Amplificación del fragmento ITS1-5.8S-ITS2 y del gen EF-1α. Se amplificó el fragmento ITS1-5.8S-ITS2, utilizando los iniciadores ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3') e ITS4 (5´TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3´) propuestos por, White et al, (1990), para el gen EF-1α se usaron el iniciador ef1H (5´ATGGGTAAGGAAGACAAGAC3´) y ef-2T (5´GGAAGTACCAGTGATCATGTT 3´) (O'Donnell*et al.*, 2008), ambas amplificaciones se realizaron en un termocicladorCorbett® modelo Palm Cicler.Los programas de amplificación utilizados fueron: una etapa de desnaturalización inicial a 95ºC por 2 min; treinta ciclos de desnaturalización a 94ºC por 1 min, alineamiento a 61ºC por 2 min y extensión a 72ºC por 2 min y un paso final de 72ºC por 6 min para ek fragmento ITS1-5,8-ITS2;Una etapa de desnaturalización inicial a 95ºC por 2 min, seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 95ºC por 1 min, alineamiento a 55ºC por 1 min y extensión a 72ºC por 2 min, por último una etapa de extensión a 72ºC por 6 min, para amplificar EF-1α.

Electroforesis de los productos amplificados. A todos los productos de PCR se les realizó electroforesis, corriendo 2µl del producto con 2µl de buffer de carga (6X Gel LoadingDye) en Buffer TAE) a 90 Volts por 40 min. Los fragmentos amplificados se tiñeron con SyberSafe® y se visualizaron en transiluminador de luz azul Dark Reader®, para ser fotografiados. Su tamaño se determinó por comparación en gel con el marcador de peso molecular HyperLadder de 100 pb.

Purificación y Secuenciación. Los productos de PCR fueron purificados con el kit PCR Gel/PCR DNA FragmentExtraction Kit 100 PrepsIBI®, para mejorar sus características previo a su secuenciación. Los fragmentos se secuenciaron en la Unidad de Servicios Genómicos, del Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad en CINVESTAV-campus Guanajuato, México.

Análisis de secuencias. Las secuencias del fragmento ITS1-5.8S-ITS2 se compararon con las secuencias disponiblesde *Fusarium* en las bases de datos del GenBank del NCBI, con el fin de obtener reportes taxonómicos con base a su homología con otras secuencias utilizando BLASTN con la opción MEGABLAST. Los electroferogramas fueron analizados con el programa BioEdit ver. 4.8.9 SequenceAlignment Editor NC University. En el que todas las secuencias se alinearon, utilizando la aplicación Clustal W para alineamiento múltiple. Para el gen EF-1α, también se consultó la Base de Datos Fusarium-ID de la base de datos Cyber-infrastructurefor Fusarium (CiF).

Tabla 1. Lista de aislamientos de *Fusarium solani* obtenidos de plantas de agave tequilero con incidencia de marchitez del agave, obtenidos de plantas enfermas localizadas en diferentes campos comerciales en cinco municipios del estado de Jalisco

Clave del aislado	Municipio. Jalisco
P4-P2-P1-Sub-C7-A-G-H	Acatic
Dr	San Gabriel
O	Tecolotlán
CR-M	Teuchitlán
M1-D2-F3-C1-C.A-A3-C3	Zapotlanejo

Amplificación de secuencias REP-PCR.
Para evaluar la variabilidad intra-especie de las cepas de *F.solani* y generar grupos de diversidad. Se generaron huellas génicas utilizando con los iniciadores REP 1R y REP 21 según el protocolo propuesto por [11].

Electroforesis de los productos REP-PCR
Los productos amplificados se separaron por electrofóresis en gel de agarosa al 1.8%, en una cámara de 20 x 25 cm, con buffer de corrida TAE 0.5X, las muestras se mezclaron con buffer de carga (6X Gel LoadingDye) en proporción 7:3 y se corrieron durante 6 hr a 40V y 40mA. Como marcadores de peso molecular se utilizó HyperLadder IV 200 Lanes y HyperLadder 100bp, y al momento de preparar la agarosa se le adicionó SybrSafe® a una concentración de 1µl/20mL. Los geles se observaron en un transiluminador de luz azul y el gel fue fotografiado con una cámara CannonPowerShoot®.

Análisis genético de REP-PCR
Utilizando las imágenes digitalizadas de las huellas de los distintos aislados se generó una matriz de 0 y 1 comparando las huellas génicas entre los distintos aislados. Las matrices fueron analizadas mediante el coeficiente de asociación por apareamiento simple con el programa NTSYS-pc versión 2.02j, donde se generó un análisis de grupos que fue analizado con el índice de Shanonusando el método UPGMA (Distancia entre un par de locus por promedios aritméticos), para obtención del dendograma.

RESULTADOS
La región amplificada por los iniciadores IT1-ITS4 del gen ribosomal produjo un fragmento de aproximadamente 460 pb para todos los aislados de *F. solani* y la amplificación del gen EF-1α generó un fragmento de aproximadamente 730 pb.El análisis BLAST de las secuencias ITS1-5.8S.ITS2 y EF-1α en la base de datos GenBank y Fusarium-ID permitió ubicar dieciséis de los aislamientos en el complejo *F. solani*, pero la ubicación taxonómica de los aislamientos Dr-P1 y C.A no queda claramente establecida, sin embrago sus características morfológicas indican que los aislados pertenecena la especie *F. solani*.El dendrograma construido por el método de DNA Dis-*Neighbor-phylogenetictree*a partir de las secuencias EF-1α, agrupó los aislados en cuatro grupos de diversidad génica coeficiente de disimilaridaddel 0.01%.

Este mismo resultado se obtuvo con el dendrograma de la secuencia ITS1-5.8S-ITS2, que agrupó los aislados en cuatro grupos de diversidad génica, aunque con diferencia en sus integrantes, solo los aislados Dr, P1 y C.A permanecen agrupadas juntas (Figura 1). Todos los aislados fueron tipificables por REP-PCR, el promedio de bandas obtenido por electroforesis mostro un número de entre siete a doce bandas con tamaños entre 200 pb y 2,531 pb (Figura 2).

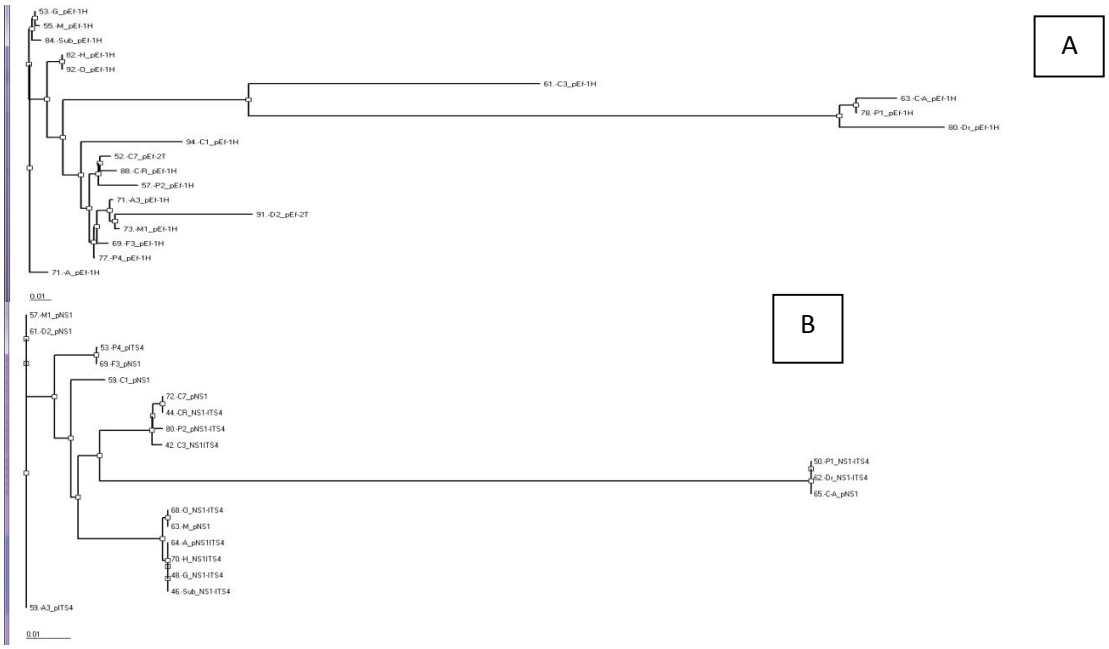


Figura 1. A) Dendrograma generado del análisis de secuencias de la región EF-1α. B) Dendrograma generado del análisis de secuencias de la región ITS1-5.8S-ITS4.

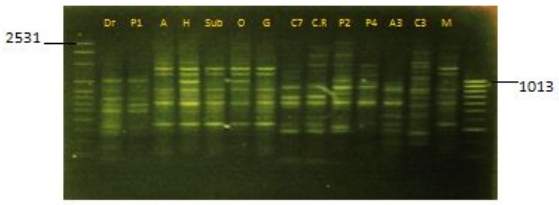


Figura 2. Productos de amplificación rep-PCR con los iniciadores REP1R y REP21 de 14 aislados de *F. solani* obtenidos de plantas de agave tequilero que presentaban pudrición del tallo y síntomas de marchitez, en cinco zonas productoras de Jalisco.

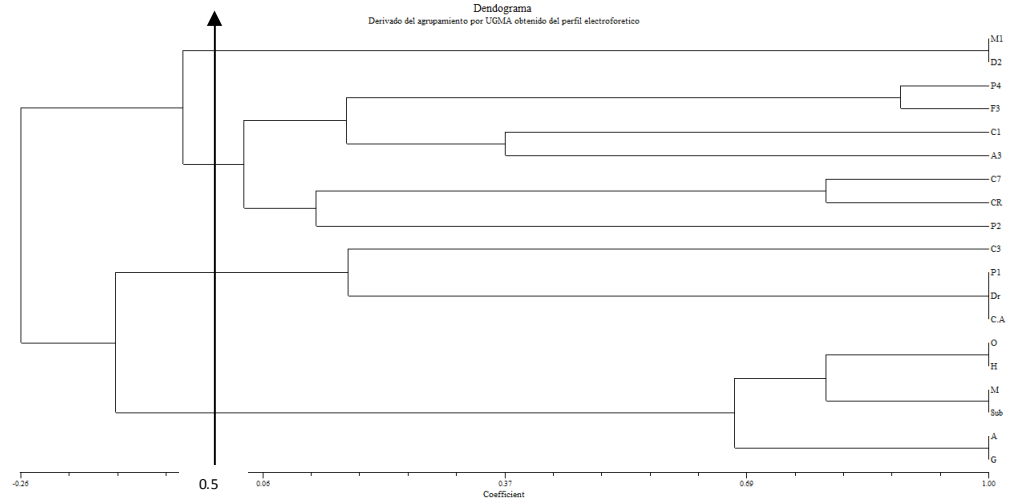


Figura 3. Dendrograma (UPGMA) generado a partir de fragmentos amplificados obtenidos por el marcador molecular rep-PCR con los iniciadores REP1R y REP21, en DNA total de aislados de *Fusarium solani* obtenidos de plantas de agave que presentaban pudrición del tallo y síntomas de marchitez, en cuatro zonas productoras de Jalisco.

DISCUSIÓN

Los marcadores moleculares secuencia ITS1-5.8S-ITS2, factor de la elongación de la traducción EF-1α y secuencias rep del DNA genómico,al momento de comparar sus secuencias con la base de datos del GebBank y Fusarium-ID, ubico a 16 de los aislados como *F. solani*, con un 99.99 de homología, aprovechando la ventaja de estos dos marcadores, porque basta definir una similitud alta de estas secuencias en relación a las bases de datos, para definir acertadamente su ubicación taxonómica, debido a que la variación dentro de los espacios es tan amplia, que permite identificar taxones muy cercanos [9, 15]. Sin embargo, de manera interesante, los aislados C.A, P1 y Dr, no tienen una homología tan alta con secuencias de ninguna de estas dos bases de datos, a pesar de que sus características morfológicas coinciden con las reportadas para *F. solani* y fueron obtenidos de plantas de agave con alta severidad de marchitez, lo que parece indicar que sus secuencias no han sido subidas a la base de datos Gen-Bank o a Fusarium-ID, que son muy utilizadas como referencia para una identificación, tipificación y filogenia más precisa del genero Fusarium [15].

El dendrograma obtenido agrupó a los 19 aislados en 4 diferentes grupos de diversidad con un coeficiente de similaridad del 0.05 (Figura 3).El análisis de la similaridad de las secuencias de los dos fragmentos amplificados y de la similaridad entre las huellas rep-PCR, indican diferentes grados de diversidad genética entre aislados, dando lugar a la conformación de cuatro grupos, aun cuando todos fueron obtenidos de lesiones necróticas inducidas a plantas de agave.

Este resultado ya se anticipaba, ya que diferentes autores han demostrado la complejidad genética del genero *Fusarium*, que sustenta el hallazgo de un gran número de especies filogenéticas dentro del complejo *F. solani* [17]. Otra explicación pudiera ser que los aislados obtenidos de plantas de agave con síntomas de marchitez, provenían de municipios distantes geográficamente entre sí y por lo tanto, esta diversidad es debida a biotipos producto de procesos evolutivos bajo condiciones ambientales diferentes por cambios ambientales, aunque es necesario recalcar, que aislados evaluados en este estudio que se evidencian como genéticamente muy similares, provienen de municipios muy distantes entre sí, pero esto puede suceder porque la propagación de este cultivo es principalmente vegetativa

mediante hijuelos, lo que favorece la dispersión de aislados del patógeno con mucha eficiencia, sin prácticamente ningún cambio genético [5,16].

CONCLUSIONES

Nuestro estudio concluyó que aislados de *F. solani obtenidos* de plantas de agave tequilero que presentaban pudrición del tallo y síntomas de marchitez, podrían componer una especie morfológica con amplia variabilidad genética, parece concordar con la gran diversidad de hospederos reportados para esta especie, pudiendo ser un indicativo indirecto de la variabilidad en su virulencia a plantas de agave.

REFERENCIAS

[1] INEGI. (2007). Censo Agropecuario 2007. El Cultivo del Agave Tequilero en Jalisco / Instituto Nacional de Estadística y Geografía.- México: INEGI, c2012. 14,20.

[2] SENASICA. (2013). Campaña contra plagas Reglamentadas del agave. Cita tomada de internet: senasica.gob.mx/includes/asp/download.asp?IdDocumento. Ultima visita 1/Julio/2015.

[3]Martínez, R.J.L., Vazquez, G.M., Pimienta, B.E., Torres, M.P., Bernal, M.F., Rodríguez, R.R, Flores, M.F. y Virgen, C.G. (1998) Centro de Investigación en Parasitología Vegetal, Departamento de Producción Agrícola, CUCBA U de G. Avances del proyecto: Epidemiología y manejo integrado de problemas fitosanitarios en agave. Foro de análisis de la problemática de la cadena productiva Agave-Tequila. 20-25.

[4] Luna, H.G. (1998). Pudrición del tallo de *Agave tequilana*Weber en el estado de Jalisco. México. (Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Chapingo. Edo. de México): 85.

[5] Ávila, M.M.E; López, Z,J.G; Arias, C; Rodríguez, M.A; Guzmán, D.A; Vera, J.A & Peña, J. J. (2010). "Vascular wilt caused by *Fusariumoxysporum* in agave *(Agave tequilana Weber var. azul)"*. J. PACD (2010) 12:166-180.

[6] Desjardins, A. E. (2006). *Fusarium*: Mycotoxins, Chemistry, Genetics and Biology. American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. APS Press; 184-185.

[7] Berenueza, T. R. V. B; Moura, C. R; Moiras, M. A; Neiva, T.O. (2004)"Genetic variability within *Fusarium solani* specie as revealed by PCR- Fingerprinting based on PCR markers".BrazilianJournal of Microbiology (2004) 35:205-210.

[8]Tlapal-Bolaños, B. (2013). Efecto de *Trichoderma* y *Bacillus*en la dinámica poblacional de *Fusarium*spp, en agave tequilero (*Agave tequilana* Weber. var. azul) en Jalisco. (Tesis doctoral, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo).30-32

[9] Rodríguez, T.A; Xoconostle, C. B; Valdés, M. (2004) "Ecología Molecular de los Hongos Ectomicorrizicos". Rev. Fitotec. Méx 27(3):267-278

[10] Edel, V; Steinberg, C; Avelange, I; Laguerre, G; Alabouvette, C. (1995) "Comparison of Three Molecular Methods for the Characterization of Fusarium oxysporum Strains". Techniques 85(5):579-585

[11] Rademaker, L.W; Bruijin, J.F. (1997). "Characterization of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis". MSU-DOE Plant Research Laboratory, Department of Microbiology, NSF Center for Microbial Ecology, Michigan State University, East Lansing. USA; 151-172.

[12] Leslie, J.F; Summerell, B.A. (2006) "Species Descriptions (*Fusarium solani* (Martius) Appel &Wollenweber emend. Snyder &Hansen".The Fusarium Laboratory Manual.Blackwell Publishing. USA; 250-255.

[15] Acevedo-Granados, F. (2013). Taxonomía molecular de aislamientos de *Fusarium*obtenidos a partir de muestras clínicas. (Tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia): 16-19.

[16] Summerell, B; Salleh, B; Leslie, J. (2003) "A Utilitarian Approach to Fusarium Identification". Plant Disease, 87(2) 117-128.

[17] Rincón-Sandoval, C. (2014). Modelo de evaluación para resolver problemas de filogenia molecular en el género *Fusarium*, basado en los análisis de microsecuencias de ADN de multilocus conservados. (Tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia): 1-8.

EVALUATION OF *Peronospora manshurica* ON SOYBEAN GENOTYPES IN CYCLE SPRING-SUMMER 2014 IN SOUTH TAMAULIPAS

(Evaluación de *Peronospora manshurica* en genotipos de soya en el ciclo Primavera-Verano de 2014 en el sur de Tamaulipas)

Alberto Margarito García-Munguía[a*+], Gonzalo Espinosa-Vásquez[b], Nicolás Maldonado-Moreno[b], Guillermo Ascencio-Lucian [b], Marcelo Acosta-Ramos[c], Carlos Alberto García Munguía[d], Mario Alberto Franco Sánchez[c], Argelia García Munguía [c], Hugo González de Jesús[e]

[a] Universidad Autónoma de Aguascalientes
[b] Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias - Campo Experimental Las Huastecas
[c] Departamento de Parasitología Agrícola-Universidad Autónoma Chapingo
[d]Benemerita Universidad autónoma de Puebla
[e]Instituto Politécnico Nacional

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: almagamu@hotmail.com

Área del Conocimiento: Fitopatología.

ABSTRACT
Downy mildew *Peronospora manshurica*, is a disease that occurs at any stage of the cultivation of soybean and has been partially controlled using resistant cultivars or cultural and chemical methods. The objective was to assess the *damage Peronospora manshurica* on six soybean genotypes in the Spring-Summer 2014. The research was conducted in Altamira, located in southern Tamaulipas (22 ° 34'08'' N; 98 ° 09'57'' W). The study was established on July 21, 2014, the treatments were: H98-1052, H98-1076, H98-1521, H02-1656, Tamesi and Huasteca 200; Tamesí under a randomized block design with six treatments and four replications; The experimental plot consisted of six rows of 6 m long with a spacing of 0.76 m between rows, the useful plot was two central rows eliminating 0.5 m at the ends. The variable evaluated was percentage of downy mildew damage in different soybean genotypes. Five evaluations were performed, which were each 10 days from september 26th to november 7th 2014, in each evaluation, 10 leaflets were chosen in the middle stratum of plants and were visually evaluated the percentage of damage with the help of a diagrammatic scale . A variance analysis was applied to the data, then the Tukey test was applied with $\alpha = 0.05$. In the third valuation (October 16, 2014) the highest percentage of damage of *P. manshurica* was found on the genotype H98-1521, however it was not more than 3%. Within five evaluations there were significant differences, showing that Tamesí, H98-1052, H98-1076 and H02-1656 showed a percentage less than 1%, meanwhile that Huasteca 200 and H98-1521 showed about 2%. With these results, it is determined that *P. manshurica* has been partially controlled in the southern region of Tamaulipas.

Keywords: *Peronospora manshurica*, soybean.

DO LACCASES ARE IMPORTANT FOR THE VIABILITY OF THE FUNGUS *MYCOSPHAERELLA FIJENSIS*?

(¿Las lacasas son importantes para la viabilidad del hongo *Mycosphaerella fijensis*?)

Yur Yenova Chávez- Castrillón[a*], Miguel Juan Beltrán- García[a+], Paolo Di Mascio[b], Marisa H.G. Medeiros[b]

[a] Departamento de Química-ICET , Universidad Autónoma de Guadalajara.
[b] Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidad de Sao Paulo, Brasil.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: mbeltran71@hotmail.com

Área del Conocimiento: Fitopatología.

ABSTRACT
Mycosphaerella fijensis is a phytopathogenic fungus of a banana and plantain. This fungus is a melanin producer, which enhances its capabilities for virulence and pathogenicity, including the inactivation and invasion of the defense system of its host. Fungal melanin seems to be synthesized from the DHN melanin, produced by the route of the poliketides and appointed by the final product of 1-8-dihydroxynaphthalene, this compound is polymerized to form the melanin. In the process for melanin synthesis, laccases are involved; this enzymes containing copper atoms that catalyze REDOX reactions.
In this study we are trying to demonstrate a correlation between fungus virulence, melanin as antioxidant compound, ROS generation and the viability of the fungus, especially to fungicides in the next stages. Tropolone (an inhibitor of DOPA melanin) competes for binding sites of copper in the active sites of tyrosinases. Tests for viability evaluation were conducted in microplates with PDB amended with different tropolone concentrations and then incubated for 7 days, to know the minimum inhibitory concentration (MIC) of tropolone. We using two strains, for this study MF1 strain (a pigmented) and the NCH2RK (an albino strain). We found that the MIC values were 1.53 ppm and 0.76 ppm for MF1 and NCH2RK, respectively. We found an alteration in the content of secreted melanin to the medium and relationship with the fungal viability, because the pigmented strain was lesser inhibited than the albino strain. These results suggested an inhibition of secreted laccases, and second tropolone probably are inhibiting another copper enzymes. The next step will be a protein analysis, looking for the proteic expression of laccases and test the relationship between the amounts expressed protein and fungal viability.

Keywords: *Mycosphaerella fijensis*, melanine, lacases, tropolone.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

STRATEGIES TO ISOLATE RHIZOSPHERE ACTINOMYCETES TO CONTROL SOFT ROT OF *Polianthes tuberosa* OF MORELOS

(Estrategias para aislar actinomicetos de rizosfera para el control de la pudrición blanda de *Polianthes tuberosa* del estado de Morelos)

Adrián Héctor Palacios-Arriaga[a], Gabriel Rincón-Enríquez[a]*, Evangelina Esmeralda Quiñones-Aguilar[a+]

[a] Biotecnología Vegetal del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A. C.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: eqaguilar08@gmail.com

Área del Conocimiento: Fitopatología.

ABSTRACT
Actinomycetes are recognized bacteria due their bioactive producing ability that hamper the growth of other microorganisms. These bacteria are interesting as biocontrol agents because they are good root colonizers and their antibiotic producing. The rot bulb of tuberose is caused by *Pseudomonas aeruginosa* and it is a main disease in flower production. The aim of this study was to evaluate physical treatments and media for isolation of actinomycete from tuberose´s rizosphere for uses them as like biocontrol agents of tuberose rot bulb. A sample was taken from one plot of two locations of Morelos state for a factorial 3x2 experiment establishment for each place in a completely randomized design. The soil physical treatments were: 1) calcium carbonate supply (1:1, v/v) for a week; 2) sample heating at 60°C by two hours; 3) soil without treatment or control. The isolation media were 1) ISP_2 and 2) Actinomycete Isolation Agar (AIA). There were 6 treatments with 2 replicates. Three decimal dilutions were sown 10^{-1}, 10^{-2} and 10^{-3}. The actinomycete collection was maintained in PDA media; it was recorded coloring substrate mycelia and aerial, and sporulation isolated in order to group them into differential morphologies. A total of 280 actinomycetes were isolated from Emiliano Zapata (EZ) and 179 from Mazatepec (Ma). 117, 133 and 30 were obtained from control, heated and calcium cabornate treated respectively from EZ. In the other hand from Ma, there were 102, 67 and 10 isolated from the same treatment describe above. 12 common and 8 different morphologies, and 11 specific isolates from all treatments were found, that could bunch 31 potential different species. These isolates could be employed as antagonistic for *P. aeruginosa* disease development on tuberose bulbs.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*; beneficial bacteria; tuberose; flower crops.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

PHYTOPATHOLOGICAL DIAGNOSIS OF PITAYO *Stenocereus spp*., IN SAN PEDRO YELOIXTLAHUACA, PUEBLA, MÉXICO

(Diagnóstico fitopatológico de pitayo *Stenocereus spp.* en San Pedro Yeloixtlahuaca, Puebla**)**

Venus Jiménez Castañeda[a*+], Sergio Avila Vargas[a], Oscar Espinosa García[a], Diana Hurtado López[a], Gisela Irineo Luis[a], Fernando Reyes León[a], José Luis Sánchez Rios[a].

[a]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 que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: vjimenez@correo.xoc.uam.mx

ABSTRACT
This project was done in the town of San Pedro Yeloixtlahuaca belonging to the lower Mixteca in the state of Puebla. In this area pitayos from the species *Stenocereus griseus, S. stellatus, S. pruinosus* are grown in backyard gardens or extensive orchards, where we found symptoms such as crusts, yellowing, wilting and rotting. Therefore the aim of this research is to identify the causal agents, the incidence and severity of this disease. An exploration of the site was performed to assess the degree of damage caused by the disease itself using a self developed scale of measuring. We collected stem samples with symptoms, for isolating and purifying agents. Purified agents were fungi of the genus *Colletotrichum sp., Rhizopus sp., Alternaria sp. and Penicillium sp.;* the presence of bacteria was also found: *Erwinia sp*. These agents are responsible for the scabs, yellowing, wilting and decay, which are found on 94% of the población.

Keywords: pitayo, fungi, bacteria.

RESUMEN
El presente trabajo se realizó en el poblado de San Pedro Yeloixtlahuaca que pertenece a la mixteca baja en el estado de Puebla, donde se cultivan pitayos de las especies *Stenocereus griseus, S. stellatus, S. pruinosus,* en huertos de traspatio o en huertos extensos, los cuales presentan síntomas como costras, amarillamiento, marchitez y pudriciones. Por tal motivo el objetivo de esta investigación es identificar los agentes causales, la incidencia y severidad de esta enfermedad. Para ello se realizó un recorrido por el predio para evaluar el grado de afectación causado por la enfermedad utilizando una escala propia de medición, se recolectaron muestras de tallo con síntomas, para aislar y purificar a los agentes. Los agentes purificados fueron hongos del genero *Colletotrichum sp., Rhizopus sp., Alternaría sp. y Penicillium sp.*; también se encontró la presencia de la bacteria *Erwinia sp.,* que son responsables de las costras, amarillamiento, marchitez y pudriciones, que presentan el 94% de la población.

Palabras Clave: pitayo, afectación, hongos, bacterias.

INTRODUCCIÓN

México constituye una parte importante en los centros de origen mesoamericano de una gran diversidad de cactáceas, que nos identifican a nivel nacional, no solo por su utilidad como plantas de

ornato sino también por ser consideradas plantas que constituyen una muy importante fuente de alimentos y a la vez constituyen el motor indiscutible de variadas actividades económicas muy redituables, sobre todo para aquellas zonas donde las características del clima y edáficas son desfavorables [1]. Los pitayos son cactáceas arborescentes con ramas largas y espinosas resistentes a la sequía, por lo que son plantas representativas de zonas semiáridas, se encuentran de forma silvestre en Jalisco, Michoacán, Puebla y Oaxaca.

Los pitayos han sobresalido como un importante cultivo frutal en México, principalmente porque su cultivación requiere relativamente bajos insumos de energía antropogénica [2]. La principal parte del pitayo, es su fruto (pitaya), las cuales se consumen o comercializan en los mercados locales o en ciudades cercana, convirtiéndose de esta manera en un complemento alimenticio y económico de las comunidades. Por lo que en los últimos años se ha iniciado el establecimiento de huertos comerciales de diferentes especies de pitayo (*Stenocereus griseus, S. stellatus, S. queretaroensis* y *S. pruinous*). En México existen cuatro regiones productoras de pitaya (*Stenocereus spp.*): la Mixteca Baja (Puebla y Oaxaca), las regiones de Michoacán, las regiones de Jalisco-Zacatecas y de Sinaloa-Sonora [3]; sin embargo, de acuerdo con el Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera [4], es en Jalisco y la Mixteca de Oaxaca donde se tiene la mayor producción, con 1,758 y 1,118 toneladas, respectivamente. Por lo cual es necesario conocer los problemas fitosanitarios que impiden su desarrollo, esto con el fin de proponer un manejo más adecuado del cultivo [5]. En San Pedro Yeloixtlahuaca (Puebla) perteneciente a la Mixteca Baja, los pitayos presentan alguna afección que causan su pudrición, el fin de este estudio fue diagnosticar que agentes patógenos son los causantes.

Objetivos

General

-Identificar los agentes fitopatógenos que causan la pudrición del pitayo en San Pedro Yeloixtlahuaca.

Específicos

-Identificar si los agentes causales de la pudrición del pitayo son hongos y/o bacterias.

-Conocer la incidencia y la severidad de esta enfermedad.

Zona de estudio

Predio “La cuarta” ubicada en San Pedro Yeloixtlahuaca, con una localización geográfica de 17º 59'30'' y 18º 07'18'' norte y 97º 58 00'' y 98º 06'36'' oeste, en el estado de Puebla. Tiene una altitud de 1,800 metros sobre el nivel del mar.

METODOLOGÍA

Se realizó un recorrido por el predio de San Pedro Yeloixtlahuaca para evaluar la incidencia, severidad, y los agentes causales de costras, amarillamiento, necrosis, se tomaron 10 muestras de tallo de forma aleatoria, las cuales fueron trasladadas al laboratorio de fitopatología de la UAM-X para aislar los agentes.

El aislamiento de los agentes se realizó mediante transferencia de tejido vegetal enfermo a una caja petri con medio de cultivo (PDA sin inhibidor) que se incubo por 72 horas. Posteriormente se purificaron los agentes que se desarrollaron en el medio de cultivo para hacer una mejor identificación.

Para el reconocimiento de hongos se realizaron laminillas temporales y cultivos puros, para la identificación de bacterias se realizó una tinción Gram, motilidad, solubilidad y morfología de la colonia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Agentes identificados

En base a las observaciones realizadas en el microscopio, encontramos los siguientes hongos:

Colletotrichum sp (Figura 1) produce conidios incoloros de una célula ovoide, cilíndricos y en ocasiones encorvados en forma de pesas en asergulos. Las masas de conidios son de color salmón o rosa, los asergulos son subepidérmicos y brotan a través de la superficie de los tejidos de la planta, tienen forma de disco o cojín y son serosos con conidióforos simples cortos y erectos, es el agente causal de antracnosis en el tallo del pitayo tal como lo reporta el Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria [6]. La antracnosis afecta los órganos aéreos de la planta, los tallos afectados por esta enfermedad, presentan anillos necróticos que inducen a una muerte descendente rápida.

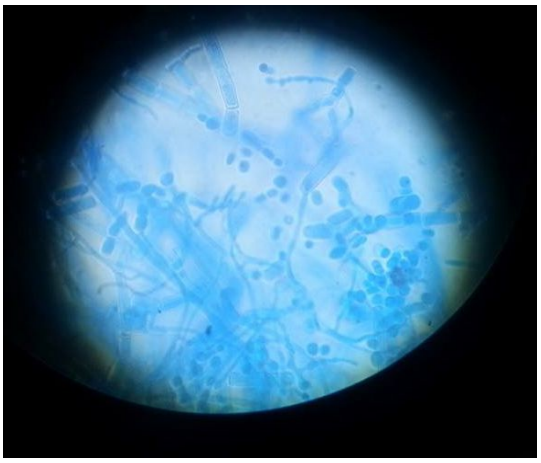


Figura 1. Hongo *Colletotrichum* sp.

Alternaria sp., (Figura 2) forma un micelio de color oscuro y en tejidos viejo y senescentes produce conidióforos cortos, simples y erectos que portan cadenas simples o ramificadas de conidios. Los conidios son grandes, alargados y oscuros o multicelulares y en forma de pera con septos tanto transversales como longitudinales [7]. Afecta principalmente a tallos, hojas, flor y fruto de las plantas, los síntomas aparecen en forma de manchas y tizones foliares, pudriciones del cuello y frutos. Los órganos afectados por *Alternaria sp* casi siempre son atacados cuando las plantas llegan a su madurez, las infecciones pueden ocurrir cuando hay daños mecánicos, heridas producidas por insectos o daños por otras enfermedades, por lo que puede ser una enfermedad secundaria [7]. Este hongo no ha sido reportado en pitayo, pero esta reportada en pitahaya.



Figura 2. Hongo *Alternaria* sp.

Penicillium sp; (Figura 3)hongo filamentoso que presenta conidióforos ramificados al final, con médulas y fialides en forma de botella donde nacen conidios lisos elipsoidales pueden ser azules o verdes en cadenas sin ramificar, con un penacho o pincel característico, causa pudrición de frutos y otros órganos de la planta [8]. Este hongo no se ha reportado en pitayo; pero puede estar asociada con su pudrición.

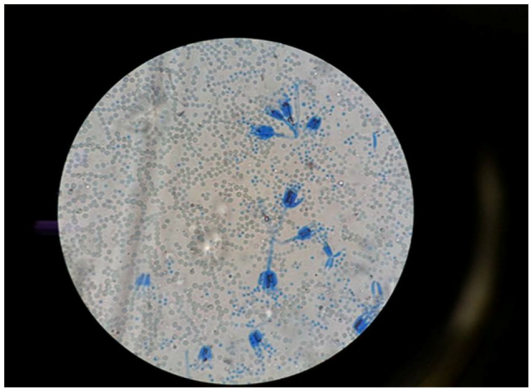


Figura 3. Hongo *Penicillium* sp.

Rhizopus sp., (Figura 4) Hifas gruesas y aseptadas, esporangia café, con esporangiosporas espiculadas. Columnela ovoide, con apófisis no prominente al final del esporangióforo. Se desarrolla en toda una gama de temperaturas y humedades relativas, este hongo causa la enfermedad conocida como pudrición blanda [9], ésta ampliamente distribuido en la naturaleza sobreviviendo de manera saprófita en el suelo y en residuos orgánicos con el potencial de invadir tejidos vegetales [10]. Las esporas pueden sobrevivir largos períodos sin agua y soportar temperaturas elevadas, germinando sobre tejidos vegetales dañados y generando rápidamente la maceración de los tejidos y la pudrición de los frutos [9]. Este hongo no ha sido reportado en pitayo.



Figura 4. *Rhizopus* sp.

Se identificó a la Bacteria *Erwinia* sp. (Tabla 1)

Tabla 1. Características de *Erwinia* sp.

Características	Bacteria
Forma	Bastón
Elevación	Convexa
Margen	Entero
Movimiento	No
Fluorescencia	No
Color de la colonia	Transparente
Tinción gram	Negativa
Colocación	Separada una de otra
Tamaño	Grande
Color de la tincion Gram	Rosado

Esta bacteria es la que causa más daños a nivel económico ya que termina matando y contagiando a otras plantas por medio de insectos como el barrenador, el tallo donde en un principio se vuelve de color amarillento, pero después se pudre y tiene un olor fétido hasta matar al cultivo. La bacteria *Erwinia* sp. (Figura 5) se encuentra reportada en el cultivo del pitayo [11, 12].



Figura 5. Bacteria *Erwinia* sp.

Porcentaje de daño e incidencia

El cultivo de pitayo está conformado por 96 individuos con diferentes grados de afectación, los síntomas que presentan son costras, amarillamiento y marchitez que inician en el ápice y van descendiendo hasta cubrir toda la planta. De acuerdo al daño observado se realizó una escala propia de medición (Tabla 2) para poder clasificar a cada uno de los individuos.

Tabla 2. Grado de severidad de las enfermedades en las plantas

GRADO	DAÑO EN LA PLANTA	NÚMERO DE INDIVIDUOS
0	ningún daño	5
1	1-20%	5
2	21-40%	12
3	41-60%	33
4	61-80%	31
5	81-100%	10

Los individuos que presentan un alto porcentaje de severidad son los que tienen mayor altura (3 metros) y se encuentran en el grado 2, 3, 4 y 5, en los individuos del grado 1 los daños inician y los del grado 0 son recién trasplantados por lo que son nuevos en la población y no presentan algún daño. De los 96 individuos que están conformado al cultivo, el 94% se encuentran enfermos y el 6% son los individuos nuevos.

CONCLUSIÓN

Concluimos que los principales agentes causantes de la pudrición del pitayo son hongos, la antracnosis es el principal síntoma y es producida por *Colletotrichum* sp. [5], y se encuentra presente en todos los pitayos; también se identificó la presencia de *Alternaría* sp., *Rhizopus* sp. *y Penicillium* sp. los cuales

causan la pudrición blanda y las costras, sin embargo no están reportadas en pitayo. También encontramos la bacteria *Erwinia* sp., reportada como un agente causal de la enfermedad y muerte de los pitayos, sin embargo no se puede concluir que es el agente principal, debido a que no existe el olor fétido característico de esta, es posible que este en el proceso de degradación, o no se haya desarrollado debido a la presencia de algún agente antagonista, ya que la *Erwinia* sp. se presenta como una enfermedad secundaria.

La incidencia de las enfermedades en la población del pitayo es de 94% de los 96 individuos con diferentes grados de severidad, cabe resaltar que los individuos que no presentan daños son los recién trasplantados, son nuevos en la población.

REFERENCIAS

[1] Ortiz O. M. 1992. Distribución y extensión de los suelos afectados por sales en México y el mundo. Departamento de Suelos, Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México.

[2] Pimienta, E., Pimienta, E., Nobel, P. 2004. Ecophysiology of the pitayo de Querétaro (Stenocereus queretaroensis). Journal of Arid Environments.

[3] Flores, C. 2003, Pitayas y Pitahayas, Universidad Autónoma Chapingo, CIESTAAM. México. p. 98–121.

[4] SIAP. 2011. Sistema de Información
Agroalimentaria y Pesquera. Producción anual de pitaya. http://www.siap.gob.mx. Consultado el 25 de Junio de 2014.

[5] Rebollar, A., Romero, J., Cruz, P., Zepeda, H. 2002. El cultivo de la pitaya (Stenocereus spp.), una alternativa para el trópico seco del estado de Michoacán. Universidad Autónoma de Chapingo. México, 2° edición.

[6] OIRSA. 2001. Organismo Internacional
Regional de Sanidad Agropecuaria. Nicaragua. Disponible en: http://www.oirsa.org. Consultado el 25 de Junio de 2014.

[7] Bautista, E. M. E.; Leyva, M. S. G.; Villaseñor, M. H. E.; Huerta, E. J. y Mariscal, A. L. A. 2011. Hongos asociados al grano de trigo sembrado en áreas del centro de México. Rev. Mex. Fitopatol. 29:175-177.

[8] Agrios, N., George. 2001. Fitopatología. México: Ediciones Limusa.

[9] Hernández–Lauzardo A.N., Bautista–Baños S., Velázquez–del Valle M.G., and Trejo–Espino J.L. 2006. Identification of *Rhizobium stolonifer* Ehrenb. (Ex Fr.) Lind, causal agent of *Rhizopus* rot disease of fruits and vegetables. Revista Mexicana de Fitopatología 24:65–69.

[10] Adaskaveg JE, Förster H, Sommer NF. Kader A. 2002. Principles of postharvest pathology and management of decays of edible horticultural crops. Postharvest Technology of Horticultural Crops (4th ed.). Oakland, CA:UC DANR Pub 3311. 163p. 95.

[11] Dole, M. J.; Wilkins, H. F. 1999. Floriculture, principles and species. New Jersey, U.S.A. Prentice Hall. 613p.

[12] Welsh, T. 1991. The New Zealand cala. Combined Proceedings International. Propagators Society 41: 478-484.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

Eucalyptus globulus AND *Tagetes erecta* VEGETABLE POWDER EVALUATION FOR *Zabrotes subfasciatus* CONTROL IN PERUANO BEAN

(Evaluación de polvos vegetales de eucalipto y cempasúchitl para control de gorgojo pinto en frijol peruano)

Ana Patricia Raygoza Martínez[a]*, Luis Patricio Guevara Acevedo[b+], Gilberto Rodríguez Pérez[b], Juan Gabriel Ramírez Pimentel[b], Francisco Cervantes Ortiz[b], Mariano Mendoza Elos[b].

[a] Estudiante de Maestría en Ciencias en Producción y Tecnología de Semillas del Instituto Tecnológico de Roque
[b] Instituto Tecnológico de Roque. Posgrado.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: lpguevara@itroque.edu.mx

Área del Conocimiento: Fitopatología.

ABSTRACT
Dry Bean is the second most important crop in Mexico for human consumption, storage grain can lost up to 35% due to weevil, its control is usually done with high toxicity chemical products, so big efforts have been made to find natural control methods. Therefore the main object of this work was to evaluate vegetable powders of *Eucaliptus globulus* and *Tagetes erecta* with two ways of drying (natural and lyophilized) and two doses (0.5 and 1 g) in a factorial experimental design -Drying x Vegetable powder x Doses-, with four repetitions and one check, mortality was evaluated at 24, 48, 72 y 96 hours of exposure. 100 g of peruano beans were used with natural or lyophilized vegetable powders, at doses of 0.5 and 1 g depending on each treatment and placed in plastic containers of 236 mL, each container was shaken for 30 seconds and then 10 *Zabrotes subfasciatus* were added. Mortality was evaluated at 24, 48, 72 and 96 h, the criteria was the total immobility after receiving heat stimulus on a laboratory plate. Mortality results were corrected by Abbot Formula and a variance analysis was made to determine differences between treatments, after that a mean comparison by LSD ($p>0.05$) was done because differences between vegetable powders were found. Results show significant differences between vegetable powders. The highest mortality was observed with *Eucaliptus globulus* powder at 72 h of exposure with 24.25% meanwhile with *Tagetes erecta* was more effective at 96 h exposure with 19.06%. Similar case was observed with accumulated mortality with 67.24% for *Eucaliptus globulus* and 46.24% for *Tagetes erecta*. No statistic differences were found between doses and drying methods.

Keywords: vegetable powders; *Zabrotes subfasciatus*; *Eucalyptus globulus*; *Tagetes erecta*.

FUNCTIONAL DIVERSITY EVALUATION OF MICROBIAL COMMUNITIES ASSOCIATED WITH RHIZOSPHERE SOIL FROM TWO RACES OF MAIZE

(Evaluación de la Diversidad funcional de las comunidades microbianas asociadas a suelo rizosférico de dos razas de maíz)

Alba Margarita Hernández-Ibáñez[a*+], Ramón Ignacio Arteaga-Garibay[a], Luis Felipe Guzmán-Rodríguez[a], Hugo Alberto Zaldívar-López[a], María Micaela Gómez-Estrada[a], María de Jesús Gómez-Lizardi[a].

[a]Centro Nacional de Recursos Genéticos – Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (CNRG-INIFAP).

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: hernandez.alba@inifap.gob.mx

Área del Conocimiento: Fitopatología.

ABSTRACT
Information on functional diversity (metabolic potential) is essential for understanding the role of microbial communities in different environments. The Biolog system® methodology was introduced into ecological studies to estimate metabolic potential of microbial communities. While utilizing carbon substrates, microbes reduce a colourless dye to violet formazan. The colour is measured spectrophotometrically. This method is used mainly to investigate microbial communities from lump and rhizosphere soil and to estimate the impact of a stressor on soil microbial communities. In this study, samples from rhizosphere soil of different races maize were taken to estimate the functional microbial diversity in 3 stages of the crop. The Shannon-Weaver index to estimate the functional diversity and the sum of the metabolic activities grouped by type of substrates were calculated. Results showed that AWCD and Shannon-Weaver index are sensitive indicators to assess the functional metabolic activity in response to changes in the rhizosphere microbial communities in soil during different stages of the crop.

Keywords: Funtional diversity, Microbial communities, Rhizosphere.

RESUMEN
La información sobre la diversidad funcional (potencial metabólico) es esencial para entender el rol de las comunidades microbianas en diferentes ambientes. El sistema Biolog® fue introducido en los estudios ecológicos para estimar el potencial metabólico de las comunidades microbianas. Este sistema utiliza diferentes fuentes de carbono, en los cuales los microorganismos reducen un compuesto incoloro en formazán de color violeta. El color formado es medido mediante espectrofotometría para calcular el número de sustratos empleados por la comunidad microbiana. Este método es utilizado principalmente para evaluar las comunidades microbianas en suelo rizosférico para estimar el impacto de un factor estresante en las comunidades microbianas del suelo. En este trabajo, muestras de suelo rizosférico de diferentes razas de maíz fueron tomadas para evaluar la diversidad microbiana funcional en 3 etapas del cultivo. Se calculó el índice de Shannon-Weaver para estimar la diversidad funcional y se realizó la sumatoria de las actividades metabólicas agrupadas por tipo de sustrato. Los resultados muestran que el

AWCD y el índice de Shannon-Weaver son indicadores sensibles para evaluar la actividad metabólica funcional en respuesta a los cambios en las comunidades microbianas del suelo rizosférico durante diferentes etapas del cultivo de maíz. La evaluación de la diversidad funcional de las comunidades microbianas se puede utilizar para vigilar las variaciones naturales o inducidas en el suelo y puede ser una herramienta potencial ayuda a mantener la funcionalidad de los suelos para la actividad que se ha destinado.

Palabras Clave: Diversidad funcional, Comunidades microbianas, Rizósfera.

INTRODUCCIÓN

La comunidad microbiana es definida como un "ensamblaje" de poblaciones de microorganismos que interaccionan entre ellas así como con el ambiente, espacial y temporalmente. Dichas interacciones le confieren atributos mediante los cuales puede ser caracterizada [1; 2]. En los últimos años se ha utilizado el análisis funcional como indicador de la diversidad y estructura de las comunidades microbianas, a través del uso de diferentes fuentes de carbono para establecer un perfil metabólico de los microorganismos y su comportamiento [3; 4 y 5]. La diversidad funcional se puede generalizar como el conjunto de características de los organismos que influyen en las propiedades del ecosistema [6; 7 y 8]. Esta definición sugiere que un ecosistema con una alta diversidad funcional opera más eficientemente en términos de productividad, resiliencia y resistencia [9 y 10]. El estudio de la diversidad funcional de los microorganismos en su totalidad y no de forma individual, permite enfatizar en el sinergismo de las especies [11]. Además la estructura de las comunidades microbianas puede ser determinada al definir las capacidades metabólicas de los microorganismos y sus consecuencias biogeoquímicas (heterótrofos, nitrificadores, desnitrificadores, entre otros) y/o participación en procesos del ecosistema (descomposición, biodegradación, oxidación, entre otros) [12].

La caracterización funcional se fundamenta en la determinación del perfil fisiológico de la comunidad, en la cual los microorganismos son enfrentados contra un conjunto de sustratos y fuentes de carbono con el fin de establecer un patrón característico de respuesta *in vitro*. Caracterizar el perfil fisiológico a nivel de comunidad (CLPP) presenta la ventaja de que no requiere el aislamiento de cultivos axénicos [4; 8]. La diversidad funcional de comunidades microbianas se puede conocer mediante la estimación de un índice de diversidad funcional, el cual permite establecer comparaciones entre comunidades distintas y/o seguir la evolución de una comunidad en específico frente a las variaciones de parámetros ambientales. El índice más utilizado para estimar la diversidad funcional de comunidades microbianas es el Índice de Shannon-Weaver, que se calcula a partir de datos cuantitativos obtenidos del perfil fisiológico de la comunidad [3; 4; 13; 5; 14 y 8].

Los suelos se caracterizan, además de por tener unas características fisicoquímicas determinadas, por albergar unas comunidades microbianas que son las responsables de llevar a cabo procesos biológicos tan importantes como la descomposición y reciclaje de nutrientes, fijación de nitrógeno, mantenimiento de la estructura, detoxificación de contaminantes, etc. La presencia de comunidades puede influir en la productividad de las plantas, ya que son la base de la cadena detritívora creadora de nutrientes. La diversidad funcional de un suelo puede ser estudiada mediante el análisis de los perfiles fisiológicos a nivel comunidad, que reflejen la capacidad de dicha comunidad microbiana para utilizar la batería de sustratos de carbono en condiciones de cultivo controladas. Las placas Biolog® EcoPlates™ pueden ser utilizadas para la determinación de los perfiles fisiológicos de las comunidades terrestres. El objetivo

principal de este estudio fue evaluar los perfiles fisiológicos de las comunidades microbianas en la rizósfera de 2 razas de maíz en diferentes etapas del cultivo obtenidos mediante el sistema Biolog® para evidenciar los cambios en la diversidad funcional.

METODOLOGÍA

Toma de muestra

Se realizaron un total de 6 tomas de muestras de suelo rizosférico, 3 de la raza Xala en el municipio de Jala Nayarit y 3 de la raza Amarillo Zamorano en Tepatitlán de Morelos Jalisco. Las etapas fenológicas en las que se llevó a cabo la toma de muestras se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Razas y etapas fenológicas del cultivo durante la toma de muestras.

No.	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*
Raza	**Xala**			**Amarillo Zamorano**		
Etapa	T0	R4	R6	T0	R4	R6

T0: Previo a la siembra.
R4: alrededor de los 90 días del cultivo en la cual los granos se llenan con una capa blanca y el embrión mide aproximadamente la mitad del ancho del grano.
R6: a partir de los 112 días del cultivo durante la cual se alcanza la madurez fisiológica de la mazorca.

Determinación de los perfiles fisiológicos a nivel comunidad

Para la determinación de los perfiles fisiológicos a nivel comunidad se utilizaron microplacas Biolog® EcoPlate™ según Epelde [15]. Estas microplacas contienen tres repeticiones de 31 fuentes de carbono potencialmente asimilables por las bacterias, de los cuales por lo menos 9 pueden ser considerados como exudados radiculares de las plantas [16]. Se pesó el equivalente a 1g de cada muestra de suelo rizosférico y se mezcló en 9 ml de solución salina fisiológica al 0.85% para obtener una solución 1:10. A partir de esta se realizaron diluciones seriadas hasta obtener una dilución 1:10 000. Se inocularon 150 µl de la última dilución en cada pozo de la placa EcoPlate™ y se incubaron a 25 ±2°C durante 160 hrs. Las reacciones positivas para la utilización de los sustratos se evidencia por el desarrollo de un color purpura en los pocillos. Se realizaron lecturas de la densidad óptica cada 24 hrs. a 590 nm en un espectrofotómetro para microplacas Multiskan™ GO Thermo Inc.

Estimación de la Diversidad Funcional y actividad metabólica

Con los datos obtenidos de la medición de las densidades ópticas (DO) se calculó el promedio del desarrollo del color por pozo (AWCD por sus siglas en inglés) y el índice de Shannon-Weaver mediante la fórmula $H= -\sum p_i \ (\ln p_i)$, donde H es el índice de diversidad Shannon-Weaver, pi es la actividad de cada sustrato (DOi) entre la suma de las actividades de todos los sustratos (∑DOi) [8]. La actividad

metabólica fue estimada mediante la sumatoria de las (DOi) de los sustratos agrupados en 6 grupos de acuerdo a la fuente de carbono probada y expresada en porcentaje de actividad.

RESULTADOS

Perfiles fisiológicos a nivel comunidad

Un total de 31 fuentes de carbono fueron probadas para construir los perfiles fisiológicos de las comunidades microbianas con los sustratos utilizados por las muestras de rizosfera en las diferentes etapas de ambas razas de maíz. El AWCD aporta información sobre todos los cambios globales en la abundancia microbiana total y/o actividad metabolica en respuesta a contaminación u otros cambios en el ecosistema. En los resultados obtenidos para el promedio del desarrollo del color (AWCD), se observa un incremento a medida que avanza el tiempo de incubación de las muestras. El desarrollo del color fue más rápido en las etapas R6 para ambos suelos, mientras que en las etapas R4 y T0 fue más lento (Figura 1). Lo que expresa una mayor abundancia microbiana total en la etapa final del cultivo (R6).

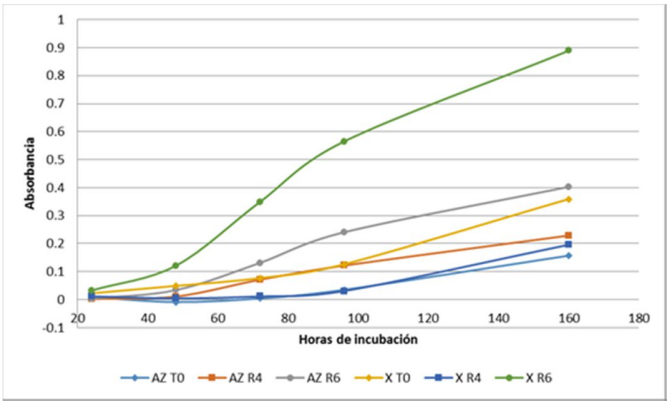


Figura 1. Desarrollo del color (AWCD) en las muestras de las 3 etapas y las 2 razas de maíz evaluadas.

Diversidad Funcional y actividad metabólica

En la figura 2 se muestran los resultados obtenidos del cálculo del índice de Shannon-Weaver (H)como indicador de la diversidad funcional de las comunidades microbianas presentes en las muestras de suelo rizosférico evaluadas; un H menor a 2 se considera con baja diversidad, H de 2-3 diversidad normal y H mayor a 3 diversidad alta. De acuerdo a los resultados se observó que las comunidades microbianas presentes en el suelo del cultivo de la raza Xala muestran una mayor diversidad funcional que las comunidades presentes de la raza Amarillo Zamorano. Sin embargo, en ambas razas se observan patrones similares entre las diferentes etapas; puesto que existe una mayor diversidad funcional en las etapas inicial y final del cultivo (T0 y R6) la cual se ve disminuida durante la etapa de desarrollo del mismo (R4). La diferencia en la diversidad metabólica entre las etapas puede ser debida a la presencia de mayor cantidad de materia orgánica como plantas y raíces residuales que permanecen en el suelo después de la cosecha en la etapa T0, así como el aumento de exudados radiculares en la etapa final del cultivo (R6).

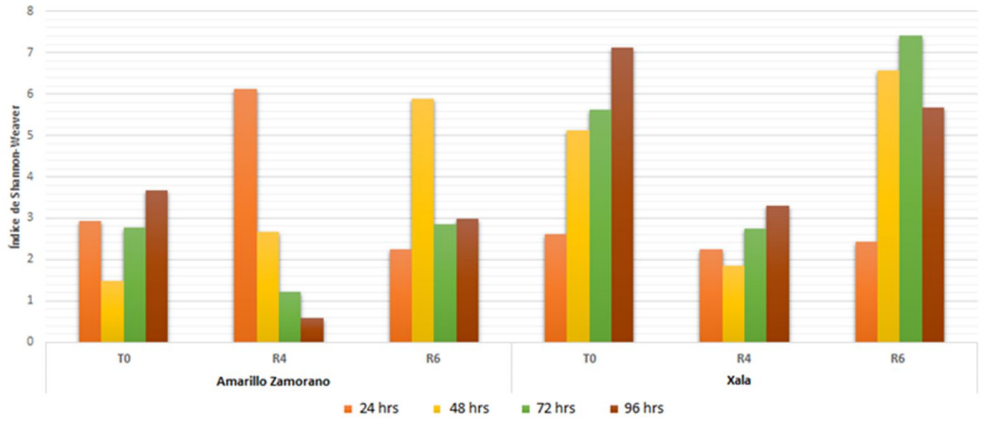


Figura 2. Índice de Shannon-Weaver de los sustratos metabolizados en las EcoPlate de Biolog.

Baudoni [17] indica que los exudados radiculares estimulan la proliferación bacteriana e incrementan la actividad microbiana y las comunidades. El índice calculado para los tiempos de incubación de 72 y 96 hrs mostraron resultados similares con las lecturas obtenidas; es decir, presenta patrones similares de aumento o disminución del índice de Shannon-Weaver en las diferentes etapas, por lo que se seleccionaron los resultados obtenidos a las 72 horas para estimar el porcentaje de las actividades metabólicas en las diferentes etapas para ambas razas evaluadas.

Para la estimación de la actividad metabólica de las comunidades microbianas presentes en las muestras de suelo evaluadas los resultados se agruparon en 6 categorías de acuerdo a las fuentes de carbono en: Carbohidratos, Ac. carboxílicos, Aminoácidos, Polímeros, Misceláneos y Aminas/Amidas [4]. Los resultados indican que los grupos metabolizados en mayor porcentaje fueron los carbohidratos (CHOS) (20-30%), aminoácidos (20-25%) y ácidos carboxílicos (15-20%), mientras que el grupo menos metabolizado fue el de aminas/amidas se presentó del 0-10% de actividad (figura 3). Los datos sugieren que la composición de las comunidades microbianas cambia con respecto a la etapa del cultivo y al tipo de suelo evaluado, lo cual se refleja en los cambios de las actividades metabólicas.

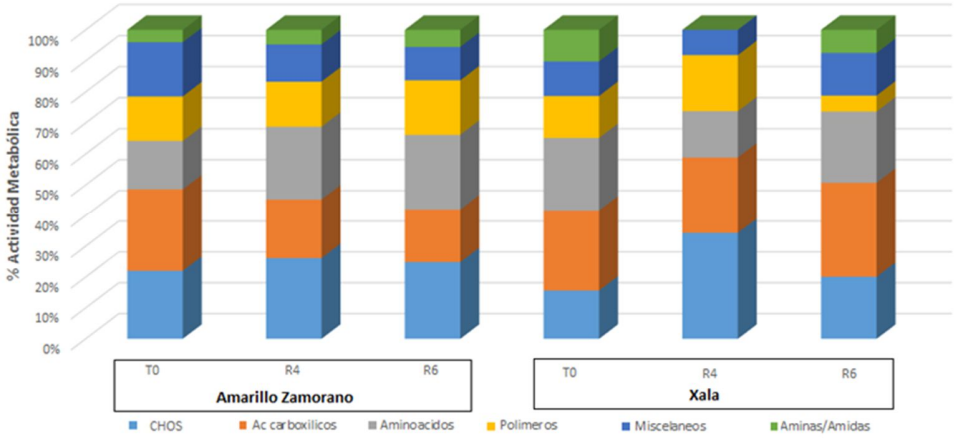


Figura 3.- Índice de Shannon-Weaver de los sustratos metabolizados en el EcoPlate™ a las 72 hrs de incubación.

Debido a que el suelo realiza numerosas funciones de importancia como la producción de biomasa, descomposición de materia orgánica, reciclaje de nutrientes, depuración del agua, detoxificación de contaminantes, reservorio genético, etc. es esencial poner énfasis en la remediación de suelos contaminados y así garantizar la sostenibilidad del ecosistema del suelo. Los indicadores biológicos de la calidad del suelo, en especial aquellos relacionados con la actividad y biodiversidad de las comunidades microbianas, presentan un enorme potencial como herramienta monitorizadora de la eficacia de un proceso fitorremediador.

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos del presente estudio mediante la estimación del AWCD y el índice de Shannon-Weaver como indicadores sensibles de la actividad metabólica funcional permiten evidenciar que existen cambios en la diversidad funcional de las comunidades microbianas tanto en las diferentes etapas del cultivo como en las diferentes razas de maíz evaluadas, por tanto, la evaluación de la diversidad funcional de las comunidades microbianas puede ser empleada para monitorizar las variaciones naturales o inducidas en los suelos y ser una herramienta que contribuya a mantener la funcionalidad del suelo para la actividad que sea destinado.

REFERENCIAS

[1] Atlas, R. y R. Bartha. 2002. Ecología microbiana y Microbiología Ambiental. 4ta Edición. España, Addison Wesley. 677 pp.

[2] Begon, M., C.R. Townsend y J.L. Harper. 2006. ECOLOGY: From Individuals to Ecosystems. 4th Edition. Blackwell Publ. Ltd. USA. 737 pp.

[3] Garland, J. y A. Mills. 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of pattern of community-level sole-carbon-source utilization. Applied Environmental Microiology 57:2351–2359.

[4] Zak, J., M. Willing, D. Moorhead y H. Wildman. 1994. Functional diversity of microbial communities: A quantitative approach. Soil Biology and Biochemistry 26:1101-1108.

[5] Bending, G.D., M.K. Turner, F. Rayns, M.C. Marx y M. Wood. 2004. Microbial and biochemical soil quality indicators and their potential for differentiating areas under contrasting agricultural management regimes. Soil Biology and Biochemistry 36: 1785–1792.

[6] Hernández, C.L., J. Ramos y D. López-Hernández. 2006. Características de la comunidad microbiana y evaluación de algunos parámetros bioquímicos en dos sistemas de producción contrastantes en el estado Amazonas, Venezuela. Agrobiológica 3(5):15–21.

[7] Zamora, A.C., J. Ramos y M. Arias. 2012a. Efecto de la contaminación por hidrocarburos sobre algunas propiedades químicas y microbiológicas de un suelo de sabana. Bioagro 24(1):5-12.

[8] Frąc, M., K. Oszust y J. Lipiec. 2012. Community Level Physiological Profiles (CLPP), Characterization and Microbial Activity of Soil Amended with Dairy Sewage Sludge. Sensors 12: 3253-3268.

[9] Tilman, D. 2001. Functional diversity. En: Encyclopedia of biodiversity. (S.A. Levin. Ed) Academic Press. pp. 109–120.

[10] Ricotta, C. 2005. A note on functional diversity measures. Basic Applied Ecology 6:479-486.

[11] Tilman, D., C. Lehman y K. Thomson. 1997. Plant diversity and productivity, theoretical considerations. Proceedings of Natural Academy Science 94: 1857-1861.

[12] Laine, M., H. Haario y K. Joergensen. 1997. Microbial functional activity during composting of chlorophenol-contaminated sawmill soil. Journal of Microbiological Methods 30:21-32.

[13] Buyer, J. y L. Drinkwater. 1997. Comparison of Substrate Utilization assay and Fatty acids analysis of soil microbial communities. Journal of Microbiological Methods 30:3-11.

[14] Díaz-Borrego, L., J. Dupontt., L. Cantini y L. Soto. 2007a. Diversidad funcional de las bacterias presentes en un suelo cultivado con guayaba (Psidiumgaujava L.). Ciencia 15(4): 388 – 397.

[15] Epelde L, Becerril JM, Hernández-Alisa J, Barrutia O, Garbisu C. 2008. Functional diversity as indicator of the recovery of soil health derived from Thlaspi caerulescens growth and metal phytoextraction. Appl Soil Ecol 39:299-310.

[16] Petchey O.L. y K.J. Gaston. 2002. Functional diversity (FD), species richness and community composition. EcologyLetters 5:402–411.

[17] Baudoin, E.; Benziri, E.; Guckert, A. Impact of artificial root exudaces on bacterial communitystructure in bulk soil and maize rhizosphere. Soil Biol. Biochem. 2003, 35, 1183–1192.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

GENETIC DIVERSITY ANALYSIS IN VARIETIES OF AVOCADO RESISTANT AND SUSCEPTIBLE TO MISTLETOE ATTACK

(Análisis de Diversidad Genética en Variedades de Aguacate Resistentes y Susceptibles al Ataque del Muérdago)

Maharshi Ledezma Rodríguez[a]*, Moisés Cortés-Cruz[a+], Víctor Coria Ávalos[b] and Luis Guzmán Rodríguez[a]

[a]Centro Nacional de Recursos Genéticos-INIFAP/ Boulevard de la Biodiversidad No. 400, Tepatitlán de Morelos C.P. 47600, Jalisco /
[b]Campó Experimental "Uruapan"-INIFAP/ Avenida Latinoamericana No. 1101, Uruapan C.P. 60150, Michoacán, Michoacán.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: cortes.moises@inifap.gob.mx

Área del Conocimiento: Fitopatología.

ABSTRACT
Mistletoe are parasitic plants belonging to the Loranthaceae family, and are responsible for decreasing productivity and increasing mortality rate of agricultural and forest species. In Mexico, there are different species of mistletoe, which attack a large number of tree species, including avocado, causing losses up to 136 million pesos. México is considered as one of the countries with the largest genetic richness of avocado, with at least 20 different species. The most common commercial avocado variety is "HASS", and has been reported to show resistance to mistletoe, unlike other commercial varieties and criollo materials. Regarding the genetic factors regulating this resistance, there is very little information available. Therefore, the objective of this work was to estimate the basic genetic diversity parameters of resistant and susceptible avocado materials. Fifty-nine accessions were analyzed belonging to three different varieties (collected from five different locations in the State of Michoacán, Mexico) with 41 microsatellites. The basic parameters of genetic diversity were estimated using the GenAlEx 6.5 software. The phylogenetic relationships were established based on the Neighbor-Joining (N-J) methodology using the Mega 5.2 software, while principal coordinates analysis (PCoA) was calculated in GenAlEx 6.5. The results showed high polymorphic levels (95.12%) and an expected heterocigosity value of 0.58, indicating moderate to high levels of genetic diversity in the evaluated materials. The first three axes of the PCoA accounted for 81.5% of the variation and showed three main groups as expected. Likewise, the N-J tree identified the three main branches, confirming the tree groups identified by PCoA and the genetic uniqueness of each avocado variety studied.

Keywords: Mistletoe, microsatellite, genetic diversity, principal coordinates analysis.

MOLECULAR IDENTIFICATION BY ENZYMATIC SEQUENCING OF *Fusarium spp*., ISOLATES OF THE "MANGO MALFORMATION" OF MANGO IN SOUTH SINALOA

(Identificación molecular mediante secuenciación enzimática de *Fusarium spp*., aislados de la "Escoba de Bruja" de mango en el sur de Sinaloa)

Jonathan Madueña Soto[a]*, Sixto Velarde Félix[b+], Oscar Enrique Arvizu Fuentes[c], José Pablo Meza Castro[a], Moisés Barajas Ortiz[a], José Antonio Garzón Tiznado[d]

[a] Universidad Autónoma de Sinaloa, Facultad de Agronomía. Carretera Culiacán-Eldorado, Km 17.5, Culiacán, Sinaloa/jonathan_maduena@hotmail.com
[b] INIFAP-CIRNO, Campo Experimental Valle de Culiacán/km 17.5 Carretera Culiacán-El dorado, Culiacán, Sinaloa/velarde.sixto@inifap.gob.mx
[c]Universidad de Guadalajara, Av. Universidad, Núm.1115, Col. Linda Vista, Ocotlán, Jalisco/oarvizu77@gmail.com
[d]Universidad Autónoma de Sinaloa, Facultad de Ciencias Químico Biológicas. Av. de Las Américas y Blvd. Universitarios s/n, Culiacán, Sinaloa/garzon24@hotmail.com

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: velarde.sixto@inifap.gob.mx

Área del Conocimiento: Fitopatología.

ABSTRACT
In the state of Sinaloa one of the main problems that limit the performance and productivity of mango are the diseases known as Mango Malformation, affecting vegetative and floral buds. Several *Fusarium* species are pathogens that cause this disease, mainly *Fusarium mangiferae*. In Mexico, the pathogens which they have been identified causing "Mango malformation" are *Fusarium subglutinans* and *Fusarium oxysporum* and recently *Fusarium mexicanum* and *Fusarium pseudocircinatum* and were identified in different states. Distribution presence, preservation and identification of these pathogens may allow management of the disease and also to assess the genetic resistance varieties of mango breeding program towards Mango malformation. The objective of this work was to isolate and identify molecularly *Fusarium* species of present in the Mango Malformation. Using molecular biology techniques based on enzymatic sequencing were identified and registered on the GenBank (NCBI, USA), obtaining the accession number to species of *Fusarium decemcellulare*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium incarnatum* and *Fusarium falciforme*, isolated of mango malformation plant damage in the municipality of El Rosario, Sinaloa, of which *Fusarium decemcellulare* has been identified causing damage in Sinaloa and around the world and *Fusarium equiseti* in Pakistan. So far there is no any report that *Fusarium incarnatum* and *Fusarium falciforme* cause damage in mango.

Keywords: Mango, Mango Malformation, *Fusarium*, Enzymatic Sequencing.

RESUMEN
En el estado de Sinaloa uno de los principales problemas que limitan el rendimiento y productividad del mango es la enfermedad conocida como la malformación del mango, escoba de bruja o proliferación

vegetativa y floral, que afecta brotes vegetativos y florales. Diversas especies del género *Fusarium* son los patógenos que causan esta enfermedad a nivel mundial, principalmente *Fusarium mangiferae*. En México, los patógenos que se han identificado que ocasionan la "Escoba de Bruja" son *Fusarium subglutinans*, *F. oxysporum* y recientemente se identificaron a *Fusarium mexicanum* y *Fusarium pseudocircinatum* en diversos estados. La distribución, presencia, preservación e identificación de estos patógenos podrá permitir un manejo de la enfermedad y asimismo evaluar la resistencia genética de variedades de mango del programa de mejoramiento genético hacia la Malformación del Mango. El objetivo de este trabajo fue aislar e identificar molecularmente especies de *Fusarium* presentes en la "Escoba de Bruja". Mediante técnicas de biología molecular basado en la secuenciación enzimática se logró identificar y registrarse ante el GenBank (NCBI, EUA), obteniendo número de accesión a las especies de *Fusarium decemcellulare*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium incarnatum* y *Fusarium falciforme*, aisladas en plantas de mango con daños de la escoba de bruja, en el municipio de El Rosario, Sinaloa, de las cuales *Fusarium decemcellulare* ha sido identificada causando daños en Sinaloa y diversas partes del mundo y *Fusarium equiseti* en Paquistán. Hasta la fecha no se tiene ningún reporte que *Fusarium incarnatum* y *Fusarium falciforme* causen daños al mango.

Palabras Clave: Mango, Malformación del Mango, *Fusarium*, Secuenciación Enzimática.

INTRODUCCIÓN

El mango (*Mangifera indica* L.) es una especie cultivada por el hombre desde hace más de 6,000 años y es un producto que juega un importante papel económico y social para diversos países [1]. México es el séptimo productor a escala mundial [2] y el principal exportador [3]. En 2014, los principales estados productores de mango en el país fueron: Guerrero, Nayarit, Sinaloa, Oaxaca, Chiapas, Michoacán y Veracruz, alcanzando los 1.618 millones de ton,siendo Sinaloa el tercer estado en producción, obteniendo el 14.7% [3]. En la mayoría de las zonas productoras de mango en México, se presenta una de las enfermedades más destructivas denominada Malformación del Mango o Escoba de Bruja, que afecta brotes vegetativos y florales, detectándose por primera vez en nuestro país en 1958 en los estados de Morelos, Guerrero y Veracruz [4]. La enfermedad ataca plantas de mango de cualquier edad en huertos comerciales o vivero. El hongo comúnmente reportado como agente causal de la escoba de bruja es *Fusarium mangiferae* [5,6,7,8,9], pero también es causada por *Fusarium oxysporum* [5,6,7], *Fusarium decemcellulare* [10], *Fusarium sterilihyphosum* [11] y *Fusarium proliferatum* [12,13]. En México, en los estados Michoacán, Guerrero y Morelos los patógenos que ocasionan la escoba de bruja son *F. subglutinans* y *F. oxysporum* [5,6], mientras que 1982 en Sinaloa se reportó a *Fusarium decemcellulare* [14]. Recientemente se identificó a *Fusarium mexicanum* [15,16] y *Fusarium pseudocircinatum* [17] en diversos estados de México como patógeno de esta enfermedad. El objetivo de esta investigación fue identificar mediante secuenciación enzimática las especies de *Fusarium* presentes en la escoba de la bruja del mango.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las escobas de bruja fueron colectadas de árboles de mango en el municipio de El Rosario, Sinaloa y posteriormente fueron guardadas en bolsas de polietileno, enviándose al Laboratorio de Biotecnología del Campo Experimental Valle de Culiacán-INIFAP. Las escobas de brujas fueron desinfestadas superficialmente con hipoclorito de sodio al 2% por 2 min y etanol al 70% por 2 min, seguido de tres lavados consecutivos con agua destilada estéril. Para el crecimiento y desarrollo del hongo, el tejido vegetal fue depositado en cajas de Petri con medio PDA suplementado con 1.5 mL/L de PCNB y

cloranfenicol (600 mg/L), incubándose a una temperatura de 25 °C durante cinco días. Para obtener cultivos monospóricos de *Fusaria*, se cortó un pequeño fragmento del micelio y mediante diluciones seriadas se obtuvieron cultivos monospóricos [18], ubicando esporas individuales germinadas, las cuales se seleccionaron y se transfirieron a una nueva caja de Petri con medio PDA incubándose en las mismas condiciones anteriormente mencionadas. Para la extracción del ADN, se empleó el método previamente descrito [19], para ello, el micelio del hongo fue obtenido raspando con una asa bacteriológica estéril a partir del medio sólido, este fue colocado en mortero y pistilo de porcelana esterilizados. Después se agregó 1 mL de amortiguador de extracción que contenía: NaCl 30 mM, ácido etilendinitrilotetracético 30 mM (EDTA) y Tris Base 250 mM (pH 8.5), con el cual fue macerado. El producto de la maceración se colocó en tubos Eppendorf de 1.5 mL con su respectiva etiquetación. Enseguida se añadió a la muestra 100 µL de CTAB al 10% y 250 µL de NaCl incubándose a 65°C durante 20 min y, posteriormente fue centrifugada a 13,000 rpm durante 10 min y transcurrido este tiempo, la solución acuosa (sobrenadante) fue transferida a un tubo nuevo manualmente. A la solución acuosa se le añadió un volumen de cloroformo frío (v/v) y se agitó con un equipo de vortex durante unos segundos, y posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 min, una vez transcurrido este tiempo, mediante pipeteo (manualmente) la solución acuosa fue transferida a un tubo nuevo, agregándosele un volumen isopropanol absoluto frio y agitándose manualmente. Posteriormente, las muestras fueron almacenadas en un equipo de refrigeración a -20°C durante una hora para permitir la precipitación del ADN. Ocurrido este tiempo, las muestras en tubos fueron centrifugadas a 13,000 rpm durante 10 min para obtener la pastilla de ADN, para ello se esperó dos horas para que el ADN se deshidratara y finalmente el ADN obtenido de los diferentes aislamientos se resuspendieron en 50 ?L de agua libre de nucleasas (Promega) y almacenado a 4°C para su conservación.

Para identificar especies de Fusarium aislados de la escoba de bruja en mango, se realizó una PCR haciendo uso de los iniciadores del gen EF-α con las condiciones de amplificación reportadas [20].Los productos amplificados fueron analizados en geles de agarosa al 1% con una solución amortiguadora de corrida de NaOH-Borato 1X [21] **y** teñidos con una solución de Gel Red 3X. El gel fue expuesto a un transiluminador de luz UV y las imágenes fueron capturadas mediante una cámara fotográfica y digitalizados con el programa LaunchDoc-ItLS (UVP). Los productos amplificados fueron purificados mediante columnas de silica y enviados alLANGEBIO-CINVESTAV-IPN para su secuenciación basado por el método ddNTPs [22]. La búsqueda de similitud entre secuencias de ADN se realizó por medio del programa BLAST (Programa Informático de Alineamiento de Secuencias de Tipo Local) [23], con el cual se compararon las secuencias de nucleótidos en estudio, con las bases de datos del NCBI (Centro Nacional para la Información de Biotecnología) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/), de esta manera se identificaron los valores de homología.

RESULTADOS

En el año 2014, se colectaron muestras de escoba de bruja de árboles de mango en el municipio de El Rosario, Sinaloa, de las cuales se obtuvieron 7 aislados monospóricos y se les extrajo el ADN y mediante PCR con iniciadores específicos del gen EF-α, los fragmentos amplificados fueron purificados (Figura 1) y enviados al LANGEBIO para su secuenciación enzimática.

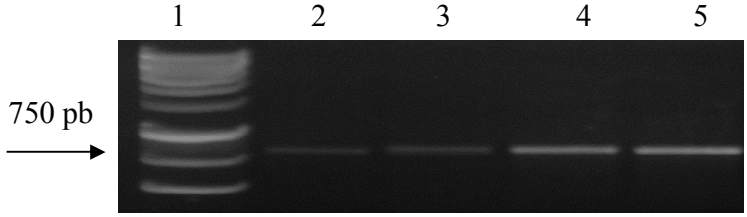


Figura 1. Purificación de ADN de*Fusaria* aislado de Escobas de Bruja de mango. 1, marcador de tamaño molecular HypperLadderIII, 2 a 5 se observa la separación electroforética de la purificación de los amplicones de PCR obtenidos con el uso de iniciadores específicos para el gen EF-α.

Una vez obtenidas las secuencias nucleotídicas, estas fueron analizadas mediante el BLAST y comparadas en el NCBI, de las siete secuencias, solamente se obtuvieron cuatro especies de *Fusaria*. Las secuencias obtenidas fueron registradas en el banco de datos del GenBank (NCBI) con números de accesión: KR132255, KR132256 y KR132257de *Fusarium decemcellulare*, KP773276 de *F. equiseti*, KP773277 y KR132258 de *Fusarium incarnatum* y KP773275 para *Fusarium falciforme*. (Cuadro 1).

Cuadro 1. Similitud y número de accesión en el GenBank (NCBI) de las secuencias nucleotídicas de los aislados monospóricos obtenidos de escoba de bruja de mango colectados en El Rosario, Sinaloa.

Cepa	Especie	Acceso GenBank	Similitud (%)
F1MSIN	*F.equiseti*	KP773276	100%
F2MSIN	*F. decemcellulare*	KR132255	100%
F6MSIN	*F. decemcellulare*	KR132256	100%
F8MSIN	*F. incarnatum*	KR132258	100%
F13MSIN	*F. decemcellulare*	KR132257	99%
F14MSIN	*F. falcifome*	KP773275	100%
F15MSIN	*F. incarnatum*	KP773277	100%

DISCUSIÓN

De las cuatro especies de *Fusaria* aisladas de la Escoba de Bruja del mango e identificadas mediante secuenciación enzimática, la especie más encontrada en esta investigación fue *Fusarium decemcellulare*, el cual fue reportado en el estado de Sinaloa por primera vez en 1982 [14]. En Estados Unidos de América [24] y recientemente en China [25] esta especie fue diagnosticada causando la muerte regresiva del mango. En cuanto a *F. equiseti* y *F. incarnatum*, están incluidas dentro de un complejo denominado *Fusarium incarnatum-equiseti* [26], lo que sugiere que estas dos especies estén muy relacionadas genealógicamente y se tiene un reporte en Paquistán, que *F. equiseti* causa daño de la malformación del mango [8]. A *F. falciforme* no se tiene reportado que cause daños al mango.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en cuanto a las especies aisladas e identificadas en lotes de mango en el estado de Sinaloa, tales como *F. decemcellulare*, *F.incarnatum*, *F. equiseti* y *F. falciforme* es gran importancia, debido a que el Programa de Mejoramiento Genético del Mango, podrá evaluar variedades de este cultivo a la resistencia de esta enfermedad, especialmente a los hongos *F. decemcellulare* y *F. equiseti*. Sin embargo, aunado a que no existen reportes de que *F. incarnatum* y *F. falciforme* causen

daños en la malformación del mango o escoba de bruja, sería importante mediante el Postulado de Koch determinar si estas especies causan daños al mango.

REFERENCIAS

[1] Galán,S.V. (2009). El cultivo del mango. (2 ed.). Madrid, España: Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, 36.
[2] SIAP. (2014). Disponible en: http://www.siap.gob.mx/cierre de la producción agrícola por cultivo. (Consultado: Enero 2015)
[3] FAO. (2014). Disponible en: http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx. (Consultado: Diciembre 2014)
[4] Morales, E., Rodríguez, H. (1961). Breves anotaciones sobre una nueva plaga en árboles de mango. *Fitófilo (México)*.14(30) 7-11.
[5] Noriega, C.D.H., Teliz, D., Mora, A.G., Rodriguez, A.J., Zavaleta, M.E., Otero, C.G., Campbell, C.L. (1999). Epidemiology of mango malformation in Guerrero, Mexico, with traditional and integrated management. *Plant Disease*. 83(3), 223-228.
[6] Mora, A.A., Téliz, O.D., Mora, A.G., Sánchez, G.P., Javier, M.J. (2003). Progreso temporal de "Escoba de bruja" (*Fusarium oxysporum* y *F. subglutinans*) en huertos de mango (*Mangifera indica* L.) cv. Haden en Michoacán, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 21, 1-12.
[7] Kumar, J., Singh, U.S., Beniwal, S.P.S. (1993). Mango malformation: one hundred years of research. *Annual Review of Phytopathology*. 31(1) 217-232.
[8] Iqbal, Z., Pervez, M.A., Saleem, B.A., Ahmad, S., Dasti, A.A., Saleem, A. (2010). Potential of *Fusarium mangiferae*as an etiological agent of mango malformation. *Pak. J. Bot*. 42(1), 409-415.
[9] Bhavna, J., Wahid, A.M., Bains, G., Chandra, P.R., Shukla, A., Tuteja, N., Kumar, J. (2014). *Fusarium mangiferae* associated with mango malformation in the Tarai region of the Uttarakhand state of India. *Plant Signal Behav*. 9:1-3.
[10] Castellano, G., Guanipa, N. (2004). Comportamiento de diez cultivares de mango (*Mangifera indica* L.) a la inoculación con *Fusarium decemcellulare* Brix. *Revista de Facultad de Agronomía*. 21, 200-206.
[11] Britz, H., Steenkamp, E.T., Coutinho, T. A., Wingfield,B. D., Marasas W. F., Wingfield, M. J. (2002). Two new species of Fusarium section Liseola associated with mango malformation. *Mycologia*, *94*(4), 722-730.
[12] Zheng, Q., Ploetz, R. (2002). Genetic diversity in the mango malformation pathogen and development of a PCR assay. *Plant Pathology*. 51(2), 208-216.
[13] Zhan, R.L., Yang, S.J., Ho, H.H., Liu, F., Zhao, Y.L., Chang, J.M., He, Y.B. (2010). Mango malformation disease in south China caused by *Fusarium proliferatum*. *Journal of Phytopathology*. 158(11-12), 721-725.
[14] Angulo, S.M., Villapudua J.R. (1982). Buba of mango (*Mangifera indica* L.) in the state Sinaloa, Mexico. *Phytopathology*. 72:171 (APS-Abstract)
[15] Otero, C.G., Rodríguez, A.G., Fernández, P.S., Maymon, M., Ploetz, R.C., Aoki, T., Freeman, S. (2010). Identification and characterization of a novel etiological agent of mango malformation disease in Mexico, *Fusarium mexicanum* sp. nov. *Phytopathology*. 100(11), 1176-1184.
[16] Betancourt, R.I., Velázquez M.J.J., Montero, C.J.C., Fernández, P.S.P., Lozoya, S.H., Rodríguez, A.G. (2012). *Fusarium mexicanum* Agente Causal de la Malformación del Mango en Jalisco, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 30:115-127.
[17] Freeman, S., Otero Colina G., Rodríguez Alvarado G., Fernández Pavía S., Maymon, M.R., Ploetz, R. C., Aoki, T., and O'Donnell K. 2014. First Report of Mango Malformation Disease Caused by *Fusarium pseudocircinatum* in Mexico. *Plant Disease*. 98 (11), 1583.

[18] Hernández, M.R., Rangel, M.E.A. (2011). Búsqueda de cepas de *Trichoderma* antagonistas a hongos causantes de marchitez vascular en tomate. Revista Electrónica de Divulgación de la Investigación. 1-9.

[19] Velarde, F.S., Ortega, M.P.F., Fierros, L.G.A., Padilla, V.I., Gutierres, P.E., Rodríguez, C.F.G., López, V.J.A., Acosta, G.J.A., Garzón T.J.A. (2015). Identificación molecular y biológica de las razas 0 y 5 de *Fusarium oxysporum* Schlechtend.: Fr f. sp. *ciceris* (Padwick) Matuo & K. Sato del garbanzo en el noroeste de México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 6(4), 735-748.

[20] O'Donnell, K., Kistler, H.C., Cigelnik, E., Ploetz R.C. (1998). Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. USA. 95: 2044–2049

[21] Brody, J.R., Scott E.K. (2004). Sodium boric acid: A tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. *Biotechniques*. USA. 36(2), 214-216.

[22] Sanger, F., Nicklen, S., Chase, A.R. (1977). DNA Sequencing with Chain Terminating Inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74(12): 5463-5468.

[23] Altschulf, S.F., Gish, W., Miller, W., Miyers, E.W., Lipman D.J. (1990). Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology*.215:403-40.

[24] Ploetz, R., Vazquez, A., Benscher D. (1996). First Report of *Fusarium decemcellulare* as a Pathogen of Mango in the United States. *Plant Dis*. 80:1207.

[25] Yan, X., Qi, J.J., Pu, X., Zhang, H., Zhang, Y.L., Qun, F.Y., Hui Q.Z., Yi X.X. (2013). First Report of Dieback of Mango Caused by *Fusarium decemcellulare* in China. *Journal of Phytopathology*.161(10), 735-738.

[26] Castellá, G., Cabañes F.J. (2014). Phylogenetic diversity of *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex isolated from Spanish wheat. *Antonie Van Leeuwenhoek*.106(2):309-17.

GENETIC RESISTANCE OF CHICKPEA TO YELLOWING CAUSED BY RACE 0 OF *Foc* UNDER CONTROLLED CONDITIONS

(Resistencia genética de garbanzo a la amarillez ocasionada por la raza 0 de *Foc* bajo condiciones controladas)

Oscar Enrique Arvizu Fuentes[a*], Sixto Velarde Félix[b+], Jonathan Madueña Soto[c], José Pablo Meza Castro[c], Víctor Valenzuela Herrera[b], Franklin Gerardo Rodríguez Cota[d], Gustavo Adolfo Fierros Leyva [e], Pedro Francisco Ortega Murrieta[e], Claudia María Melgoza Villagómez[f], Raúl Hipólito Sauceda Acosta[d], Gutiérrez Giovanna Sánchez Ilse[a]

[a]Universidad de Guadalajara, Av. Universidad 1115. Col. Linda Vista. Ocotlán, Jalisco/oarvizu77@gmail.com
[b]INIFAP-CIRNO, Campo Experimental Valle de Culiacán/km 17.5 Carretera Culiacán-Eldorado, Culiacán, Sinaloa/velarde.sixto@inifap.gob.mx
[c]Facultad de Agronomía, UAS, Culiacán, Sinaloa/km 17.5 Carretera Culiacán-Eldorado, Culiacán, Sinaloa/jonathan_maduena@hotmail.com
[d]INIFAP-CIRNO, Campo Experimental Valle de El Fuerte/Carretera Internacional México-Nogales, Km. 1609, Juan José Ríos, Sinaloa, México./rodriguez.franklin@inifap.gob.mx
[e]INIFAP-CIRNO, Campo Experimental Costa de Hermosillo/Bvd del Bosque No 7. Col. Valle Verde Hermosillo, Sonora/fierros.gustavo@inifap.gob.mx
[f]INIFAP-CIRNO, Campo Experimental Todos Santos, Agricultura entre México y Durango, Emiliano Zapata, La Paz, B.C.S./melgoza.claudia@inifap.gob.mx

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: velarde.sixto@inifap.gob.mx

Área del Conocimiento: Fitopatología.

ABSTRACT
Chickpea is one of the main crops in Northwest in Mexico, where most production is destined for export that because of their color and caliber, but its production is constrained by diseases of fungal mainly by of Fusarium oxysporum f. sp. ciceris (Foc) causing symptoms of wilting and yellowing. The objective of this work was determine which genotipes of chickpea are resistant to this pathogen. In the period 2014-2015, chickpea plants with symptoms were collected in different locations of the municipality of Culiacán, Sinaloa, which longitudinal cuts of the plant were obtained and were disinfected with sodium hypochlorite 3% and 70% ethanol and finally washed with distilled water to isolate the fungus, which are sown and grown in culture medium PDA supplemented with PCNB and chloramphenicol at 25°C for one week. Using serial dilutions, monosporics cultures were obtained and already developed, DNA was extracted for identification of race 0 of Foc by PCR and enzymatic sequencing, which was registered at GenBank of NCBI with accession number KR535625 (Race 0), subsequently analyzed genetic resistance of chickpea genotipes by testing pathogenesis under greenhouse conditions. The amount of inoculum of this strain was of 35,000 cfu/g soil in each pot. The results of the search of genetic resistance to the disease showed that the 90% of the evaluated genotipes are resistant to this pathogen.

Keyword: Fusariosis, Foc, enzymatic sequencing, genetic resistance.

RESUMEN

El garbanzo es uno de los principales cultivos del Noroeste de México, donde la mayor producción se destina para la exportación, esto debido a su color y calibre, sin embargo su producción es limitada por enfermedades de origen fungoso, principalmente por la especie de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (Foc) ocasionando síntomas de marchitez y amarillez. El objetivo de este trabajo fue evaluar resistencia genética de genotipos de garbanzo a la raza 0 de Foc bajo condiciones controladas. En el periodo de siembra 2014-2015, se recolectaron plantas de garbanzo con síntomas de amarillez en diferentes localidades del municipio de Culiacán, Sinaloa, de las cuales se obtuvieron cortes longitudinales de la planta y fueron desinfectados con hipoclorito de sodio al 3% y etanol al 70% y finalmente se lavaron con agua destilada para aislar el hongo, los cuales fueron sembrados y crecidos en medio de cultivo PDA suplementado con PCNB y cloranfenicol a 25°C durante una semana. Mediante diluciones seriadas se obtuvieron cultivos monospóricos y ya desarrollados, se les extrajo el ADN para la identificación de la raza 0 de Foc mediante secuenciación enzimática, el cual fue registrado en el GenBank del NCBI (EUA) con el número de accesión KR535625 Raza 0), posteriormente se analizó la resistencia genética de genotipos de garbanzo mediante ensayos de patogénesis bajo condiciones controladas. La cantidad de inoculo en los genotipos evaluados de esta cepa fue de 35,000 ufc/gr de suelo en cada maceta. Los resultados de la búsqueda de resistencia genética a esta enfermedad mostraron que el 90% de las variedades evaluadas son resistentes a este patógeno.

Palabras Clave: Fusariosis, Foc, secuenciación enzimática, resistencia genética.

INTRODUCCIÓN

El Garbanzo (*Cicer arietinum* L.) es la tercer leguminosa de grano con importancia en el mundo, después del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y los guisantes secos (*Pisum sativum* L.). El gran impacto del grano a nivel mundial es el uso para consumo humano por la carga proteica que contiene [1]. En México es uno de los principales cultivos de granos, principalmente para el Noroeste esto debido a su color y calibre. Sin embargo una de las limitantes que afectan a la producción de este cultivo son las enfermedades de origen fungoso, principalmente las del género *Fusarium* ya que esta enfermedad es prevalente a nivel mundial. El género *Fusarium* cuenta con un amplio y heterogéneo grupo de hongos fitopatógenos de gran importancia, entre ellos *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (Padwick) Matuo & Sato K., el cual cuenta con varios tipos de razas (0, 1A, 1B/C, 2, 3, 4, 5 Y 6), este es un patógeno vascular que perpetúa en la semilla y el suelo, y por tanto es difícil de manejar por el uso de los productos químicos que provoca estrés biótico y marchitamiento en la planta de garbanzo y tiene el potencial de causar 100% las pérdidas de rendimiento.En la región del noroeste de México se han encontrado las razas 0 y 5, siendo la raza 5 la más dominante y sobre todo en el estado de Sinaloa [2], lo que afecta en el rendimiento de grano de garbanzo de aproximadamente 20 al 50% según la severidad de la enfermedad. El objetivo de este trabajo fue evaluar la resistencia genética de 19 genotipos de garbanzo a *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 0 bajo condiciones controladas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Con la finalidad de evaluar la resistencia o susceptibilidad de los genotipos de garbanzo a la raza 0 de *Foc*, se usaron como testigos las líneas diferenciales WR-315 y P-2245 determinadas como resistente (R) y susceptible (S) respectivamente a ambos patógenos [3,4]. Se colectaron plantas con la sintomatología de la amarillez, de las cuales se obtuvo cultivos monospóricos y se les extrajo el ADN [2]. Para ello la raza 0 de Foc, fue identificada mediante secuenciación enzimática obteniendo un registro de número de accesión en el NCBI (Raza 0, KR535625). Las semillas de líneas diferenciales y los genotipos de garbanzo evaluados fueron obtenidos del banco de germoplasma de garbanzo de los Campos Experimentales Valle de Culiacán, Valle del Fuerte y Costa de Hermosillo-INIFAP. Para la preparación del inóculo del hongo, este fue crecido en medio PDA suplementado con PCNB y cloranfenicol durante una semana, a 25ºC. De este medio, se cortaron ocho fragmentos de micelio y fueron depositados en un matraz con medio AMA (arena-harina de maíz-agua) e incubados bajo las mismas condiciones durante 15 días. La desinfestación de las semillas de garbanzo de cada uno de los genotipos, consistió en lavarlas en una solución de hipoclorito de sodio al 2.5% durante 3 min y posteriormente enjuagadas en agua destilada estéril y para su germinación, estas fueron depositadas en una incubadora a 25°C durante 48 h. Germinadas las semillas, fueron seleccionadas por uniformidad en tamaño, depositando 4 plántulas por macetas. Para la preparación de la tierra-sustrato, se realizó una mezcla de suelo franco-turba-medio AMA (con inóculo del hongo) y 600 g de esta mezcla fueron depositados en macetas previamente esterilizadas. La cantidad de inóculo para ambos patógenos fueron de 35,000 ufc/g de suelo. El experimento fue realizado con base a un protocolo de condiciones controladas [3,4], bajo invernadero a 25ºC y un fotoperiodo de 12 h, el cual se realizó en tres repeticiones, incluidos los testigos sin inóculo. Las plantas fueron regadas con agua estéril cada 24 h durante todo el desarrollo del experimento y a partir de los 15 días después de la siembra las plantas fueron regadas semanalmente con 100 mL de solución nutritiva Hoagland [5]. Después de los 15 días a partir de la siembra, cada tercer día se evaluaron las plantas para observar síntomas de amarillez, usando un rango de escala conforme al porcentaje de enfermedad de la planta (0= 0%, plantas sin daño; 1=1-33%, resistente; 2=34-66%, intermedia; 3=67-100%, susceptible y 4= muerte de la planta) [1] [2].

RESULTADOS

Iniciado el experimento las reacciones de la enfermedad fueron evaluadas, observándose la incidencia y severidad de los síntomas en cada planta en intervalos de 2 días durante un periodo de 20, 40 y 60 días después de la siembra, usando un rango de escala conforme al porcentaje tal como amarillez y muerte de la planta. Los resultados obtenidos confirman que de los 19genotipos evaluados, solamente 10 no presentaron ningún daño, ni sintomatología, observándose resistencia genética a este patógeno, coincidiendo con WR-315. El genotipo más dañado fue CUGA 09-2043 (Cuadro 1). En la Figura 1, se observan las imágenes de una línea que presentó resistencia genética.

Cuadro 1. Resultados de evaluación de resistencia genética de genotipos de garbanzo a la Fusariosis, raza 0.

Genotipos	**Origen**	**Plantas evaluadas**	**Plantas vivas**	**Plantas Muertas**	**Incidencia de la enfermedad (%)**
WR-315 (R)	India	12	12	0	R (0)
P-2245 (S)	India	12	0	12	S (100)
Annigeri	India	12	11	1	R (8.3)
CPS-1	India	12	12	0	R (0)

Frontier	Canadá	12	11	1	R (8.3)
Troy	EUA	12	12	0	R (0)
Sawyer	EUA	12	12	0	R (0)
Sierra	EUA	12	11	1	R (8.3)
HOGA 2008-4-15	México	12	4	8	I (66.6)
HOGA 2005-10-5	México	12	11	1	R (8.3)
HOGA 2008-3-7	México	12	9	3	R (25)
HOGA 2008-5-3	México	12	11	1	R (8.3)
HOGA 2008-7-3	México	12	12	0	R (0)
HOGA 2008-6-5	México	12	12	0	R (0)
Gavilán	México	12	12	0	R (0)
MOGA 781	México	12	12	0	R (0)
MOGA 65	México	12	12	0	R (0)
CUGA 09-2043	México	12	3	9	S (75)
CUGA 08-590	México	12	11	1	R (8.3)
CUGA 09-2038	México	12	12	0	R (0)
Palmeada	México	12	12	0	R (0)

Testigo susceptible (S), Testigo resistente (R).



Figura 1. Resultado de evaluación de resistencia genética a la fusariosis en una línea de garbanzo a la Raza 0 de *Foc*.

DISCUSIÓN

A pesar del grado de la incidencia de daño, de los 13 genotipos mexicanos evaluados, siete no presentaron síntomas relacionados con el amarillamiento de la raza 0, lo mismo que representó WR-315 que fue el testigo resistente en este estudio, por tanto, los genotipos evaluados tales como: HOGA 2008-7-3, HOGA 2008-6-5, MOGA 781, MOGA 65 y CUGA 09-2038 pertenecientes al Programa de Mejoramiento Genético del Garbanzo de INIFAP, pueden ser liberadas para su uso comercial. Las variedades CPS-1, Troy y Sawyer, las cuales no son mexicanas y al presentar el 100% de resistencia, pueden ser usadas como progenitores para la generación de nuevas variedades mexicanas.

CONCLUSIONES

Debido a que la fusariosis es la enfermedad que más afecta la productividad y rendimiento del garbanzo en la región del Noroeste de México, la mejor alternativa para determinar la resistencia genética a esta enfermedad es mediante condiciones controladas. Los resultados de estas líneas que son resistentes genéticamente a este patógeno nos dará la oportunidad de liberar variedades con alto rendimiento y mejorar la productividad y exportación de este grano.

La evaluación realizada a genotipos de garbanzo para obtener resistencia genética a *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 0, se obtuvo un resultado del 90% de genotipos resistentes a este patógeno.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación agradece al Programa de Mejoramiento Genético del Garbanzo del CEVACU/CEVAF/CECH-CIRNO-INIFAP, por los apoyos del garbanzo.

REFERENCIAS

[1] Jukanti, A.K., Gaur, P.M., Gowda, C.L.L., Chibbar, R.N. 2012. Nutritional quality and health benefits of chickpea (*Cicer arietinum* L.): a review. *British Journal of Nutrition*. 1008, 11-26.

[2] Velarde, F.S., Ortega, M.P.F., Fierros, L.G.A., Padilla, V.I., Gutierres, P.E., Rodríguez, C.F.G., López, V.J.A., Acosta, G.J.A., Garzón, T.J.A. (2015). Identificación molecular y biológica de las razas 0 y 5 de *Fusarium oxysporum* Schlechtend.: Fr f. sp. *ciceris* (Padwick) Matuo & K. Sato del garbanzo en el noroeste de México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 6(4), 735-748.

[3] Trapero, C.A., Jiménez, D.R.M. 1985. Fungal wilt and root rot diseases of chickpea in southern Spain. Phytopathology. 75: 1146-115.

[4] Navas, C.J.A, Landa, B.B., Méndez, R.M.A., Jiménez, D.R.M. 2007. Quantitative modeling of the effects of temperature and inoculum density of Fusarium oxysporum f. sp. ciceris races 0 and 5 on development of Fusarium wilt in chickpea cultivars. Phytopathology. 97:564-573.

[5] Hoagland, D.R., Arnon, D.I. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experiment Station. Circular. 347: 1-32.

BACTERICIDAL ACTIVITY OF TERPENIC MOLECULES OF ESSENTIAL OILS AGAINST *Erwinia amylovora*

(Actividad bactericida de moléculas terpénicas de aceites esenciales contra *Erwinia amylovora*)

Zilia Yanira Muñoz-Ramírez[*a+], Tania Lorena Murillo-Ibarra[a], Laila Nayzzel Muñoz-Castellanos[a], Leonides Bernardo Fernández-Licón[b], León Raúl Hernández-Ochoa[a]

[a] Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Chihuahua
[b] Asesor Agrícola Independiente

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: ziliz130290@gmail.com

Área del Conocimiento: Fitopatología.

ABSTRACT
The bacteria *Erwina amylovora* is the etiologic agent of Fire Blight on apple and pear trees, which generate high economic losses in our Country, mainly in Chihuahua State. Additionally the use of chemical products can cause proliferation of resistant strains, causing high costs and environmental pollution. The objective of this work was to find natural alternatives to control this disease by using terpenic molecules of essential oils. Our hypothesis was that terpenic molecules have bactericidal activity against *Erwinia amylovora*. A total of 80 samples were analyzed, 20 vegetative samples were taken from apple trees with characteristic symptoms of Fire Blight in four orchards at Cuauhtemoc City, Namiquipa and Bachiniva. King's B Medium was used for isolation and bacteria were identified by microscopic and macroscopic characterization, API 20E® and molecular characterization.The amplification of gen 16S *rRNA* by PCR, was sent to sequence a Macrogen® and compared with GenBank (NCBI) database through BLAST-n 2.2.25**.** Based on its poliphasic analysis, two *Erwinia* genus were confirmed (samples P1J y P1T). Strain P1J was used to perform *in vitro* tests on bactericidal activity by 7 terpenic molecules: Carvacrol, Thymol, Geraniol, Eugenol, D-Carvone, Linalool, y Citronellol. Minimal Inhibitory Concentration (MIC) analysis was performanced by microplates (King's B Broth) and added with terpenics molecules in concentrations of 100 ppm, 200 ppm, 300 ppm, 400 ppm, 500 ppm, 600 ppm, 700 ppm, 800 ppm, 900 ppm and 1000 ppm utilizing resazurina as indicator. A MIC for Carvacrol of 200ppm, Thymol 300ppm, Geraniol 600 ppm and Eugenol 500 ppm was found. Afterwards, a Minimal Bactericidal Concentration (MBC) was performed by Miles and Misra technique, obtaining a MBC for Carvacrol 280 ppm, Thymol 340 ppm, Geraniol 770 ppm and Eugenol 680 ppm.

Keywords: *Erwinia amylovora*, Essential oil, Terpenic molecules, Bactericidal activity.

POPULATION FLUCTUATION OF *Anticarsia gemmatalis* IN SOYBEAN GENOTYPES IN THE PERIOD SPRING-SUMMER 2014 IN THE SOUTH OF TAMAULIPAS

(Fluctuación poblacional de *Anticarsia gemmatalis* en genotipos de soya en el ciclo Primavera-Verano 2014 en el sur de Tamaulipas)

Alberto Margarito García-Munguía*[a+], Gonzalo Espinosa-Vásquez[b], Nicolás Maldonado-Moreno[b], Guillermo Ascencio-Luciano[b], Enrique Garza-Urbina[b], Cristóbal Ervi Bautista-Pérez[b], Carlos Alberto García Munguía[c], Wendy Karina Gastelum Ferro[c], Alma Morfin Morfin Arriaga[e]

[a] Universidad Autónoma de Aguascalientes
[b] Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias - Campo Experimental Las Huastecas
[c]Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
[e]Instituto Politécnico Nacional

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: almagamu@hotmail.com

Área del Conocimiento: Fitopatología.

ABSTRACT
Population changes are defoliating insects both spatially and temporally in the cultivation of soybean (*Glycine max*), fo this reason the aim of this study was to determine the abundance and population dynamics of Anticarsia gemmatalis in six soybean genotypes. The research was conducted in Altamira, located in southern Tamaulipas (22 ° 34' 08'' N; 98 ° 09' 57'' W). The experiment was established on July 22th 2014, treatments were H98-1052, H98-1076, H98-1521, H02-1656, Huasteca 200 and Tamesí under a randomized block design with six treatments and four replications; The experimental plot consisted of six rows of 6 m long with a spacing of 0.76 m between rows, the useful plot was two central rows eliminating 0.5 m at the end of the line. The variable evaluated was population of *Anticarsia gemmatalis*, using the technique of "shake" plants in one meter row in four rounds of evaluations with 10 days between each (September 17 and 27, October 7 and 17). An analysis of variance was applied in the obtained data, subsequently was applied Tukey test with $\alpha = 0.05$. Of the four assessments to quantify the population of the pest, in the second (September 27, 2014) higher number of specimen corresponding to 325 live larvae, of which 19.3% was found in the Huasteca 200 genotype, 18.7% for H98-1076, 18.15% to Tamesí as well as H02-1656, while genotypes showed fewer population of *A. gemmatalis* larvae were H98-1052 12% and H98-1521 13.5%. Statistical analysis indicated that there were significant differences in the average population of A. gemmatalis finding Huasteca 200 showed an average 11.6 larvae per m, while H98-1052 7.0 larvae per m. According to the information generated in this study, Huasteca 200 is soybean genotype with the highest number of larvae presented and those with fewer were H98-1052 and H98-1521 genotypes.

Keywords: Soybean, *Anticarsia gemmatalis*, defoliating.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

EFFECT OF SALINITY AND pH ON THE ADSORPTION OF BRILLIANT VIOLET DYE USING ACTIVATED CARBON

(Efecto de la salinidad y del pH sobre la adsorción del colorante Violeta Brillante usando carbón activado)

Paulina Gutiérrez Macías[a*], Yanelly González Nolasco[a], Lourdes Hernández De Jesús[a], Blanca Estela Barragán Huerta [a+]

[a]Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-Instituto Politécnico Nacional

*Autor que presentó el trabajo.
[+]Autor para correspondencia: bbarraga59@hotmail.com

Área del Conocimiento: Ingeniería Química.

ABSTRACT
There are several studies published about adsorption of toxic compounds by activated carbon or other materials as a practical method for treatment of textile effluents, which are characterized by their high salinity content. It has been demonstrated that pH influences on the adsorption efficiency of these compounds; however, there is little information about effect of salinity on the adsorption process. In this work the effect of pH and NaCl concentration on adsorption process of brilliant violet dye (BV) on powdered activated carbon (PAC) was studied. BV solutions were tested at different concentrations in presence of PAC (1 mg/mL) at 25 °C and 125 rpm; pH was adjusted to 3, 5, 7, 9, or 11. For each condition, equilibrium time (t_e) was determinated by kinetic studies and Langmuir and Freundlich isotherms were calculated using absorbance at initial (t_0) and equilibrium time (t_e). After, it was carried out an assay to evaluate the effect of salinity on adsorption process using the pH which showed the highest adsorption on PAC, in these case were tested various NaCl concentrations (2, 4, 6, 8 and 10%). Absorbance of solutions at t_0 and t_e was determinated as above and Langmuir and Freundlich isotherms were calculated. Results showed that t_e was reached at 24 h with removal of BV among 73.56 and 83.56%. Adsorption of BV on PAC was more closely fitted to Langmuir model, with q_{max} values (maximum amount of adsorbed dye) varied between 178.57 and 277.78 mg/g PAC. No significant difference among pH 3-9 ($p < 0.05$) was observed. The pH 9 was selected for salinity tests, observing that BV adsorption was completed in the first 8 hours of the experiment, showing that q_{max} value depends on the concentration of NaCl used.

Keywords: Brilliant Violet; powdered activated carbon; salinity; pH

RESUMEN
Existen varios estudios publicados sobre la adsorción de compuestos tóxicos por el carbón activado u otros materiales como un método práctico para el tratamiento de efluentes textiles, que se caracterizan por su alta salinidad. Se ha demostrado que el pH influye directamente sobre la eficacia de adsorción de estos compuestos; sin embargo, existe poca información sobre el efecto de la salinidad sobre el proceso de adsorción. En este trabajo se estudió el efecto del pH y la concentración de NaCl en el proceso de adsorción de colorante Violeta Brillante (VB) sobre carbón activado en polvo (PAC). Soluciones de VB se

ensayaron a diferentes concentraciones en presencia de PAC (1 mg/ml) a 25 °C y 125 rpm; el pH se ajustó a 3, 5, 7, 9 y 11. Para cada condición, el tiempo de equilibrio (t_e) se determinó por estudios cinéticos y se calcularon las isotermas de Langmuir y Freundlich utilizando la concentración de colorante inicial a t_0 y al t_e. Después, se seleccionó el pH en el cual hubo mayor adsorción del colorante sobre el PAC y se llevó a cabo una cinética de adsorción con 10% de NaCl. Los resultados mostraron que se alcanzó a las 24 h con una adsorción de VB entre 73.56 y 83.56%. La adsorción de VB por PAC se ajustó mejor al modelo propuesto por Langmuir, con valores de cantidad máxima de colorante adsorbido (q_{max}) entre 178.57 y 277.78 mg/g PAC para los diferentes valores de pH. No se observó diferencia significativa entre pH 3, 5, 7 y 9 ($p < 0.05$). El pH 9 fue seleccionado para las pruebas de salinidad, observando que la adsorción de VB se completó en las primeras horas del experimento, lo cual demuestra que el NaCl influye directamente sobre el valor de q_{max}.

Palabras Clave: Violeta Brillante; carbón activado en polvo; salinidad; pH.

INTRODUCCIÓN

La industria textil es un rama importante dentro de las actividades económicas de algunos países, sin embargo, durante este proceso se genera una gran cantidad de aguas residuales que contaminan severamente los cuerpos de agua en donde son descargados [1], ya que debido a la ineficiencia del proceso de teñido se liberan a través de los efluentes textiles del 10 al 15% de los colorantes utilizados, y además de impartir un color no deseado a los cuerpos de agua, ocasionan problemas ambientales ya que disminuyen la actividad fotosintética al impedir el paso de luz, son tóxicos y de naturaleza potencialmente carcinogénica [2].

El carbón activado es ampliamente utilizado como adsorbente de contaminantes en el tratamiento de aguas residuales debido a su extensa área superficial, entre 500 y 2000$m^2\ g^{-1}$, y a la presencia de grupos funcionales superficiales que le brindan la propiedad de adsorber una gran variedad de compuestos de diferente naturaleza química [3]. Diversos estudios han evaluado los factores que influyen durante la adsorción de colorantes utilizando carbón activado como soporte, entre dichos factores se citan: temperatura, agitación, concentración inicial de colorante, tiempo de contacto y pH del medio [4]. Sin embargo, no existen estudios que relacionen la salinidad con la eficiencia del proceso de adsorción, considerando además que los efluentes textiles se caracterizan por su alta concentración de NaCl, el cual es utilizado como agente mordente en la etapa de tinción.

Los datos de equilibrio, conocidos comúnmente como isotermas de adsorción, que relacionan la cantidad de sustancia adsorbida por un adsorbente con la presión o concentración en fase gaseosa o en solución a temperatura constante, son un requisito básico para el diseño de sistemas de adsorción. Dichos datos son específicos para un sistema adsorbato:adsorbente y se obtienen experimentalmente [5]. Existen varios modelos matemáticos para obtener dichas isotermas, entre las que se encuentran las Isotermas de Langmuir (Ec. 1) y Freundlich (Ec. 2) [6]. En este trabajo se presenta la evaluación del efecto del pH sobre la adsorción por carbón activado en polvo del colorante Violeta Brillante, un colorante perteneciente al grupo azoico. También se evaluó el efecto que tiene la salinidad en la eficiencia del proceso de adsorción.

$$\frac{1}{q} = \left(\frac{1}{bK}\right)\left(\frac{1}{Ce}\right) + \frac{1}{b} \qquad \text{Ec. 1}$$

Donde: q, es la cantidad de soluto adsorbida (mg/g); K, es la constante de adsorción de Langmuir (L/mg); b, es la masa de soluto adsorbido requerido para saturar una unidad de masa de adsorbente (mg/g); Ce, es la concentración en equilibrio (mg/L).

$$\log\frac{x}{m} = \log K + \frac{1}{n}\log Ce \qquad \text{Ec. 2}$$

Donde: x, es la cantidad de soluto adsorbido (mg); m, es la masa del adsorbente (g); Ce, es la concentración del soluto remanente en solución (mg/L); k y n, son constantes de Freundlinch.

METODOLOGÍA

Determinación del tiempo de equilibrio de adsorción del colorante Violeta Brillante a diferente pH empleando carbón activado

Alícuotas de 10 mL de una solución de Violeta Brillante (150 mg/mL) se colocaron en frascos de 50mL, se adicionaron 10 mg de carbón activado en polvo, y se colocaron en agitación a 125 rpm a 25 °C. Se tomó lectura de la absorbancia a 558 nm, en el tiempo cero y posteriormente a 1, 5, 8, 24, 48 y 72 h. Se consideró que el tiempo de equilibrio (t_e) se alcanzó cuando la concentración de colorante en solución se mantuvo constante.

Efecto del pH sobre la adsorción del colorante Violeta Brillante empleando carbón activado

Para determinar el pH óptimo (en donde ocurre la mayor adsorción de colorante), se colocaron alícuotas de 10 mL de soluciones de Violeta Brillante en concentraciones de 80, 160, 200, 250 y 300 mg/L , a pH de 3, 5, 7, 9 y 11 en frascos de 50 mL que contenían 10 mg de carbón activado en polvo. Los frascos se mantuvieron en agitación a 125 rpm a 25 °C por 24 h, se tomó lectura de la absorbancia a 558 nm en el tiempo cero y posteriormente en el t_e.
La concentración de colorante en solución se calculó por interpolación de la absorbancia en curvas de calibración de Violeta Brillante con ajustes de pH a 3, 5, 7, 9 y 11. Las concentraciones obtenidas se utilizaron para construir las isotermas de Langmuir y Freundlich, y posteriormente se calcularon las constantes y los parámetros para cada modelo con las Ecuaciones 1 y 2.
Se realizó un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias con el test de Tukey con el programa estadístico Minitab® versión 17.0.

Efecto de la salinidad en la adsorción del colorante Violeta Brillante empleando carbón activado

Se prepararon soluciones de 1000, 1200, 1400, 1600, 1800 y 2000 mg/mL de Violeta Brillante a pH 9 y 10% de NaCl. Alícuotas de 10 mL se colocaron en frascos que contenían 10 mg de carbón activado en polvo y se mantuvieron en agitación a 125 rpm a 25 °C. Se tomó lectura de la absorbancia a 558 nm, en el tiempo cero y posteriormente a las 24, 72, 144 y 192 h. Se consideró que el tiempo de equilibrio (t_e) se alcanzó cuando la concentración de colorante en solución permaneció constante.
La concentración de colorante en solución se calculó por interpolación de la absorbancia en una curva de calibración de Violeta Brillante con ajuste de pH a 9.

RESULTADOS

Las cinéticas de adsorción mostraron que ésta ocurre más rápidamente durante las primeras 5 h. Después de 24 h la cantidad de colorante en solución disminuyó 95.88%, 91.98%, 97.43%, 88.65%, 80.59% para una concentración inicial de 80, 160, 200, 250 y 300 mg/L de colorante, respectivamente. Posteriormente, la concentración de colorante permaneció constante a lo largo del tiempo. La adsorción de colorante a pH 5, 7, 9 y 11 fue similar a la observada a pH 3. De acuerdo con lo anterior, se determinó que el tiempo de equilibrio se alcanzó a las 24 h.

La adsorción del Violeta Brillante sobre carbón activado en función del pH tuvo un mejor ajuste al modelo propuesto por Langmuir, considerando el valor del el coeficiente de correlación que se muestra en la Tabla 1. Así mismo, puede observarse que q_{max} (cantidad adsorbida de colorante por g de carbón activado) es mayor a pH 9; Sin embargo, el análisis estadístico no mostró diferencias significativas ($p>0.05$) de pH 9 con respecto a pH 3, 5 y 7, por lo que puede asumirse que las condiciones ácidas no tienen un efecto significativo en la adsorción del colorante, pero si influyen las condiciones extremadamente alcalinas como ocurre a pH 11. Se eligió continuar las pruebas del efecto de la salinidad en la adsorción de colorante con pH 9, ya que no hubo diferencia significativa con los valores de pH ácidos.

Tabla 1. Ecuaciones lineales, coeficientes de correlación (R^2) y constantes de las Isotermas de Freundlich y Langmuir determinadas para la adsorción del colorante Violeta Brillante por carbón activado en polvo a diferentes valores de pH

Isoterma de Freundlich				
pH	Ecuación	R^2	n	k
3	y=0.4576x + 1.5664	**0.9517**	2.185314	36.846818
5	y=0.4024x + 1.5477	**0.9758**	2.485089	35.293928
7	y=0.4042x + 1.5584	**0.9645**	2.474022	36.174288
9	y=0.3894x + 1.6137	**0.9578**	2.568053	41.086580
11	y=0.3245x + 1.5408	**0.9762**	1.355748	34.7373615
Isoterma de Langmuir				
pH	Ecuación	R^2	q_{max}	K
3	y=0.0512x + 0.0037	**0.9795**	270.270270	0.072265
5	y=0.0844x + 0.0039	**0.9801**	256.410256	0.046208
7	y=0.0718x + 0.0041	**0.9673**	243.902439	0.057103
9	y=0.0741x + 0.0036	**0.9687**	277.777778	0.048582
11	y=0.0921x + 0.0056	**0.9717**	178.571428	0.060803

La adición de NaCl al proceso de adsorción del Violeta Brillante por carbón activado se realizó utilizando concentraciones iniciales de colorante más altas que las ensayadas para la evaluación del efecto de pH, debido a que en el ensayo con concentraciones entre 80 y 300 mg/L y 10% de NaCl se observó una adsorción total del colorante en las primeras horas de la cinética. Con base en lo anterior, se utilizaron concentraciones de colorante inicial entre 1000 y 2000 mg/L. En la cinética de adsorción de la Figura 1 se observa que el tiempo de equilibrio (t_e) se alcanzó a las 144 h (día 6), a partir del cual la cantidad de colorante en solución permaneció constante. Los porcentajes de adsorción registrados en el t_e para

concentraciones iniciales de colorante de 1000, 1200, 1400, 1600, 1800 y 2000 mg/L fueron: 94.13, 87.85, 73.68, 64.48 y 57.78%, respectivamente. Que representa un aumento de la adsorción de Violeta Brillante por carbón activado de hasta 25 veces respecto a los valores obtenidos sin el uso de NaCl.

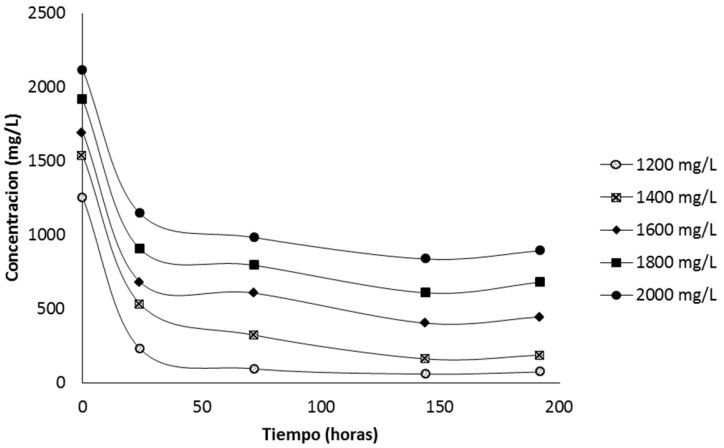


Fig.1 Cinética de adsorción del colorante de Violeta Brillante a pH 9 en concentraciones de 1000 a 2000 mg/L con 10% de NaCl, a 25 °C y agitación a 125 rpm.

DISCUSIÓN

Los resultados mostraron que la adsorción de Violeta Brillante se produce muy rápidamente en las primeras horas y posteriormente el grado de adsorción se vuelve asintótico, este comportamiento se debe a que hay mayor disponibilidad de sitios activos del carbón activado al inicio del experimento, y conforme se ocupan los sitios superficiales las moléculas compiten por los sitios internos disponibles [4]. Así mismo, se observa que a mayor concentración inicial de colorante el porcentaje de adsorción es menor, ya que el número de sitios activos presentes en el adsorbente no es suficiente para fijar a todas las moléculas de colorante [1,7]. Por otra parte, también deben considerarse los grupos funcionales presentes en el carbón activado como: ácidos carboxílicos, lactonas, fenoles, carbonilos, quinonas, aldehídos, éteres y anhídridos, entre otros [8], algunos de los cuales pueden ionizarse con el cambio de pH, lo que afecta la polaridad del adsorbente y por lo tanto el grado de interacción con los grupos funcionales del Violeta Brillante como son los grupos azo, sulfóxido, amida y fenoxi (Fig. 2).

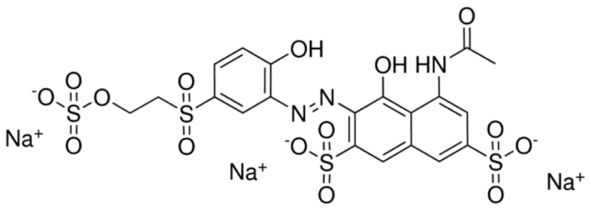


Fig. 2 Estructura química del Violeta Brillante

El pH de la solución del sistema es una de las variables más ampliamente estudiadas en el proceso de adsorción ya que influye en el grado de ionización del colorante, y por lo tanto aumenta o disminuye la interacción que se establece con los grupos funcionales del carbón activado. En medio ácido, la

superficie del carbón activado se carga positivamente debido al exceso de H^+, y en consecuencia las cargas negativas del Violeta Brillante favorecen la atracción electrostática a los sitios activos del adsorbente. En medio básico, las cargas negativas del colorante compiten con los OH^- del medio que se encuentran en exceso, disminuyendo la capacidad de adsorción [1,7].
Finalmente, el aumento registrado en la adsorción del colorante en presencia de NaCl podría deberse a un aumento de la fuerza electrostática del sistema, y a su vez de un incremento del coeficiente de difusión o coeficiente de transferencia de masa, los cuales favorecen un transporte más rápido de las moléculas a los sitios de adsorción [9,10].

CONCLUSIONES

El carbón activado resultó muy efectivo para la adsorción del colorante Violeta Brillante en un intervalo de pH de 3 a 11, y esta adsorción se vio aumentada significativamente al adicionar NaCl, lo cual podría añadir una ventaja a los procesos de tratamiento de efluentes textiles con carbón activado al disminuir el tiempo de adsorción e incrementar la cantidad de colorante adsorbido.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó con el financiamiento del proyecto SIP-20151298 y CONACYT No. CB-2011-01-169779. Gutiérrez-Macías agradece la beca BEIFI-2015 otorgada por COFAA-IPN.

REFERENCIAS

[1] Amin, N. K. (2009), Removal of direct blue-106 dye from aqueous solution using new activated carbons developed from pomegranate peel: Adsorption equilibrium and kinetics, Journal of Hazardous Materials, 165(1): 52-62.

[2] Nethaji, S., Sivasamya, A., Thennarasua, G., Saravanan, S. (2010), Adsorption of Malachite Green dye onto activated carbon derived from Borassus aethiopum flower biomass. Journal of Hazardous Materials, 181, 271–280.

[3] Bansal, R.C., Donnet, J.B., Stockli, F. (1988). Activated Carbon (1 ed). New York: Ed. Marcel Dekker, 482.

[4] Ahmad, M. A., Ahmad, N., Bello, O. S. (2014), Adsorptive removal of malachite green dye using durian seed-based activated carbon, Water, Air, & Soil Pollution, 225(8): 1-18.

[5] Choy, K. K., McKay, G., Porter, J. F. (1999), Sorption of acid dyes from effluents using activated carbon. Resources, Conservation and Recycling, 27(1): 57-71.

[6] Castillo-Carvajal, L. C., Marina Pedroza-Rodriguez, A., Barragan-Huerta, B. E. (2013), Adsorption and biological removal of basic green 4 dye using white-rot fungi immobilized on *Agave tequilana* weber waste, Fresenius Environmental Bulletin, 22(8): 2334-2343.

[7] Mall, I. D., Srivastava, V. C., Agarwal, N. K., Mishra, I. M. (2005), Removal of congo red from aqueous solution by bagasse fly ash and activated carbon: kinetic study and equilibrium isotherm analyses, Chemosphere, 61(4): 492-501.

[8] Corapcioglu, M. O., Huang, C. P. (1987), The surface acidity and characterization of some commercial activated carbons, Carbon, 25(4): 569-578.

[9] Castellar, G., Angulo, E., Zambrano, A., Charris, D. (2013), Adsorption equilibrium of methylene blue dye on activated carbon, Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica, 16(1): 263-271.

[10] Ramos, R. L., Vargas, L. V., Barrón, J. M., Coronado, R. G. (2002), Adsorción de salicilato de sodio en solución acuosa sobre carbón activado, Revista de la sociedad Química de México, 46(2): 159-166.

DENSITY OF PURE AND BINARY MIXTURES OF IONIC LIQUIDS BASED ON SULFONIUM, IMIDAZOLIUM AND PYRROLODINIUM CATIONS AND BIS(TRIFLUOROMETHYLSULFONYL)IMIDE ANION WITH 1-PROPANOL

(Densidades de líquidos iónicos puros y sus mezclas con 1-propanol, basados en los cationes imidazolium, sulfonium y pyrrolidinium y el anión bis[trifluoromethylsulfonyl]imide)

Indira Yarely López Cortés[a]*, Mariana Ramos Estrada[a+], Gustavo Iglesias Silva[b], Fernando Pérez Villaseñor[c].

[a] Facultad de Ingeniería Química, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México.
[b] Departamento de Ingeniería Química, Instituto Tecnológico de Celaya, México.
[c] Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, México.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: marianar_1999@yahoo.com

Área del Conocimiento: Ingeniería Química

ABSTRACT
One of the main problems when designing processes or searching new applications containing ionic liquids (ILs) is the absence of a reliable database of thermodynamic and thermophysical properties of pure and their mixtures with other solvents. In this context, thermophysical properties of pure ionic liquids and mixtures could provide information not only about the structure of the fluid, but also about the intermolecular interactions, which are the basis for the improvement of thermodynamic models for the representation of the behavior of the ILs in any of their applications. The objective of this work is to investigate the densities of pure ionic liquids and excess properties in mixtures with 1-propanol, based on bis(trifluoromethylsulfonyl)imide anion and pyrrolidinium, sulfonium and imidazolium cations. Density of pure ILs and mixtures was determined by measuring the oscillation period of the U-shaped tube by an Anton Paar vibrating tube densimeter in a temperature range from 278.15 to 343.15 K at atmospheric pressure. The experimental data of pure ionic liquids were adjusted to Gardas and Coutinho equation and mixtures were adjusted to Redlich-Kister model. The excess molar volumes for $[Et_3S][NTf_2]$, $[Amim][NTf_2]$ and $[(OH)_2Im][NTf_2]$ with 1-propanol are positive at all the ranges of composition and at all studied temperatures. Whereas $[(OMe)_2Im][NTf_2]$ + 1-propanol system shows positive values at $x_{LI} > 0.7$. Gardas and Coutinho model exhibit an average absolute percentage error of $2.8156x10^{-06}$, $1.4607x10^{-4}$, $1.4402x10^{-4}$, $1.4442x10^{-4}$ and $1.4905x10^{-4}$ for $[Bmpyrr][NTf_2]$, $[Et_3S][NTf_2]$, [Amim][NTf2], $[(OMe)_2Im][NTf_2]$ and $[(OH)_2Im][NTf_2]$, respectively.

Keywords: ionic liquid, density, mixtures, correlations.

RESUMEN
Actualmente, uno de los principales problemas que se presentan en el diseño de procesos o para determinar nuevas aplicaciones de los líquidos iónicos (LIs), es la falta de sus propiedades termofísicas tanto para líquidos iónicos puros como sus mezclas con diferentes solventes. En este sentido, las propiedades de los LIs puros y sus mezclas pueden proporcionar información no solo acerca de la

estructura del fluido, sino también sobre las interacciones moleculares entre los componentes de la mezcla, las cuales son la base para el mejoramiento de modelos termodinámicos y para la representación del comportamiento de los LIs en cualquiera de sus aplicaciones. El objetivo de este trabajo consiste en investigar las propiedades de los LIs puros y las propiedades de exceso en mezclas con 1-propanol, los cuales se basan en el anión bis(trifluoromethylsulfonyl)imide y los cationes pyrrolidinium, sulfonium e imidazolium. Las densidades de los LIs puros así como sus mezclas fueron determinadas midiendo el período de oscilación en un densímetro de tubo vibrante de Anton Para, en un intervalo de temperatura de 278.15 to 343.15 K y a presión atmosférica. Los datos experimentales de los LIs puros fueron ajustados a la ecuación propuesta por Gardas y Coutiho y las mezclas se ajustaron al modelo de Redlich-Kister. Los volúmenes molares de exceso para los caso de $[Et_3S][NTf_2]$, $[Amim][NTf_2]$ y $[(OH)_2Im][NTf_2]$ con 1-propanol fueron positivos en todo el intervalo de concentración estudiado y a todas las temperaturas. Mientras que para el sistema $[(OMe)_2Im][NTf_2]$ + 1-propanol se obtienen resultados positivos a $x_{LI} > 0.7$. Con respecto a los datos experimentales, el modelo propuesto por Gardas y Coutinho presentó desviaciones de $2.8156x10^{-06}$, $1.4607x10^{-4}$, $1.4402x10^{-4}$, $1.4442x10^{-4}$ y $1.4905x10^{-4}$ para el $[Bmpyrr][NTf_2]$, $[Et_3S][NTf_2]$, [Amim][NTf2], $[(OMe)_2Im][NTf_2]$ y $[(OH)_2Im][NTf_2]$, respectivamente.

Palabras Clave: líquido iónico, densidad, mezclas, correlaciones.

INTRODUCCIÓN

Room temperature ionic liquids (IL) are a new class of salts that are liquid at room temperatures. They are composed of organic cation and organic or inorganic anion. The attractive feature of ionic liquids arises from the enormous variety to tailor their physical and chemical properties by combining cations and anions [1]. Through the adequate combination of ions, the design of ionic liquids can enable the development of more efficient processes and products [2]. Due to their unique properties, such as low vapor pressure, non-flammability, chemical stability at high temperatures and excellent solubility with organic and inorganic compounds, they have been potential applications in synthesis, catalysis, electrochemistry, separation processes, [3-4] bioreactor technology, dye sensitized solar cells, [5] and as lubricants [6]. One of the main barriers for the development of ionic liquids for industrial applications is the scarce of their thermophysical properties in the wide pressure and temperature ranges required for process design purposes [7]. In these sense, knowledge of thermodynamics properties of ILs is essential in various areas of science and industry. In the chemical industry, information about the density of liquid mixtures and their dependence with composition and temperature is very important in different applications for surface facilities, pipeline systems, and mass transfer operations [8], for the design of different types of equipment such as condensers, reboilers, separation trains, or storage vessels [7], while the excess volume is of great importance when studying the nature of the molecular interactions presents in mixtures [6]. In the present work, we have investigated the densities of pure ionic liquids and excess properties mixtures with 1-propanol based on bis(trifluoromethylsulfonyl)imide anion and pyrrolidinium, sulfonium and imidazolium cations in a temperature range of (278.15 to 343) K at atmospheric pressure. The mixtures were determined over 0.1, 0.3, 0.5 and 0.7 of mol fraction.

METHODOLOGY

The ILs selected were 1-butyl-1-methylpyrrolidinium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide $[Bmpyrr][NTf_2]$, tryethylsulfonium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide $[Et_3S][NTf_2]$, 1-allyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide $[Amim][NTf_2]$, 1,3-dimethoxyimidazolium

bis(trifluoromethylsulfonyl)imide $[(OMe)_2Im][NTf_2]$ and 1,3-dihydroxyimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide $[(OH)_2Im][NTf_2]$. ILs were acquired from Sigma Aldrich and did not apply any treatment before to be used. The anion $[NTf_2]^-$ was selected because of its unique properties such as large temperature range of liquid state, high thermal stability and density, relatively low viscosity and volatility, and large electrical conductivity [9]. The mixtures of ILs + 1-propanol were prepared by mass using an analytical balance with the readability of 0.1 and a repeatability for mass of 0.1 mg. The mixtures were placed into stoppered vials and stirred for 15 min. Mixtures were made at 0.1, 0.3, 0.5 and 0.7 of concentration. All the samples were prepared immediately before performing density measurements. Density of pure ILs and mixtures was determined by measuring the oscillation period of the U-shaped tube by an Anton Paar vibrating tube densimeter, model DSA 5000 M, in a temperature range from 278.15 to 343.15 K at atmospheric pressure. Temperature was controlled by a Peltier thermostat. The repeatability of the density is ±0.000001 g/cm^3 and 0.001 °C for temperature. Calibration was made constantly with ultrapure water HPLC and air.

RESULTS

Pure ionic liquids

A comparison of the experimental densities for pure $[Bmpyrr][NTf_2]$ to literature values appears in Figure 1. The percentage deviation between experimental data and different authors was calculated with equation (1):

$$\%\ of\ error = \left(\frac{\eta_{exp} - \eta_{calc}}{\eta_{exp}}\right) * 100 \qquad (1)$$

Our densities data agree with the literature values of Pereiro 2009 [10], Gaciño 2011 [11] and Mutelet 2013 [12], within an average percentage error of 0.022%, 0.047% and 0.015%, respectively. The maximum deviation occurs for Shampsipur 2010 [13] within a percentage of error of 0.122%.

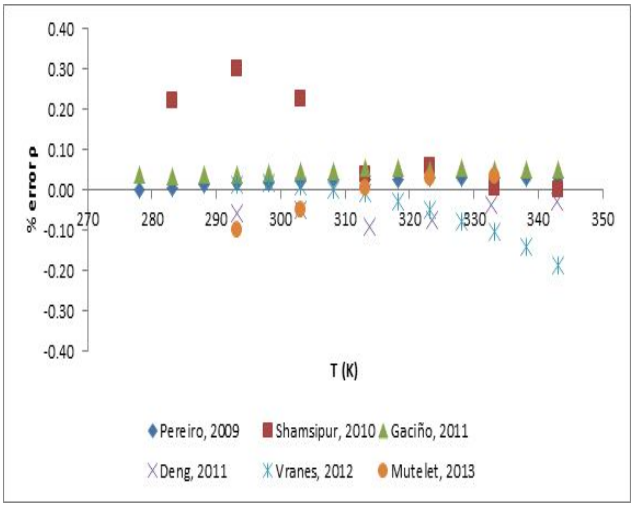


Figure 1. Percentage of deviation of pure $[Bmpyrr][NTf_2]$ and literature.

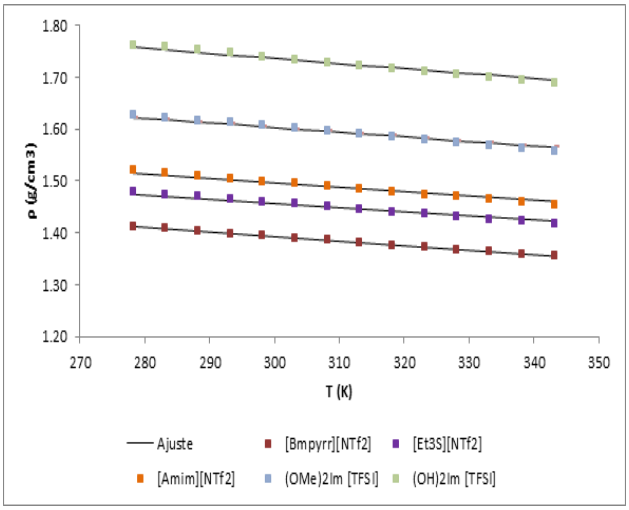


Figure 2. Densities of pure ionic liquids adjusted to Eq. 2.

The pure ionic liquids were adjusted according to the Gardas and Coutinho equation [14]:

$$\rho = \frac{M_w}{NV(a + bT + cP)} \qquad (2)$$

where ρ is the density in kgm^{-3}, M is molecular weight in $g\ mol^{-1}$, N is the Avogadro constant, V is the molar volume in $cm^3 mol^{-1}$, T is the temperature in K, P is the pressure in MPa and a, b, c are parameters adjustable [14]. Figure 2 shows experimental densities adjusted to Eq. (2) and in Table 3 appears the constants from Gardas and Coutinho model [14] for pure ionic liquids. Table 3 also shows the average absolute percentage error from experimental densities and adjusted densities to Eq. (2).

Table 1. Parameters for Gardas & Coutinho for pure ionic liquids.

Ionic liquids	A	B (K^{-1})	C (Mpa^{-1})	AAPE (%)
[Bmpyrr][NTf_2]	0.709304	0.000642	0.991666	2.8156⁇10^{-06}
[Et_2S][NTf_2]	0.738179	0.000550	0.991459	1.4607⁇10^{-04}
[Amim][NTf_2]	0.732923	0.000567	0.991494	1.4402⁇10^{-04}
[$(OMe)_2$Im][NTf_2]	0.734774	0.000561	0.991483	1.4442⁇10^{-04}
[$(OH)_2$Im][NTf2]	0.734774	0.000560	0.991482	1.4905⁇10^{-04}

Mixtures with 1-propanol

From density data, excess molar volumes V^E were calculated according to the equation (3):

$$V^E = \frac{x_1 M_1 + x_2 M_2}{\rho} - \frac{x_1 M_1}{\rho_1} - \frac{x_2 M_2}{\rho_2} \qquad (3)$$

where x_i, M_i, and ρ_i are the mole fraction, the molar mass, and the density of component i, respectively. The V^E of mixtures IL + 1-propanol at different temperature are showed in Figure 3 to 6. The experimental data of mixtures were adjusted to Redlich–Kister equation (eq. 4) of four parameters. This equation provides an excess property of a solution by defining the difference between the real mixture property and that of an ideal solution at the same temperature, pressure, and composition [15].

$$Y = x_2(1 - x_2)\sum_{i=0}^{3} A_i(2x_2 - 1)^i \qquad (4)$$

where $Y = V^E$, V^E, x_2 is the mole fraction of 1-propanol, $A_i (i = 0, 1, 2, 3)$ are adjustable parameters for the Redlich−Kister equation. Figure 3 shows negative excess molar volumes over the mole fraction range studied for mixtures of ILs with 1-propanol. The excess molar volume is a very sensitive parameter, indicating the existence of specific interactions in solutions [16]. The negative deviation of the excess molar volumes may be related to the strong interaction of IL with the alcohol, which causes volume contraction [2]. Figure 4 shows negative excess molar volumes too. The excess molar volume depends mainly on the intermolecular forces between components of the mixtures and on the packing due to the differences in size and shape of molecules [6]. It can be observed too that Figure 4 shows a minimum in the 1-propanol rich region ($x_{LI} = 0.1$) and then V^E increase at the rich phase in LI. It was found that values of the V^E depending on the cation structure [17].

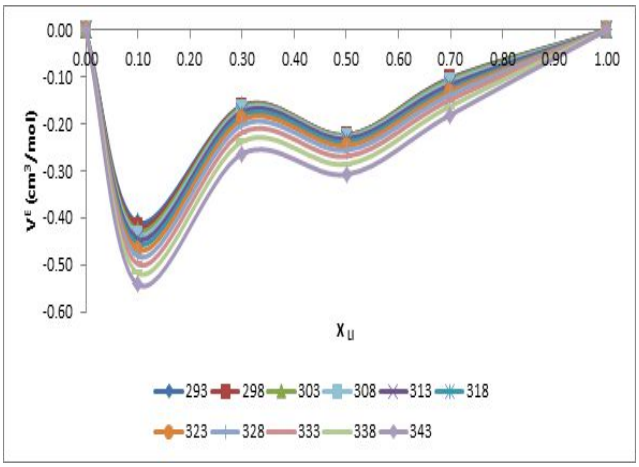


Figure 3. Excess molar volume of mixtures $[Et_3S][NTf_2]$ (1) + 1-propanol (2) at different temperatures.

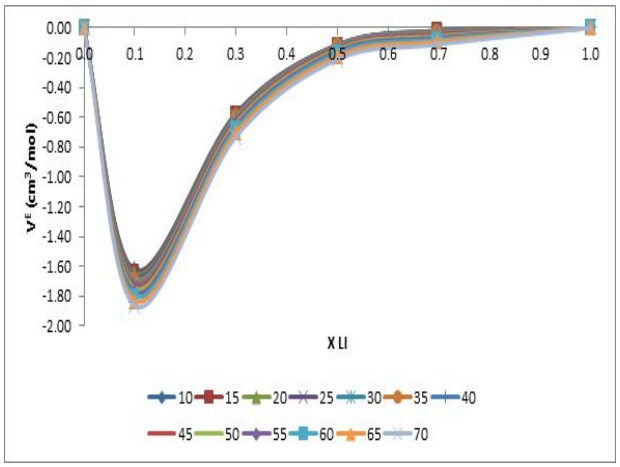


Figure 4. Excess molar volume of mixtures $[Amim][NTf_2]$ (1) + 1-propanol (2) at different temperatures.

The magnitude and sign of V^E values are a reflection of the type of interactions taking place in the mixture [18]. Excess molar values change of sign along the composition range studied in Figure 5, with negative values at the rich phase in 1-propanol and positive values at $x_{LI} > 0.7$ and a minimum at $x_{LI} = 0.5$. This sinusoidal behavior was already observed by González et al. [6] for other imidazolium-based ILs and bis(trifluoromethylsulfonyl)imide anion in mixtures with methanol, ethanol, 1-propanol and 2-propanol. Positive values of excess molar volume may be due to disruption of one or both components in a solution system. For example, the rupture of H-bonding of one compound by the other, or breaking up by weaker physical forces such as dipole or dipole-induced dipole interactions or by any other van der Waals forces [19]. Figure 6 shows negative values of V^E over the whole concentration ragne studied. We have also observed that the magnitude of negative sign decreases as mole fraction of IL increases through $x_{LI} = 0.7$. In this regard, we can assert that more efficient packing is due to the differences in size and shape of molecules or attractive interaction occurs in the region of high mole fraction of the IL. The high negative deviations from ideal behavior observed for these systems are a result of strong intermolecular interactions of IL with 1-propanol [18].

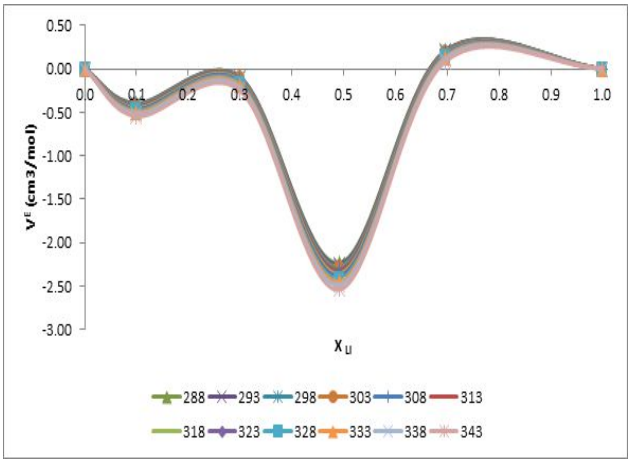


Figure 5. Excess molar volume of mixtures $[(OMe)_2Im][NTf_2]$ (1) + 1-propanol (2) at different temperatures.

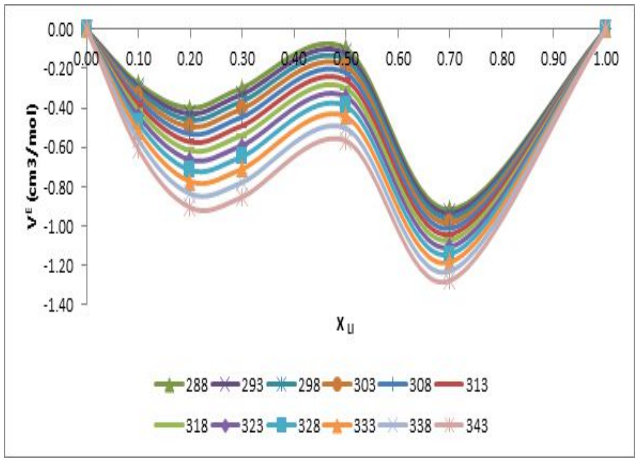


Figure 6. Excess molar volume of mixtures $[(OH)_2Im][NTf_2]$ (1) + 1-propanol (2) at different temperatures.

CONCLUSIONS

In this work, we have investigated the thermophysical behavior of five pure ILs and their mixtures with 1-propanol at various temperatures and at atmospheric pressure. From these measurements, we have calculated excess molar volumes. The values of V^E for $[Et_3S][NTf_2]$, $[Amim][NTf_2]$ and $[(OH)_2Im][NTf_2]$ with 1-propanol are positive at all the ranges of composition and at all studied temperatures. Whereas $[(OMe)_2Im][NTf_2]$ + 1-propanol system shows positive values at $x_{LI} > 0.7$. Gardas and Coutinho model were used to correlate densities of pure ionic liquids with an average absolute percentage error of $2.8156x10^{-06}$, $1.4607x10^{-04}$, $1.4402x10^{-04}$, $1.4442x10^{-04}$ and $1.4905x10^{-04}$ for $[Bmpyrr][NTf_2]$, $[Et_3S][NTf_2]$, $[Amim][NTf_2]$, $[(OMe)_2Im][NTf_2]$ and $[(OH)_2Im][NTf_2]$, respectively. Redlich-Kister equation were used to correlate mixtures densities of ILs with 1-propanol.

ACKNOWLEDGMENT

The authors are grateful to Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Instituto Tecnológico de Celaya, Universidad Autónoma de Tlaxcala and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

REFERENCES

[1] Geppert-Rybczynska M, Lehmann J. K., Safarov J., Heintz A. (2013). "Thermodynamic surface properties of [BMIm][NTf2] or [EMIm][NTf2] binary mixtures with tetrahydrofuran, acetonitrile or dimethylsulfoxide", The Journal of Chemical Thermodynamics, 62: 104-110.

[2] Mokhtarani B., Sharifi A., Mortaheb H. R., Mirzaei M., Mafi M., Sadeghian F. (2009). "Density and viscosity of 1-butyl-3-methylimidazolium nitrate with ethanol, 1-propanol, or 1-butanol at several temperatures", The Journal of Chemical Thermodynamics, 41(12): 1432-1438.

[3] Jiang H., Zhao Y., Wang J., Zhao F., Liu R., Hu Y. (2013). "Density and surface tension of pure ionic liquid 1-butyl-3-methyl-imidazolium l-lactate and its binary mixture with alcohol and water", The Journal of Chemical Thermodynamics, 64: 1-13.

[4] Mokhtarani B., Sharifi A., Mortaheb H. R., Mirzaei M., Mafi M. (2009). "Density and viscosity of pyridinium-based ionic liquids and their binary mixtures with water at several temperatures", The Journal of Chemical Thermodynamics, 41(3): 323-329.

[5] Wu T. Y., Chen B. K., Hao L., Lin K. F., Sun I. W. (2011). "Thermophysical properties of a room temperature ionic liquid (1-methyl-3-pentyl-imidazolium hexafluorophosphate) with poly(ethylene glycol)", Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 42(6): 914-921.

[6] González E. J., Domínguez A., Macedo E. A. (2012). "Excess properties of binary mixtures containing 1-hexyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide ionic liquid and polar organic compounds", The Journal of Chemical Thermodynamics, 47: 300-311.

[7] Aparicio, S., Atilhan M., Karadas F. (2010). "Thermophysical Properties of Pure Ionic Liquids: Review of Present Situation", Industrial & Engineering Chemistry Research, 49(20): 9580-9595.

[8] González B., Calvar N., Gómez E., Domínguez A. (2007). "Density, dynamic viscosity, and derived properties of binary mixtures of methanol or ethanol with water, ethyl acetate, and methyl acetate at T=(293.15, 298.15, and 303.15)K", The Journal of Chemical Thermodynamics, 39(12): 1578-1588.

[9] Grishina E. P., Ramenskaya L. M., Gruzdev M. S., Kraeva O. V. (2013). "Water effect on physicochemical properties of 1-butyl-3-methylimidazolium based ionic liquids with inorganic anions", Journal of Molecular Liquids, 177: 267-272.

[10] Pereiro A. B., Veiga I. M., Esperança M. S., Rodríguez A. (2009). "Effect of temperature on the physical properties of two ionic liquids", The Journal of Chemical Thermodynamics, 41(12): 1419-1423.

[11] Gaciño F. M., Regueira T., Lugo L., Comuñas M., Fernández J. (2011). "Influence of Molecular Structure on Densities and Viscosities of Several Ionic Liquids", Journal of Chemical & Engineering Data, 56(12): 4984-4999.

[12] Mutelet F., Hassan R. E., Stephens T. W., Acree W. E., Baker G. A. (2013). "Activity Coefficients at Infinite Dilution for Organic Solutes Dissolved in Three 1-Alkyl-1-methylpyrrolidinium Bis(trifluoromethylsulfonyl)imide Ionic Liquids Bearing Short Linear Alkyl Side Chains of Three to Five Carbons", Journal of Chemical & Engineering Data, 58(8): 2210-2218.

[13] Shamsipur M., Beigi M., Teymouri M. (2010). "Physical and electrochemical properties of ionic liquids 1-ethyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate, 1-butyl-3-methylimidazolium trifluoromethanesulfonate and 1-butyl-1-methylpyrrolidinium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide", Journal of Molecular Liquids, 157(1): 43-50.

[14] Gardas R. L., Coutinho J. (2008). "A group contribution method for viscosity estimation of ionic liquids", Fluid Phase Equilibria, 266(1-2): 195-201.

[15] Geng Y., Chen S., Wang T., Yu D., Peng C., Liu H, Hu Y. (2008). [8] Geng, Y., S. Chen, et al. (2008). "Density, viscosity and electrical conductivity of 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate + monoethanolamine and + N, N-dimethylethanolamine", Journal of Molecular Liquids, 143(2-3): 100-108.

[16] Zhao F. Y., Liang L. Y., Wang J. Y., Hu Y. Q. (2012). "Density and surface tension of binary mixtures of 1-ethyl-3-methylimdazolium nitrate with alcohols", Chinese Chemical Letters, 23(11): 1295-1298.

[17] Królikowska M., Lipinski P., Maik D. (2014). "Density, viscosity and phase equilibria study of ethylsulfate-based ionic liquid+water binary systems as a function of temperature and composition", Thermochimica Acta, 582: 1-9.

[18] Govinda V., Reddy P. M., Attri P., Venkatesu P., Venkateswarlu P. (2013). "Influence of anion on thermophysical properties of ionic liquids with polar solvent", The Journal of Chemical Thermodynamics, 58: 269-278.

[19] Bhuiyan M. M. H., Udin M.H. (2008). "Excess molar volumes and excess viscosities for mixtures of N,N-dimethylformamide with methanol, ethanol and 2-propanol at different temperatures", Journal of Molecular Liquids, 138(1-3): 139-146.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF POLYACRYLONITRILE FIBERS WITH ANTIBACTERIAL AND AROMATIC PROPERTIES

(Desarrollo y caracterización de fibras de poliacrilonitrilo con propiedades antibacteriales y aromáticas)

Juan Carlos Tapia Picazo[a+],Tito Enrique Herrera Larrasilla[b], Karen Analy Campos Santana[a*]

[a] Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica, Instituto Tecnológico de Aguascalientes. Av. Adolfo López Mateos No. 1082 Ote., Fracc Bona Gens, C.P.20256. Aguascalientes, Ags.
[b] Universidad Autónoma de Guadalajara. Av. Patria 1201, Lomas del Valle, 45129 Zapopan, Jalisco.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: tapiajc@hotmail.com

Área del Conocimiento: Ingeniería Química.

ABSTRACT
Since fibers with special characteristics from acrylic polymer represent a new development of scientific research in Mexico, a niche market with high added value is present and because of the high volume, low density and nice touch of this fibers is recommended the textile use as alternative of wool. Thanks to the high competition between textile companies in recent years, manufacturers are forced to provide new features to their products to make them more attractive. The special characteristics to the fibers can be added using additives that are included in the spinning surface or added to the fibers, such as microcapsules. In this work, the addition of aromatic and antibacterial properties is proposed to an acrylic fiber adhering microcapsules to its surface, the microencapsulated agent that gives the antibacterial property is triclosan, which has become popular for its effectiveness against fungi and bacteria, and its low toxicity to humans, to give the aromatic property the baby arome and Jasmine essence is microencapsulated. A wet extrusion system was constructed and the conditions that can be operated were determined, the spinning system has special characteristics compared to a conventional wet spinning process because it requires steps where it is important to ensure the incorporation of the microcapsules, plus a special care in drying the filaments to ensure a structure that enables the release of them. Analytical techniques were implemented to characterize the fibers and raw materials in experimental design; Through a L_{32} orthogonal array of Taguchi methodology, the variables that affect the response variables of the spinning process (washing resistance, denier, tenacity and elongation) were found, being important control parameters for our fibers with special characteristics. The optimum fiber obtained from this study shows a resistance of 7 washes without losing its special characteristics. Our filaments have a tentative market in the production of bathrobes, towels and blankets.

Keywords: acrylic fiber; wet spinning; microcapsules; antibacterial; aromatic.

RESUMEN
Puesto que las fibras con características especiales a partir de polímero acrílico representan un nuevo desarrollo de investigación científico en México, se presenta un nicho de mercado con alto valor agregado y debido a la alta voluminosidad, su baja densidad y su tacto agradable es recomendable su empleo textil como alternativa de la lana. Gracias a la fuerte competencia entre empresas textiles en los últimos años, los fabricantes se ven obligados a dotar a sus productos nuevas funcionalidades para

hacerlos más atractivos. Las características especiales a las fibras pueden agregarse mediante aditivos que se incluyen en la extrusión o se agregan superficialmente a las fibras, tales como las microcápsulas. En este trabajo se propone la adición de propiedades aromáticas y antibacteriales a una fibra acrílica adhiriendo microcápsulas a su superficie, el agente microencapsulado que otorga la propiedad antibacterial es el triclosán, el cual se ha popularizado por su efectividad contra hongos y bacterias, y por su baja toxicidad hacia los humanos, para el caso de la propiedad aromática se microencapsúla esencia de aroma a bebé y aroma a Jazmín. Se construyó un sistema de extrusión en húmedo y se determinaron las condiciones a las que puede ser operado, el sistema de hilatura presenta características especiales respecto a un proceso tradicional de hilatura en húmedo debido a que requiere etapas donde es importante asegurar la incorporación de las microcápsulas, además un cuidado especial en el secado de los filamentos para garantizar una estructura que no permita la liberación de las estas. Se implementaron técnicas analíticas para la caracterización de las fibras y materia prima en el diseño experimental; mediante un arreglo ortogonal L_{32} de la metodología Taguchi, se encontraron las variables que más afectan en las variables de respuesta del proceso de hilatura (resistencia al lavado, denier, tenacidad y elongación), siendo estas parámetro de control importante para nuestra fibra con características especiales. Después de ser evaluada la fibra, muestra de 5-7 lavadas, que es un valor significativo. El uso de nuestros filamentos tiene un mercado tentativo en la producción de batas de baño, toallas y cobertores.

Palabras Clave: fibra acrílica, extrusión en húmedo, microcápsulas, antibacterial, aromática.

INTRODUCCIÓN

La fibra acrílica es un polímero constituido por macromoléculas lineales cuya cadena contiene un mínimo del 85% en masa de unidad estructural correspondiente al acrilonitrilo, de acuerdo a las propiedades de las fibras acrílicas es recomendable su empleo textil como alternativa de diferentes fibras naturales. Entre estas propiedades se pueden citar la alta voluminosidad con tacto cálido parecido a la lana, su baja densidad y su tacto agradable [1] y puesto que las fibras con características especiales a partir de polímero acrílico representan una nueva vertiente de investigación científica en México se presenta un nicho de mercado de alto valor agregado [2].

Las características especiales de las fibras, se pueden añadir de diferentes maneras, una de ellas es la modificación química a monómeros o a polímeros que forman las fibras, otra manera es mediante aditivos que se incluyan durante la extrusión o se agreguen superficialmente a las fibras, tales como las microcápsulas [3].

METODOLOGÍA

Para la realización de la solución patrón (Colodión), se requiere como materia prima poliacrilonitrilo, la cual se puede obtener por medio de una polimerización, sin embargo en este caso se utilizó un polímero comercial.

La extrusión en húmedo es el proceso que se utilizó para la fabricación de la fibra acrílica con características especiales. El sistema utilizado en este proyecto se esquematiza en la figura 1, una solución polimérica acrílico-solvente orgánico (colodión) procedente de una columna a presión constante es extruida a través de una esprea, la cual está sumergida en el baño de coagulación por debajo del nivel del líquido, provocando que el polímero se solidifique por un intercambio de masa. A la salida del baño coagulante, los filamentos se estiran y se lavan. A la salida del baño de lavado los filamentos pasan por un baño de microcápsulas para obtener la propiedad antibacterial y aromática, posteriormente se pasan por una zona de suavizante y se secan los cables para después ser voluminizados.

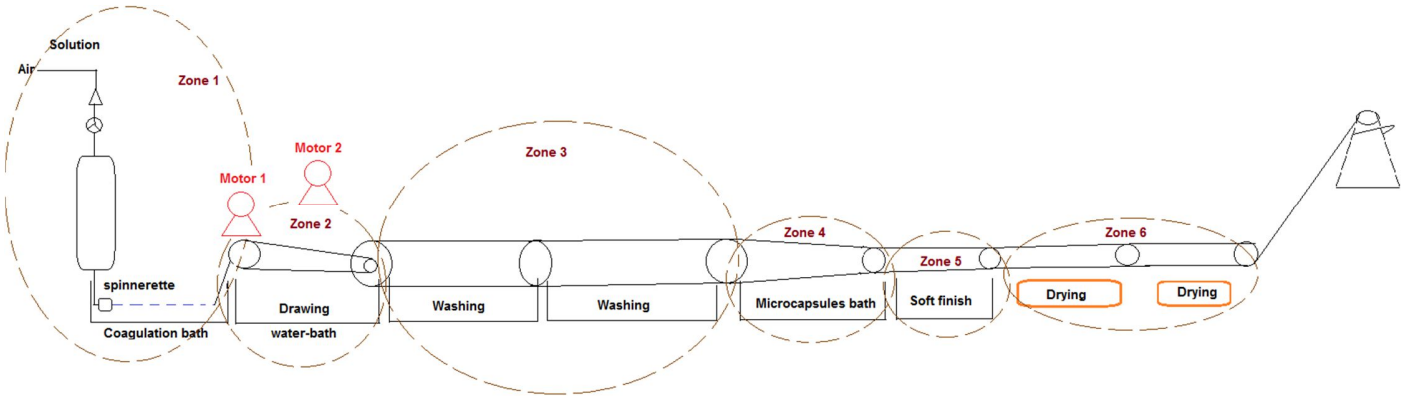


Figura 1.- Esquema de extrusión en húmedo (hilatura).

Es importante la implementación de técnicas analíticas en este proyecto para la caracterización de las fibras producidas y la materia prima. Fueron desarrolladas y evaluadas las siguientes técnicas analíticas (tabla 1) debido a que son las más importantes y algunas son las variables de respuesta para obtener un filamento con las propiedades antibacteriales y aromáticas óptimas

Tabla 1. Técnicas de caracterización

Técnica analítica	Observación
Resistencia al lavado	Fuerza que tiene la fibra en soportar lavadas (retención de aroma y propiedad antibacterial). Esta prueba se aplicó a la fibra mediante una solución jabonosa con balines y agitación controlada para después analizar la presencia de olor en la fibra.
Denier	Control para distribución me microcápsulas (peso en gramos de 9000 metros de filamento)
Tenacidad	Es una propiedad mecánica que nos ayuda a conocer la resistencia al estiraje del filamento
Elongación	Porcentaje de estiramiento del filamento
Corte transversal	En fibra acrílica utilizando extrusión en húmedo es generalmente de forma arriñonada
Peso molecular	Se debe evaluar el peso molecular para saber qué tan resistente será nuestra fibra
Determinación de acabados	Esta técnica se evalúa para remover ácidos grasos al polímero comercial
Índice de Vacuolas	Es importante para conocer la porosidad del filamento, que es donde se incrustan las microcápsulas

Se seleccionó un arreglo ortogonal L_{32} de la metodología Taguchi, con el fin de encontrar las variables que más afectan en el proceso de hilatura (tabla 2) y encontrar la combinación que dé las mejores características para las variables de respuesta (resistencia al lavado, denier, tenacidad y elongación, siendo estos parámetros de control importante para nuestra fibra con características especiales).

Tabla 2. Variables de diseño de experimento

Variables de diseño de experimento			
Factor		1	2
1	Microcápsulas en la solución	6%	12%
2	Concentración de microcápsulas en el baño	6%	12%
3	Presión en la columna	1.5kg/cm	2.0kg/cm
4	% de fibra en la solución polimérica	20	15
5	Concentración de solvente en baño de coagulación (H_2O/DMF)	70/30	60/40
6	Temperatura en el baño de coagulación (°C)	25	40
7	Velocidad de salida de baño de coagulación (motor 1) (m/min)	3	3.54
8	Tipo de estiraje (zona 2)	Húmedo	Seco
9	Relación de estiraje (zona 2)	1.5	2
10	Etapas de lavado (zona 3)	1	2
11	Temperatura de baño de lavado (°C) (zona 3)	45°	30°
12	Estiraje en el lavado (zona 3)	Sin estiraje	1.5 veces
13	Temperatura en el baño de mc. °C (Zona 4)	25	40
14	Estiraje en baño de mc.(zona 4)	Sin estiraje	1.5 veces
15	Tipo de microcápsulas.	Tipo 1	Tipo 2
16	Cantidad de suavizante. (zona 5)	5%	10%
17	Temperatura de suavizante (°C). (zona 5)	25	35
18	Temperatura plancha 1 (°C)	100	140
19	Temperatura plancha 2 (°C)	100	140
20	Estiraje en área de secado. (Zona 6) Plancha 1	Sin estiraje	1.5 veces
21	Estiraje en área de secado. (Zona 6) Plancha 2	Sin estiraje	1.5 veces
22	Número de pasadas plancha 1	3	7
23	Número de pasadas plancha 2	3	7

Las variables incorporadas en el diseño de experimentos se han definido tomando en cuenta diferentes fuentes bibliográficas [4], en donde se observa que estas afectan en las propiedades físicas y mecánicas de la fibra.

RESULTADOS

De acuerdo al diseño de experimentos las variables de respuesta utilizadas para obtener el modelo óptimo de filamento con propiedades aromáticas y antibacteriales son:

***Denier**:* para llegar al denier deseado de 3, la combinación óptimas es de 1.5 Kg/cm^2 y una relación en el baño de 70 de agua y 30 de DMF.

***Tenacidad (grf/Denier)**:* para obtener una tenacidad elevada son: 20 % de polímero acrílico y una relación en el baño de coagulación de 70 de agua y 30 de DMF.

Resistencia al lavado (# de lavadas): se requiere de un índice de vacuolas bajo, por lo que es conveniente realizar el proceso con una temperatura en el área de secado de 140°C y un porcentaje de

cápsulas de 6; de esta manera los poros se cerraran aplicando una mayor cantidad de calor y con un porcentaje de cápsulas más pequeño.

***Elongación**:* La variable de mayor impacto para obtener una elongación grande en las fibras es el % de cápsulas en el colodión. Se puede observar que el nivel óptimo a usar es el 2 con 12% de Cápsulas.

CONCLUSIONES

La extrusión en húmedo no elimina o rompe las microcápsulas, ya que la fibra obtenida presenta olor al terminar su fabricación. Las variables estudiadas de acuerdo a las técnicas analíticas para el diseño experimental fueron adecuadas para obtener las condiciones óptimas, ya que en las pruebas confirmatorias se obtuvo una fibra con un diámetro de 3 Denier. La fibra con injertos de microcápsulas, muestra presencia de olor hasta las 7 lavadas, lo cual es acorde a la norma establecida para este tipo de materiales con el método utilizado.

REFERENCIAS

[1] Ureta E.; (1989) "*Polímeros: estructura, propiedades y aplicación*", Editorial Limusa.

[2] Wang C. X., Chen Sh.; (2005) "*Aromachology and its Application in the Textile Field*". Fibres And Textiles in Eastem Europe, Vol. 13 No. 6 (54), pp. 41-44.

[3] Martínez C.E. (2004); "*Encapsulación de Sólidos por Medio de Polimerización Interfacial*", Tesis de Maestría en Ingeniería Química. Instituto Tecnológico de Aguascalientes.

[4] Baojun Qian, Weiping Lin, Jianming He and Chengxun Wu. (1995). The role of macromolecular entanglements in the gel spinning process and properties of high performance polyacrylonitrele fibers*.

EVALUATION OF AN ACRYLONITRILE-BASED POLYMER IN A WET EXTRUSION SYSTEM TO OBTAIN CARBON FIBER PRECURSORS

(Evaluación de un polímero a base de acrilonitrilo en un sistema de hilatura en húmedo para la obtención de precursoras de fibra de carbón)

Juan Carlos Tapia Picazo [a], Cesar Arturo Muñoz Gallegos [a*+].

[a] Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica, Instituto Tecnológico de Aguascalientes. Av. Adolfo López Mateos No. 1082 Ote., Fracc. Bona Gens, C.P.20256. Aguascalientes, Ags.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: cesar.munozgallegos@hotmail.com

Área del Conocimiento: Ingeniería Química.

ABSTRACT
The high tenacity and low denier that characterizes carbon fibers are reasons why it´s been generated a big interest of the potential that they have at different application fields such as construction, sports equipment, aerospace, including other. Studies have shown that the performance of the carbon fibers (CF) is highly dependent on the composition and quality of its precursors, it´s been identified that polyacrylonitrile-based fibers are the most important and promising precursors. However, the bottleneck in large-scale applications of this material is the high cost compared to other materials that also could be used. Just over 50% of the total cost of manufacturing a carbon fiber is conferred to the cost of the precursor fiber. There are two steps in the production process of carbon fibers where the cost of service is high, stabilization and carbonization, since the fiber must be subjected to temperatures up to 1000°C to obtain chemical structures that confer the high tenacity to the filament, this problems can be solved by using comonomers that make able the structure change go faster and needing a lower temperature. In this work the polymerization and wet spinning steps are integrated varying operation conditions to then characterize the fibers obtained. Under an orthogonal design of experiments have been identified the major variables that affect the denier, tenacity, elongation, porosity and cross sectional shape of the filaments. The analysis will allow in a short period the robust production of carbon fibers with specific applications at a low cost.

Keywords: Precursor fiber; Polyacrylonitrile; Carbon fiber; Wet Spinning.

RESUMEN
La alta tenacidad y bajo denier que caracteriza a las fibras de carbón son las razones por las cuales se ha generado un gran interés del potencial que estas tienen en diferentes campos de aplicación como la construcción, equipamiento deportivo, aeroespacial, entre otras. Estudios han demostrado que el rendimiento de las fibras de carbón (FC) es altamente dependiente de la composición y calidad de sus precursoras, se ha identificado que las fibras a base de poliacrilonitrilo son las más importantes y prometedoras precursoras. Sin embargo, el cuello de botella en la aplicación a gran escala de este material es su gran costo comparado con otros materiales que también pueden ser usados. Un poco más de 50% del costo total de producción de las fibras de carbón se le confiere al costo de la fibra

precursora. Existen dos pasos en el proceso de producción de la fibra de carbón donde el costo de servicios es alto, estabilización y carbonización, ya que la fibra debe ser sometida a temperaturas mayores a los 1000°C para obtener estructuras químicas que confieren la alta tenacidad a los filamentos, estos problemas pueden ser resueltos al usar comonómeros que hacen posible el cambio estructural de forma rápida y a menor temperatura. En este trabajo la polimerización e hilatura en húmedo son integradas variando condiciones de operación para después caracterizar las fibras obtenidas. Bajo un diseño de experimentos ortogonal se han identificado las variables que afectan el denier, tenacidad, elongación porosidad y forma de sección transversal de los filamentos. El análisis permitirá a corto plazo la producción robusta de fibras de carbón con aplicaciones específicas a un bajo costo.

Palabras Clave: Fibra precursora; Poliacrilonitrilo; Fibra de carbón; Hilatura en húmedo.

INTRODUCCIÓN

Las fibras de carbón son bien conocidas por sus propiedades físicas favorables como la alta tenacidad y baja densidad [1]. Las características antes mencionadas han sido la carta de presentación para que este tipo de fibras sean de gran interés en el campo aeroespacial, estructuras de concreto, vehículos ultraligeros, equipamiento deportivo, entre otras. Sin embargo el cuello de botella en la aplicación a gran escala de este material es el alto costo que tienen las fibras de carbón comparado a otros materiales que también pueden ser usados [2]. Aunado a estas aplicaciones se ha abierto un campo de investigación en el que se estudia la capacidad de las fibras de carbón para la remoción de contaminantes del agua [3].

Se ha hecho una ardua investigación acerca de cuáles son los mejores precursores para la producción de fibras de carbón con altas propiedades mecánicas, algunos polímeros orgánicos heterocíclicos resistentes a altas temperaturas como las poliamidas han sido satisfactoriamente convertidas a fibras de carbón con propiedades mecánicas únicas, el inconveniente de usar este tipo de tecnología es su alto costo, también se ha estudiado la conversión a fibra de carbón de ciertos polímero termoplásticos como el polietileno, polipropileno y polivinilacetato, presentando propiedades mecánicas pobres. Después de tanto estudio con respecto a las fibras precursoras y las propiedades que tienen al convertirse en fibras de carbón se identificó que las fibras a base de PAN, rayón y brea reúnen las características necesarias para poder ser buenas precursoras, por lo cual han sido usadas para la producción a gran escala, siendo las fibras a base de PAN las más utilizadas [4].

El proceso de producción de una fibra de carbono a base de PAN involucra varias etapas las cuales afectan directamente a las características que tendrá la fibra y con esto la aplicación que se le pueda dar:

1. Polimerización. El peso molecular que tendrá el polímero es conferido en este punto, es usual agregar comonómeros a la cadena polimérica principal con el propósito de proveer un mejor control térmico del proceso de estabilización e incrementar la capacidad de estiramiento de la fibra.
2. Hilatura. En esta etapa se da la forma y estructura interna al precursor, siendo estas dos características definidas por diferentes variables dentro del proceso como lo son el tipo de extrusión,

concentración del baño de coagulación, temperatura de las tinas de lavado así como el estiraje proporcionado a la fibra.
3. Estabilización. Previo a la carbonización la fibra precursora debe acondicionarse, esta etapa involucra convertir la cadena lineal de PAN en una cadena polimérica cíclica térmicamente estable.
4. Carbonización. La conversión del precursor estabilizado a fibra de carbón es realizada por calentamiento a temperaturas de alrededor de 1000°C sometiéndolas a tención dentro de una atmósfera libre de oxígeno, las características físicas y la estructura química de las fibras en este punto dependen directamente de la temperatura a la que se trabaja en este proceso.

METODOLOGÍA

Las propiedades químicas de la fibra precursora y de la fibra de carbón resultante están en función de la composición del polímero a utilizar, por lo tanto se debe hacer una buena elección de polímeros a utilizar. La obtención del polímero se hará a partir de un proceso de polimerización en solución, utilizando acrilonitrilo (AN) como monómero principal, siendo el mecanismo de reacción por radicales libres al utilizar un iniciador que promueve este tipo de reacción.

La metodología Taguchi es una estrategia experimental en la que se examinan de manera simultánea las variables de un sistema, la ventaja de esto es que se conocen las variables de mayor impacto en un sistema haciendo la menor cantidad de experimentos.
En la tabla 1 se muestran las condiciones de operación en la polimerización utilizando un diseño de experimentos L12 de la metodología Taguchi.

Tabla1. Diseño de experimentos de la polimerización

Prueba	Factores								
	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1	50	0.01	3	0.05	0.01	AV	AI	1	250
2	50	0.01	3	0.05	0.01	AM	AB	2	350
3	50	0.01	5	0.1	0.03	AV	AI	1	350
4	50	0.02	3	0.1	0.03	AV	AB	2	250
5	50	0.02	5	0.05	0.03	AM	AI	2	250
6	50	0.02	5	0.1	0.01	AM	AB	1	350
7	60	0.01	5	0.1	0.01	AV	AB	2	250
8	60	0.01	5	0.05	0.03	AM	AB	1	250
9	60	0.01	3	0.1	0.03	AM	AI	2	350
10	60	0.02	5	0.05	0.01	AV	AI	2	350
11	60	0.02	3	0.1	0.01	AM	AI	1	250
12	60	0.02	3	0.05	0.03	AV	AB	1	350

A= Temperatura de reacción (°C) D= % p/p comonómero/MT G= Tipo de termonómero
B= Relación en peso iniciador/MT E= % p/p termonómero/MT H= Tiempo de reacción (hr)
C= Relación en peso solvente/MT F= Tipo de comonómero I= Velocidad de agitación (rpm).

Una de las características más importantes para la obtención de fibras de carbón de buena calidad es el peso molecular del polímero precursor, por tal motivo, este será uno de los parámetros que clasificarán

cada uno de los polímeros obtenidos, una propiedad que diferencia una fibra precursora de una fibra textil común es la baja temperatura y rapidez con la que esta se estabiliza, por tal motivo el grado de oxidación es otra de las variables de respuesta en el proceso de selección de los polímeros a utilizar, la última variable de respuesta que será considerada es el rendimiento que tiene cada una de las polimerizaciones.

Posteriormente se realizaron pruebas preliminares a un sistema de hilatura en húmedo el cual está esquematizado en la figura 1, utilizándose para esto un polímero comercial.

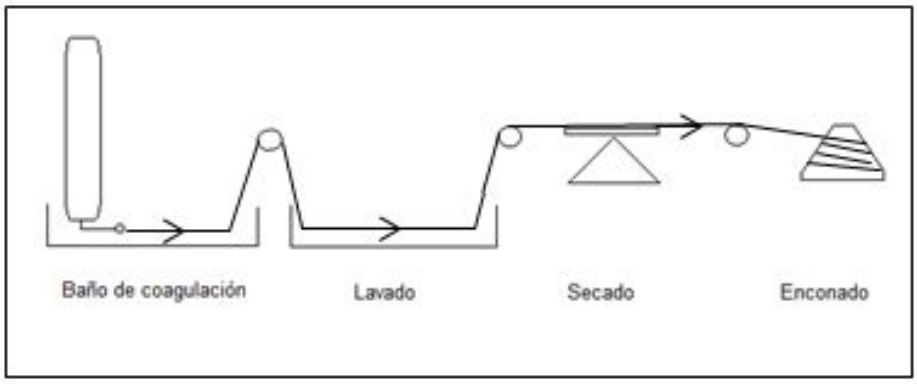


Figura 1. Sistema de hilatura en húmedo

Se definió un diseño experimental del tipo ortogonal L12 para la etapa de hilado en húmedo. La tabla 2 muestra las condiciones de operación de cada prueba.

Tabla 2. Diseño experimental de hilatura en húmedo

Prueba	Factores							
	A	B	C	D	E	F	G	H
1	17	30	1.5	0.75	27	27	140	5
2	17	30	1.5	0.75	27	40	120	11
3	17	30	2.5	1.25	40	27	140	5
4	17	40	1.5	1.25	40	27	120	11
5	17	40	2.5	0.75	40	40	140	11
6	17	40	2.5	1.25	27	40	120	5
7	20	30	2.5	1.25	27	27	120	11
8	20	30	2.5	0.75	40	40	120	5
9	20	30	1.5	1.25	40	40	140	11
10	20	40	2.5	0.75	27	27	140	11
11	20	40	1.5	1.25	27	40	140	5
12	20	40	1.5	0.75	40	27	120	5

A= Concentración en solución polimérica (fibra/DMF) [% masa]
B= Concentración en baño de coagulación (DMF/agua) [% masa]
C= Velocidad de salida en baño de coagulación (m/min)
D= Presión en columna (kg/cm2)
E= Temperatura en baño de coagulación (°C)
F= Temperatura de lavado (°C)
G= Temperatura de secado (°C)
H= Etapas de secado

Las variables de respuesta a estudiar fueron índice de vacuolas, alargamiento, elongación, tenacidad y denier.

RESULTADOS

Se realizaron análisis estadísticos para conocer el impacto de los nueve factores (variables independientes) del diseño de experimentos sobre tres variables de respuesta: conversión, peso molecular y grado de oxidación, en la tabla 3 se muestra la importancia de cada uno de los factores con respecto a la variable de respuesta medida, para esto se hace uso del valor de la F de Fisher donde el impacto es más significativo si el valor de la F es mayor.

El análisis estadístico realizado dio pie a la síntesis de cuatro polímeros con propiedades específicas, las cuales se muestran en la tabla 4, estos materiales serán utilizados posteriormente en el estudio de la etapa de hilatura.

El resultado condensado de la caracterización de las 12 pruebas realizadas en la etapa de hilatura se muestra esquematizado en la figura 2.

Tabla 3. Efecto de cada factor con respecto a la variable de respuesta en la polimerización

Conversión		Peso molecular		Grado de oxidación	
Factor	F exp	Factor	F exp	Factor	F exp
C	*39.32*	C	634.49	F	*26.00*
B	*37.77*	G	135.87	G	*18.62*
A	*30.21*	H	97.52	B	*5.54*
G	*10.80*	E	82.70	I	*5.54*
H	*7.28*	B	15.36	A	*2.46*
F	*3.27*	F	12.79	D	*2.46*
E	0.89	A	0.79	C	*1.38*
D	0.51	D	0.08	E	*1.38*
I	0.15	I	0.01	H	*0.61*

A= Temperatura de reacción (°C)
B= Relación en peso iniciador/MT
C= Relación en peso solvente/MT
D= % p/p comonómero/MT
E= % p/p termonómero/MT
F= Tipo de comonómero
G= Tipo de termonómero
H= Tiempo de reacción (hr)
I= Velocidad de agitación (rpm).

Tabla 4. Características de los polímeros óptimos

Polímero	Monómero	Comonómero	Termonómero	Rendimiento	Oxidación	Peso molecular
1	AN	AM	AI	38.29	4	38748.93
2	AN	AM	AI	17.52	4.75	40912.12
3	AN	AV	AI	17.45	5	38486.78
4	AN	AV	AI	26	4.3	36826.15

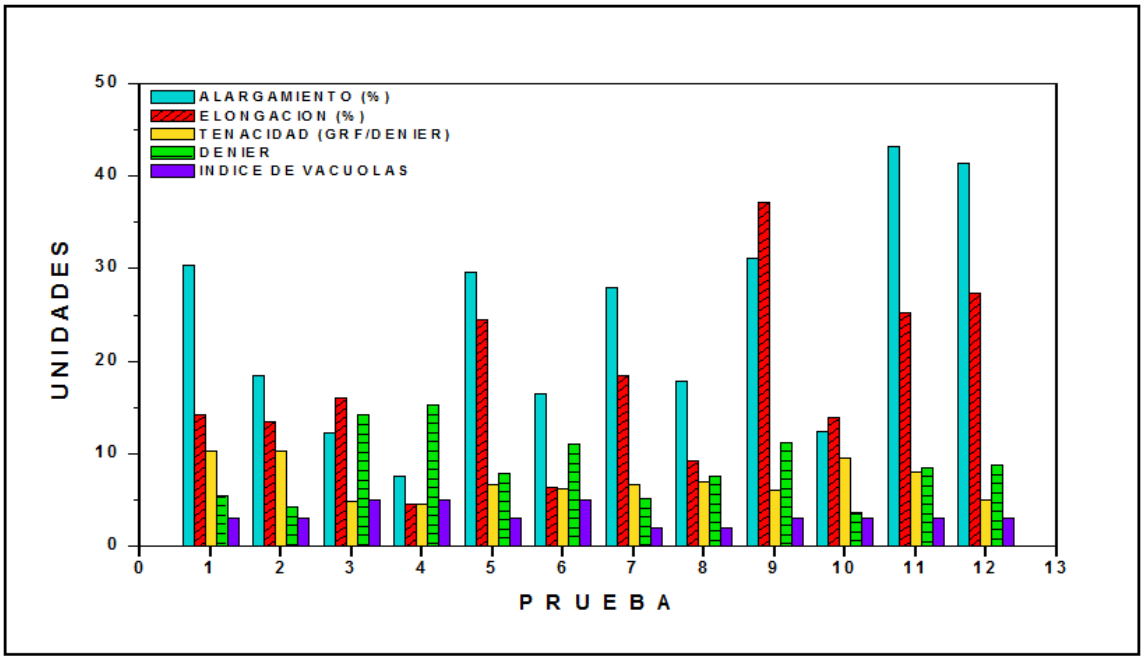


Figura 2. Caracterización de fibras a partir de diseño de experimentos

DISCUSIONES

El análisis estadístico realizado a la etapa de polimerización arroja resultados interesantes, de los cuales es importante destacar la dependencia del rendimiento y el peso molecular con respecto a la cantidad de solvente utilizado, mientras más concentrado se va haciendo el sistema más se acerca al tipo de polimerización en masa el cual consiste en hacer reaccionar los monómeros donde el medio reaccionante está libre de solvente alguno, es bien sabido que este tipo de polimerizaciones es la que presenta mejores resultados, el inconveniente de utilizar este tipo de reacciones es el bajo control que se genera a niveles industriales al ser esta una reacción violenta. Otro punto a discutir es el uso de iniciador en la polimerización ya que al ser este aumentado, de la misma manera aumenta la cantidad de polímero obtenido, mientras que el peso molecular obtenido decrece.
El estudio previo de hilatura usando un polímero comercial es importante ya que con este se pone a prueba la funcionalidad del sistema así como los métodos de caracterización de los filamentos resultantes y su reproducibilidad.

CONCLUSIONES

La producción de fibras de carbón es un proceso extenso el cual tiene una gran cantidad de factores que influyen en la calidad del material.

En la etapa de polimerización se confieren las propiedades químicas de la fibra precursora obtenida.

Es necesaria la adición de comonómeros a la cadena polimérica para aumentar la procesabilidad del material obtenido así como para bajar los costos de energía necesarios en las etapas de estabilización y carbonización de las fibras precursoras.

En la etapa de hilatura se la da forma a los filamentos y se le confieren las propiedades físicas y mecánicas que tendrá la fibra precursora.

REFERENCIAS

[1] Jian-Junn L., Heyi G. and Cheng-Gou W. (2006), "Modification of Polyacrylonitrile Precursors for Carbon Fiber via Copolymerization of Acrylonitrile with Ammonium Itaconate".

[2] F. L. Paulauska. (2008), "Novel Precursor Materials and Approaches for Producing Lower Cost Carbon Fiber for High Volume Industries".

[3] Tapia P., Vásquez C., Bonilla P. (2012) "Desarrollo de Microfibras de Carbón de Baja Pureza y su evaluación en la eliminación de metales pesados del agua".

[4] Morgan, P. (2005). "Precursors for Carbon Fiber Manufacture", in Carbon Fibers and Their Composites. Taylor & Francis Group., 121-184.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

ANALYSIS AND SIMULATION OF A STEAM DISTILLATION PROCESS FOR PERSIAN LIME ESSENTIAL OIL EXTRACTION

(Análisis y simulación de un proceso de destilación por arrastre de vapor para la extracción de aceite esencial de limón persa)

Oswaldo Andrés Martínez[ab]*, José Daniel Padilla de la Rosa[b], Juan Paulo García Sandoval[a+]

[a] Departamento de Ingeniería Química. Universidad de Guadalajara. Blvd. Marcelino García Barrágan No. 1421. Guadalajara, Jal., C.P. 44430. México.
[b] Tecnología Alimentaria, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. Camino Arenero 1227, El Bajio del Arenal, C.P. 45019, Zapopan, Jal., México.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: paulo.garcia@cucei.udg.mx

Área del Conocimiento: Ingeniería Química.

ABSTRACT
Persian lime (*Citrus latifolia* Tanaka) essential oil is currently extracted from a juice-oil emulsion by a batch steam distillation process. There exists an alternative way developed in CIATEJ that consists of a continuous multi-stage system, however it is necessary a deeper study of its performance. Process simulation is a possible strategy for this goal. In this study, a simulation of the continuous five-stage system was developed using the rate-based model of Aspen Plus software. UNIQUAC was selected as liquid activity coefficient model. The inputs were obtained from pilot scale and phase equilibrium experimental data in literature. A three-component subsystem for Persian lime juice-oil emulsion was represented in the composition space in order to visualize its thermodynamic and topology. The simulation outputs were compared with experimental profiles from literature for four components of Persian lime essential oil. It was found that the composition space is divided in two distillation regions by a distillation boundary, which in turn is generated by two heteroazeotropes. The simulation profiles closely match the pilot plant data. This result allows identifying the thermodynamic and mathematical aspects that model the distillation system and opens the possibility to use the simulation for control and optimization purposes.

Keywords: Steam distillation; Persian lime essential oil; Process simulation; Rate-based model

RESUMEN
El aceite esencial de limón persa (*Citrus latifolia* Tanaka) se extrae actualmente de la emulsión jugo-aceite por un proceso de destilación por arrastre de vapor. Existe una forma alternativa desarrollada en CIATEJ que consiste de un sistema multietapas en continuo, sin embargo se necesita un estudio más profundo de su rendimiento. La simulación del proceso es una estrategia posible para este objetivo. En este estudio, se desarrolló una simulación del sistema de cinco etapas en continuo usando el modelo basado en velocidad del software Aspen Plus. Se seleccionó UNIQUAC como modelo de coeficiente de actividad líquida. Las entradas se obtuvieron de datos experimentales de equilibrio de fase y de planta piloto en la literatura. Se representó un subsistema de tres componentes para la emulsión jugo-aceite

de limón persa en el espacio de composición, con el objetivo de visualizar su termodinámica y topología. Los resultados de la simulación fueron comparados con perfiles experimentales reportados en la literatura para cuatro componentes del aceite esencial de limón persa. Se encontró que el espacio de composición es dividido en dos regiones de destilación por una frontera de destilación, que a su vez es generada por dos heteroazeotropos. Los perfiles de la simulación se aproximan a los datos de planta piloto. Este resultado permite identificar los aspectos matemáticos y termodinámicos que modelan el sistema de destilación y abre la posibilidad de usar la simulación para propósitos de control y optimización.

Palabras Clave: Destilación por arrastre de vapor; aceite esencial de limón persa; simulación de proceso; modelo basado en velocidad.

INTRODUCCIÓN

En el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ) se desarrolló un sistema continuo multietapas de destilación (con solicitud de patente). Este sistema permite efectuar un proceso de destilación por arrastre de vapor operando como una cascada de extracción a flujo cruzado, lo cual representa una alternativa al proceso actual por lotes [1]. Con este proceso es posible extraer de manera eficiente el aceite esencial presente en la emulsión jugo/aceite derivado de distintas especies de limón. Esto ha sido demostrado experimentalmente con una versión de cuatro etapas de extracción a nivel laboratorio usando limón mexicano [2] y con una versión de cinco etapas a nivel piloto usando limón persa [3,4]. Aun no se ha explorado a fondo el rendimiento de dicho sistema, tampoco la posibilidad de aumentar su funcionalidad. Una manera económica de analizar su potencial es mediante la simulación del proceso de destilación [5], sin embargo no se cuenta con un modelo matemático que lo describa y la termodinámica de la emulsión aun no es bien comprendida. En un estudio previo se demostró la posibilidad de simular el sistema de cuatro etapas, utilizando los datos experimentales a partir de soluciones modelo de los componentes del aceite esencial del limón mexicano [6]. El objetivo del presente trabajo es utilizar el simulador Aspen plus con la extensión Rate-Based Distillation, asi como sus herramientas gráficas y numéricas para establecer los aspectos termodinámicos y matemáticos que modelan el proceso efectuado con el sistema de cinco etapas, usando los datos experimentales de literatura correspondientes a la emulsión jugo/aceite de limón persa.

METODOLOGÍA

Análisis gráfico

Para representar la emulsión jugo/aceite de limón persa, se seleccionaron los componentes δ-limoneno, γ-terpineno, α-terpineol, β-pineno, α-pineno y agua. Se seleccionó UNIQUAC como modelo de coeficiente de actividad líquida, los parámetros de interacción binaria para el subsistema α-pineno/ δ-limoneno se tomaron de la base de datos de Aspen Plus. Los parámetros para los subsistemas β-pineno/α-pineno, agua/α-pineno y α-terpineol/α-pineno se obtuvieron por regresión a partir de datos experimentales en literatura [7,8,9,10]. Para los subsistemas binarios restantes se utilizó el método UNIFAC. Con la herramienta Conceptual Design se realizó un análisis topológico termodinámico para el subsistema agua/δ-limoneno/γ-terpineno, ya que δ-limoneno y γ-terpineno forman cerca del 90% del aceite esencial.

Simulación

La simulación del proceso se llevó a cabo mediante el diagrama de flujo en Aspen Plus que se muestra en la Figura 1, cada etapa de extracción está formada por un bloque RateFrac (rectificador de dos etapas incluyendo el condensador), un bloque Decant (decantador) y un Split (divisor de corriente). Además se agregó un bloque HeatX (intercambiador de calor) y válvulas, estas últimas para futuras simulaciones dinámicas. La alimentación (emulsión jugo/aceite) entra al intercambiador de calor para después ingresar a la etapa 1, el vapor se inicia distribuyendo a partir de la etapa 5. En la etapa 1 se pone en contacto la alimentación con el vapor, se efectúa el arrastre, el destilado se condensa y las fases se separan en el decantador, obteniendo en la parte superior el aceite esencial. En la siguiente etapa, el residuo de la etapa anterior se pone en contacto con vapor nuevo y el proceso se repite. El residuo final se manda al intercambiador de calor.

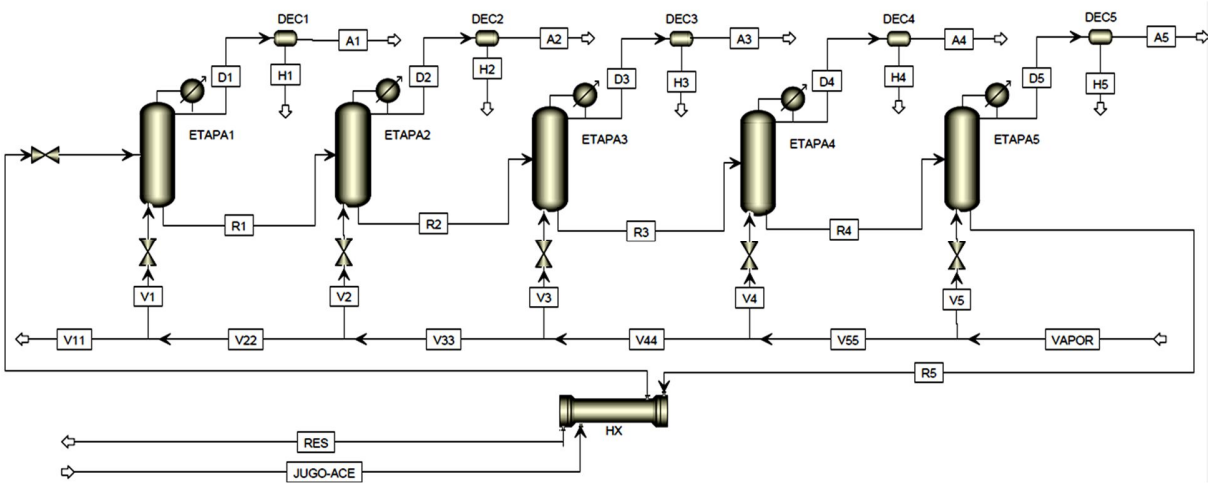


Figura 1. Diagrama de flujo en Aspen Plus®.

Se corrieron tres simulaciones de acuerdo a los datos experimentales reportados en [3,4] que se muestran en la Tabla 1. Ya que los datos no mencionan nada sobre la distribución del vapor, en el diagrama de flujo se movieron los divisores de vapor buscando un rango adecuado de composición del aceite esencial. Las especificaciones para el modelo basado en velocidad (o de no equilibrio) se muestran en la Tabla 2. Se eligió la correlación de Chan and Fair para el cálculo de los coeficientes binarios de transferencia de masa.

Tabla 1. Valores de flujos para las simulaciones.

Corridas	Vapor (kg/h)	Alim. (kg/h)	Dest. por etapa (kg/h)	Dest. total/Alim.
1	6.46	15.56	0.623	0.200
2	10.12	15.56	1.868	0.600
3	9.85	15.56	1.245	0.400

Tabla 2. Especificaciones para el modelo de no equilibrio.

Correlaciones	Convergencia	Dimensiones de etapa	Otros
Masa: Chan and Fair (RateFrac) Calor: Chilton y Colburn Área interfacial: Zuiderweg	Num. Max. de iteraciones: 199 Método de estabilización: Line-Search	Diámetro = 0.1m Altura = .2m	Patrón de flujo mezclado Platos perforados Resistencia a la transferencia de masa en la fase líquida y en la fase vapor

RESULTADOS

Análisis gráfico

En la Figura 2 se muestra el espacio de composición para el subsistema agua/δ-limoneno/γ-terpineno, el entorno de dos fases líquidas (en amarillo) cubre prácticamente todo el espacio. El subsistema presenta dos heteroazeótropos de ebullición mínima, que a su vez generan una frontera de destilación dividiendo el espacio en dos regiones de destilación. En la región I las curvas de residuo inician en el nodo inestable agua/δ-limoneno, algunas curvas se aproximan al punto de silla en el δ-limoneno, otras al punto agua/γ-terpineno y después se dirigen al nodo estable en γ-terpineno. En la región II el comportamiento es similar, aquí el nodo estable es el agua.

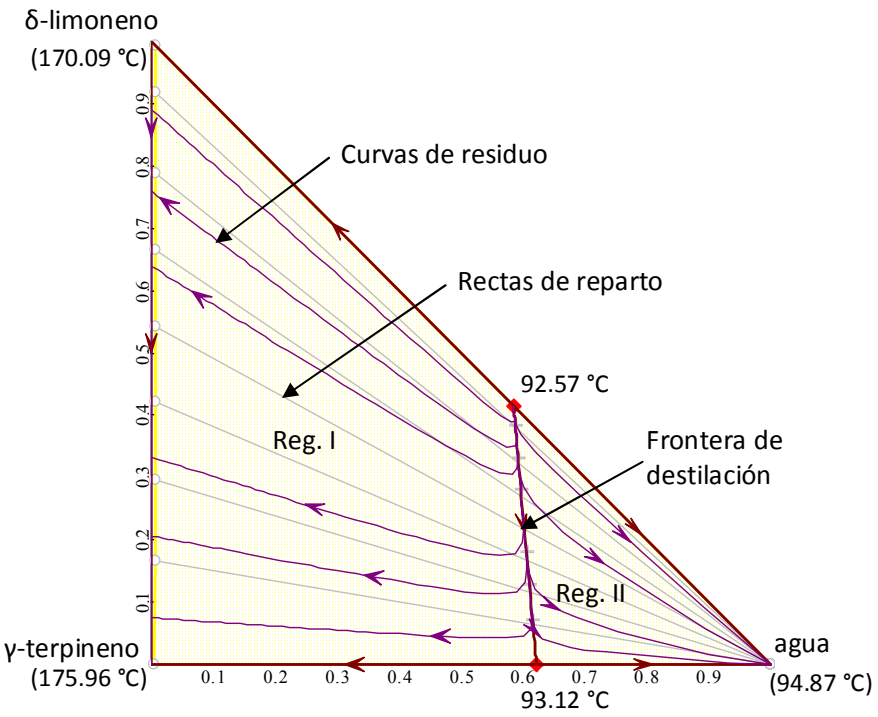


Figura 2. Espacio de composición del subsistema agua/δ-limoneno/γ-terpineno.

Simulación del proceso

En la Figura 3 se presentan los perfiles de composición (en base masa) del aceite esencial obtenidos por simulación comparados con los datos experimentales reportados en literatura para las tres corridas. Se puede observar que la simulación describe apropiadamente los perfiles experimentales para las tres corridas. En la etapa 1, para el caso del δ-limoneno y las tres corridas, existe un pico muy pronunciado en las simulaciones similar a los perfiles experimentales. Para el caso del γ-terpineno, el proceso real no presenta este fenómeno, pero las simulaciones si lo predicen. La Figura 4 muestra la representación de la corrida 2 en el espacio de composición. En la región II se encuentran las composiciones del destilado D a partir de la etapa 2 (la etapa 1 queda fuera del acercamiento), en cada punto se traza una recta de reparto y se sigue hasta el acercamiento en la región I, ahí se observan las composiciones X del aceite esencial para cada etapa, estos puntos se encuentran cerca de los puntos predichos por las rectas de reparto y siguen la misma tendencia.

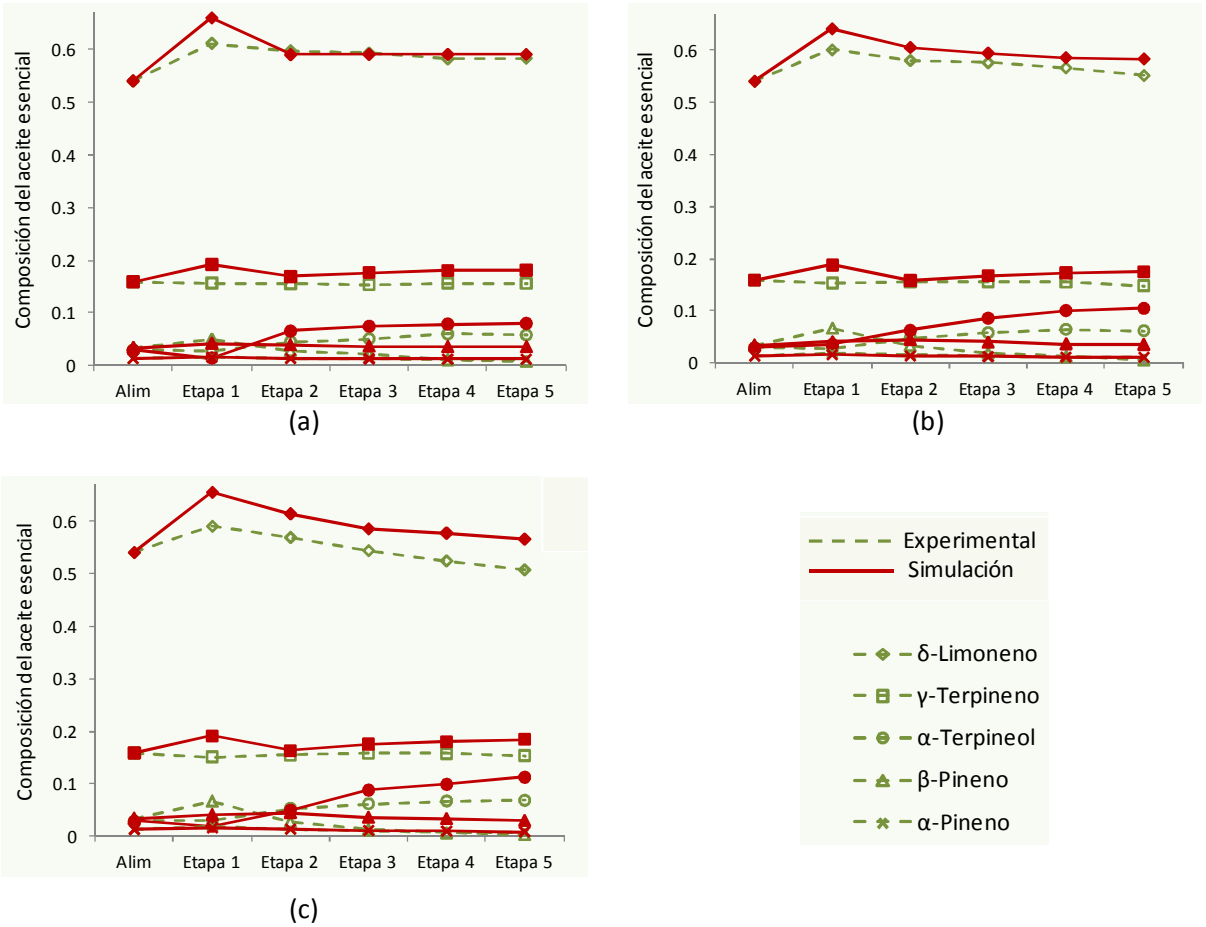


Figura 3. Perfiles de composición del aceite esencial, simulación y datos experimentales: (a) corrida 1; (b) corrida 2; (c) corrida 3.

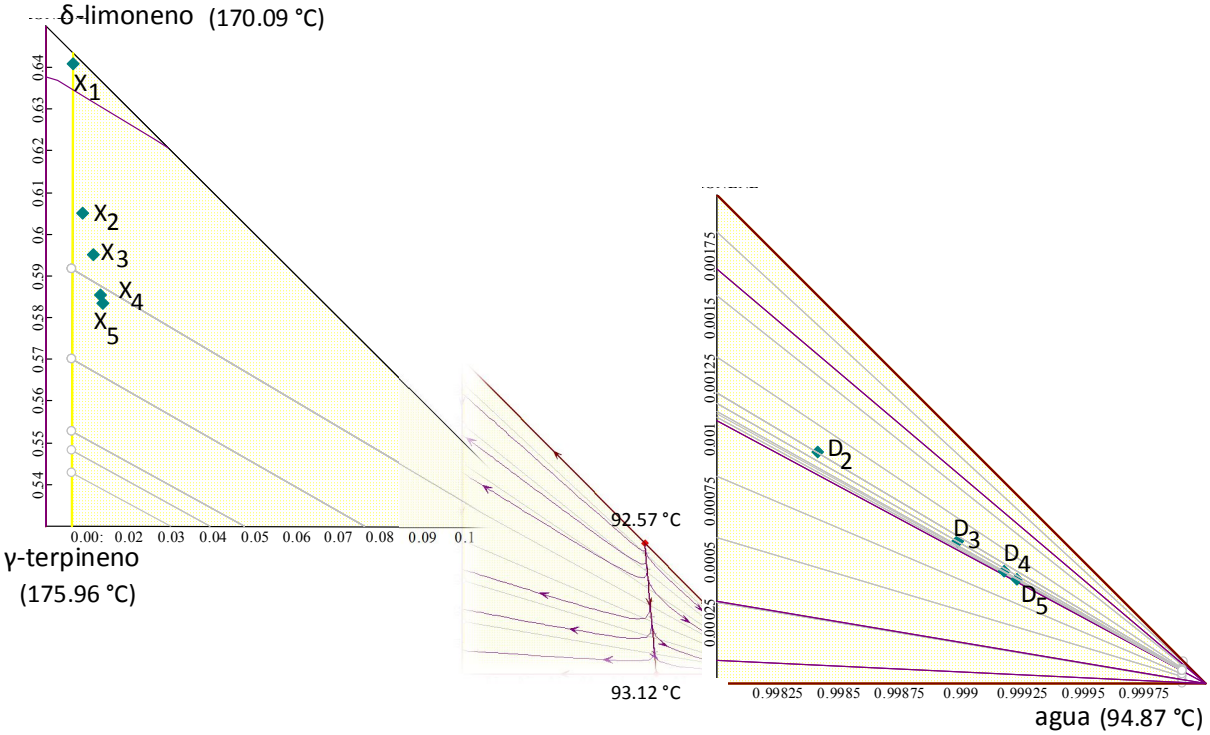


Figura 4. Composiciones del destilado y del aceite esencial en el espacio de composición, corrida 2.

DISCUSIÓN

La composición de la emulsión jugo/aceite del limón persa caería en la región II de la Figura 3. De acuerdo a la figura, existe una frontera de destilación que no puede ser superada por destilación ordinaria, sin embargo al observar las rectas de reparto, es evidente que mediante la destilación por arrastre de vapor, un destilado de composición cercana al borde agua/δ-limoneno lleva a un aceite esencial con alto contenido en δ-limoneno. Por el contrario, un destilado de composición cercana al borde agua/γ-terpineno lleva a un aceite esencial con bajo contenido en δ-limoneno, lo que podría significar el aumento en la concentración de γ-terpineno o algún componente minoritario. Además, cuando las composiciones de los destilados caen en una misma recta de reparto, o en rectas muy juntas, la composición del aceite esencial permanecerá aproximadamente constante a lo largo de las etapas. Esto se puede ver en la Figura 4, en la región II los destilados caen en rectas de reparto muy cercanas entre ellas, lo que lleva al comportamiento observado en los perfiles de la Figura 3 para el δ-limoneno y γ-terpineno. Los perfiles obtenidos por simulación indican que el modelo de no equilibrio es el indicado para describir el proceso, ya que según las Figuras 3(a)-(b), los perfiles de composición reproducen de manera aceptable los datos experimentales. En general, el aceite esencial obtenido en cada etapa tiene aproximadamente la misma composición, por lo tanto, si se desean diferentes perfiles, la simulación junto con la herramienta gráfica es una manera factible de evaluar cambios en el sistema de destilación.

CONCLUSIONES

El modelo UNIQUAC y los parámetros de interacción binaria utilizados describen adecuadamente el equilibrio vapor-líquido-líquido de la emulsión jugo/aceite de limón persa. El espacio de composición

obtenido permite comprender la naturaleza termodinámica de la emulsión y visualizar el proceso de obtención de aceite esencial de esta especie de limón. El modelo riguroso de no equilibrio (o basado en velocidad) con las especificaciones de la Tabla 2 describe los resultados experimentales reportados en la literatura. En particular, la correlación de transferencia de masa de Chan and Fair es adecuada para el equipo de destilación. La simulación en Aspen Plus del proceso de destilación por arrastre de vapor, junto con el análisis termodinámico, es una herramienta útil para estudiar y comprender el comportamiento del sistema de destilación desarrollado en CIATEJ y abre la posibilidad para futuros estudios más complejos.

AGRADECIMIENTOS
Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca No. 484726 otorgada para realizar mis estudios de maestría.

REFERENCIAS

[1] Padilla, J.D., Vega, H., Alba, A., Rodríguez, E., (2011). Sistema multifuncional de destilación, evaporación y extracción de moléculas orgánicas derivadas de productos naturales. 1434 mx/a/2011/013248 (solicitud de patente).

[2] Padilla, F. J., (2007). Estudio de un nuevo proceso de destilación fraccionada por arrastre de vapor en un prototipo para la obtención de los aceites esenciales integrados al jugo de limón mexicano. (Tesis doctoral, Universidad de Guadalajara).

[3] Manzano, M.D., (2010). Destilación en continuo por arrastre de vapor para la obtención de aceite destilado de limón persa (*Citrus latifoia*). (Tesis de licenciatura, Universidad de Guadalajara).

[4] Gómez, J.R., (2010). Caracterización fisicoquímica de fracciones volátiles de aceite esencial de limón persa (Citrus latifoia) destilado en continuo por arrastre de vapor. (Tesis de licenciatura, Universidad de Guadalajara).

[5] Seider, W.D., Seader, J.D., Lewin, D.R., Widago, S., (2009). Product and Process Design Principles. Synthesis, Analysis, and Evaluation. (3rd Edition). John Wiley & Sons. 358-359.

[6] Andrés, O., Padilla, J.D., García, J.P., (2014). Simulación de la destilación por arrastre de vapor del jugo de limón mexicano con un modelo de no equilibrio. XXXV Encuentro nacional de la AMIDIQ. Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química. 3705-3710.

[7] Rodrigues, M. F., Bernardo, M. G., (1995). Vapor-liquid equilibrium of binary mixtures of limonene with α-pinene and β-pinene at reduced pressures. Journal of Chemical & Engineering Data 40 (6), 1193–1195.

[8] Rodrigues, M. F., Bernardo, M. G., (1996). Vapor-liquid equilibrium data of α-pinene +-pinene + β-limonene at 80 kpa and 101 kpa. Journal of Chemical & Engineering Data 41 (3), 581–585.

[9] Utami, H., Roto, S., Sediawan, W. B., (2013a). Liquid-liquid equilibrium for system composed of α-pinene, β-terpineol and water. International Journal of Chemical Engineering and Applications 4, 21–25.

[10] Utami, H., Roto, S., Sediawan, W. B., (2013b). Liquid-liquid equilibrium for the binary mixtures of α-pinene + water and α-terpineol + water. World Academy of Science, Engineering and Technology 78, 896–899.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

FREE SOFTWARE FOR RESEARCH AND EDUCATION IN CHEMICAL ENGINEERING: GNU OCTAVE AND SCILAB

(Software libre para investigación y educación en ingeniería química: GNU Octave y Scilab)

Oswaldo Andrés Martínez[ab]*, José Daniel Padilla de la Rosa[b]

[a] Departamento de Ingeniería Química. Universidad de Guadalajara. Blvd. Marcelino García Barrágan No. 1421. Guadalajara, Jal., C.P. 44430. México.
[b] Tecnología Alimentaria, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. Av. Normalistas 800. Col. Colinas de la Normal C.P. 44760 Guadalajara, Jalisco, México.

*Autor que presentará trabajo:
Autor para correspondencia: oswal.andres@hotmail.com

Área del Conocimiento: Ingeniería química.

ABSTRACT
There are several software for scientific computing in Chemical Engineering, for both education and research. Most of them belong to proprietary software category, such as Matlab, Mathematica and Maple. Using proprietary software has some limitations, mainly regarding the license cost and restrictions. Fortunately, there are alternatives that have all the advantages of being free/open source software in addition to being free of charge. Two of them are GNU Octave and Scilab. In order to analyze the capability of these languages to aid the chemical engineer in solving problems that involve scientific computing, particularly numerical calculation, in this work, three example problems programmed in GNU Octave and Scilab are shown. The first one has an educational approach (McCabe-Thiele method for binary distillation). The second example shows a dynamic simulation applied to a real process (caffeine extraction). Finally, in the third example a partial differential equation that commonly appears in different chemical engineering areas is solved. It was found that the three problems addressed can be efficiently solved in GNU Octave and Scilab. This result suggests that it's feasible to use free/open source software as alternative to the proprietary packages for education and research in chemical engineering. The differences between each programming language used here are also discussed, and the generated files are available to anyone who wants reproduce the calculations.

Keywords: Free/Open source software; scientific computing; numerical calculation; Octave; Scilab.

RESUMEN
Existen varios software para computación científica en ingeniería química, para educación e investigación. La mayoría de ellos pertenecen a la categoría de software privativo, tales como Matlab, Mathematica y Maple. El uso de software privativo tiene algunas limitaciones, principalmente respecto a los costos y restricciones de las licencias. Afortunadamente existen alternativas que tienen todas las ventajas de ser software libre/código abierto además de ser gratuitos. Dos de ellos son GNU Octave y Scilab. Con el objetivo de analizar la capacidad de estos paquetes para ayudar al ingeniero químico en la resolución de problemas que involucran computación científica, particularmente cálculo numérico, en este trabajo se muestran tres problemas de ejemplo programados en GNU Octave y Scilab. El primero

tiene un enfoque educativo (método de McCabe-Thiele para destilación binaria). El segundo ejemplo muestra una simulación dinámica aplicada a un proceso real (extracción de cafeína). Finalmente, en el tercer ejemplo se resuelve una ecuación diferencial parcial que aparece comúnmente en diferentes áreas de ingeniería química. Se encontró que los tres problemas tratados se pueden resolver eficientemente en GNU Octave y Scilab. Este resultado sugiere que es factible el uso de software libre/código abierto como una alternativa a los paquetes privativos para la educación e investigación en ingeniería química. Se discute además las diferencias entre cada lenguaje de programación utilizado aquí y los archivos generados se encuentran disponibles para quien desee reproducir los cálculos.

Palabras Clave: Software libre/código abierto; computación científica; cálculo numérico; Octave; Scilab.

INTRODUCCIÓN

Parte del currículum del ingeniero químico es el uso de software para diferentes actividades, entre las que se encuentra la computación científica aplicada a la resolución de distintos tipos de problemas. Algunas compañías han desarrollado software comercial con grandes capacidades que permiten al ingeniero químico, desde el salón de clases hasta el laboratorio, calcular, graficar, simular y expresar sus resultados. Una característica común entre estos programas es que no permiten acceso al código fuente, por lo que se les conoce como software de propiedad o privativo [1]. Ejemplos de lenguajes simbólicos son Mathcad (http://www.ptc.com/), MAPLE (http://www.maplesoft.com/), Mathematica (http://www.wolfram.com/) y de lenguaje especializado MATLAB (http://www.mathworks.com/). Este último es el más popular y utilizado en ingeniería química [2]. Sin embargo, existen desventajas importantes en el uso de software privativo. Una de ellas es el alto costo de las licencias, esto le impide el acceso al software a muchas instituciones educativas y de investigación [3,4]. Otra desventaja es la dependencia que genera el lenguaje, el cual es totalmente controlado por la compañía que lo desarrolla, quedando el usuario vulnerable ante cambios repentinos, tales como cambio de sintaxis, restricciones y aumento del costo de la licencia, y la eliminación de soporte para ciertas plataformas [5]. Afortunadamente, existe software denominado “libre” que en años recientes se ha vuelto popular entre usuarios finales, compañías, instituciones de educación y de investigación en distintos países [6,7]. El término “libre” se refiere a que el usuario tiene la libertad de ejecutar para cualquier propósito, copiar, distribuir, estudiar y mejorar el software; el acceso al código fuente es condición indispensable para esto [8]. Esta libertad es independiente del costo (que muchas veces es gratuito), y ha permitido el desarrollo de software para computación científica, particularmente cálculo numérico. Dos ejemplos de lenguaje especializado en esta categoría son GNU Octave (https://www.gnu.org/software/octave/) y Scilab (http://www.scilab.org/), que además de ser gratuitos, poseen capacidades suficientes para ser alternativas factibles al software comercial [9,10,11]. Existe muy poca difusión del software libre en ingeniería química, a pesar de que GNU Octave se desarrolló para solución de problemas con reactores químicos [12]. El objetivo de este trabajo es demostrar cómo GNU Octave y Scilab pueden ser usados para resolver distintos problemas en ingeniería química, que van desde lo didáctico a lo aplicado. Se discuten las estrategias para resolver tres problemas de ejemplo así como las diferencias entre cada lenguaje de programación.

METODOLOGÍA

2.1 Características del software

En la Tabla 1 se muestra las especificaciones de GNU Octave y Scilab, ambos se corrieron en el sistema Linux 3.13.0-63, versión #103-Ubuntu. Sin embargo se pueden instalar en Windows y Mac OS también.

Tabla 1. Especificaciones de cada paquete.

	GNU Octave	Scilab
Licencia	GPL	CeCILL
Versión	4.0.0	5.5.2
Editor de texto	Emacs 23	Scinotes

2.2 Resolución de problemas

A continuación se describen brevemente los problemas abordados. Se muestra también un fragmento de código para cada software donde se destaca algún cálculo y se agregaron notas para explicar algunas líneas. Los códigos completos se encuentran en el material suplementario al final así como los detalles de cada problema.

Destilación de una mezcla de benceno y tolueno. Este problema está adaptado del Ejemplo 7.1 del libro de Seader y col. [13]. Se trata de calcular gráficamente el número de etapas de equilibrio usando el muy bien conocido método de McCabe-Thiele. Una parte del método es calcular la intersección entre la línea de operación de la sección de rectificación y la línea-q de alimentación. Esto se realiza con un "buscador de raíces" que en GNU Octave y Scilab son las funciones fzero y fsolve respectivamente. La primera función requiere más datos de entrada que la segunda como se muestra en los fragmentos.

```
% ===== Fragmento del código McCabeThiele.m en GNU Octave =====
% Cálculo de la intersección entre la línea de alimentación y la línea-q
function f = int_qop(y,alpha,zf,q,mq,mopr,xD,R)   % Definición de la ecuación no lineal
  f = xq(y,alpha,zf,q,mq) - xopr(y,mopr,xD,R);
endfunction
yqop = fzero(@(y)int_qop(y,alpha,zf,q,mq,mopr,xD,R),0.5); % Obtención del punto en y
xqop = xopr(yqop,mopr,xD,R); % Obtención del punto en x
```

```
// ===== Fragmento del código McCabeThiele.sce en Scilab =====
// Cálculo de la intersección entre la línea de alimentación y la línea-q
function f = int_qop(y,alpha,zf,q,mq,mopr,xD,R) // Definición de la ecuación no lineal
  f = xq(y,alpha,zf,q,mq) - xopr(y,mopr,xD,R);
endfunction
yqop = fsolve(0.5,int_qop); // Obtención del punto en y
xqop = xopr(yqop,mopr,xD,R); // Obtención del punto en x
```

Extracción de cafeína. Espinoza y col. [14] propusieron un modelo para la cinética de la cafeína durante la extracción sólido-líquido de granos de café. Obtuvieron un sistema de dos ecuaciones diferenciales parciales considerando geometría rectangular. Las ecuaciones fueron discretizadas en las coordenadas espaciales resultando un sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias con valores iniciales. El sistema en forma matricial es d**x**/dt = **Ax**, cuya solución está dada por **x**(t) = **x**(0)exp(**A**t). Los autores simularon la ecuación anterior con la rutina de matriz exponencial en MATLAB y el método trapezoidal para integrar la evolución de la cafeína sobre el volumen del grano de café. GNU Octave y Scilab contienen la función expm para la matriz exponencial y trapz e inttrap para la integración respectivamente. La matriz **A** tiene forma esparcida y se puede almacenar como tal para ahorrar tiempo cuando se elige un número grande de nodos, en este caso la matriz **A** es de 100x100. En los siguientes fragmentos se muestra la solución del sistema de ecuaciones y la integración de evolución de la cafeína. En el caso de Scilab la función

expm aún no acepta matrices esparcidas, por lo que se aplicó el comando full para llenar con ceros los espacios vacíos.

```
% ===== Fragmento del código caffeinek.m en GNU Octave =====
x0 = 6.5*ones(N,1);  x0(N,1) = 0; Cb = []; Cbp = []; % Valores iniciales
DL = linspace(0,L,N-1);   % Puntos espaciales para la integración
i = 1;  % Iniciación
for t = 0:.1:6   % Vector tiempo
  Cb = [Cb expm(t*A)*x0];     % Solución del sistema
  Cbp = [Cbp trapz(DL',Cb(1:N-1,i))];   % Integración
  i++;
end
```

```
// ===== Fragmento del código caffeinek.sce en Scilab =====
x0 = 6.5*ones(N,1);  x0(N,1) = 0; Cb = []; Cbp = [];  // Valores iniciales
DL  = linspace(0,L,N-1);  // Puntos espaciales para la integración
i = 1;   // Iniciación
for t = 0:0.1:6  // Vector tiempo
   Cb  = [Cb expm(t*full(A))*x0];   // Solución del sistema
   Cbp = [Cbp inttrap(DL',Cb(1:N-1,i))];  // Integración
   i = i+1;
end
```

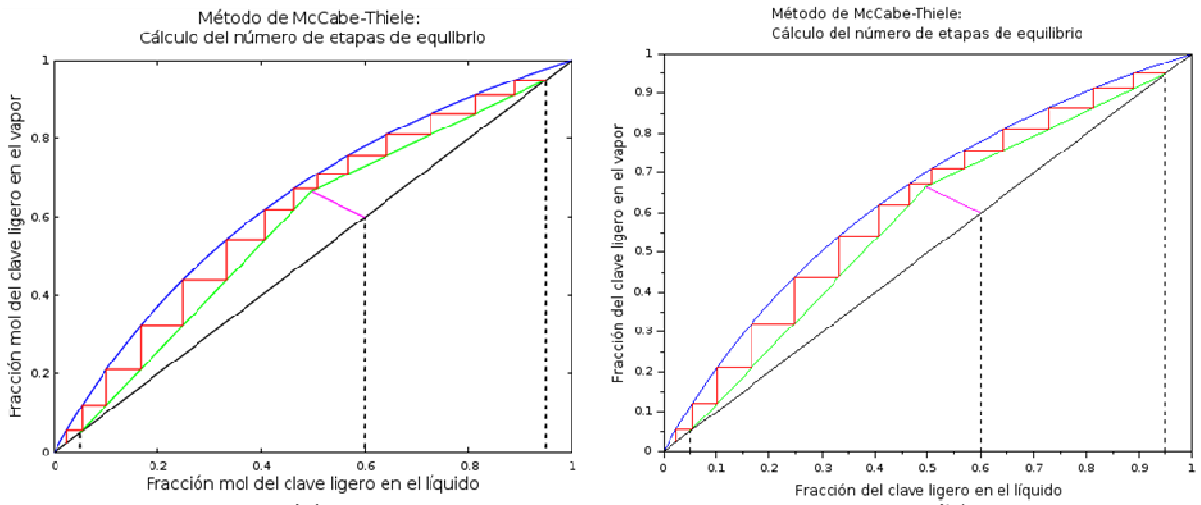
Difusión molecular. Azizi y col. [15] estudiaron experimentalmente la absorción del propileno en N-metil pirrolidona y propusieron un modelo partiendo de la segunda ley de Fick y la ley de Henry, obteniendo la clásica forma de la ecuación de difusión $\partial \psi / \partial t = D(\partial^2 \psi / \partial z^2)$. Esta ecuación se puede discretizar en la coordenada espacial z, similar al problema anterior, generando un sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias con valores en las fronteras. El sistema tiene la forma d**x**/dt = **Ax** + **B** que se puede resolver con una rutina Runge Kutta. Normalmente en casos como este las matrices **A** y **B** son esparcidas, en los fragmentos de código siguientes se observa cómo se define **A**.

```
% ===== Fragmento del código DifPropileno.m en GNU Octave =====
% Matriz A
A = spalloc(N-1,N-1,3*(N-1));  % Matriz esparcida
dpa = -2*lambda*ones(N-1,1);  % Diagonal principal
supda = lambda*ones(N-1,1);  % Diagonal superior
subda = supda;                    % Diagonal inferior
A = spdiags([subda,dpa,supda],-1:1,N-1,N-1);
A(1,1) = (-2+alpha1)*lambda;   % Elemento (1,1)
A(N-1,N-1) = (beta1-2)*lambda;   % Elemento (N-1,N-1)
spy(A)    % Visualización de los elementos no nulos
```

```
// ===== Fragmento del código DifPropileno.sce en Scilab =====
// Matriz A
dp = sparse(diag(-2*lambda*ones(N-1,1)));     // diagonal principal
supd = sparse(diag(lambda*ones(N-2,1),1));   // diagonal superior
subd = sparse(diag(lambda*ones(N-2,1),-1));  // diagonal inferior
A = dp+supd+subd;
A(1,1) = (-2+alpha1)*lambda; // Elemento (1,1)
A(N-1,N-1) = (beta1-2)*lambda;  // Elemento (N-1,N-1)
PlotSparse(A);  // Visualización de los elementos no nulos
```

RESULTADOS

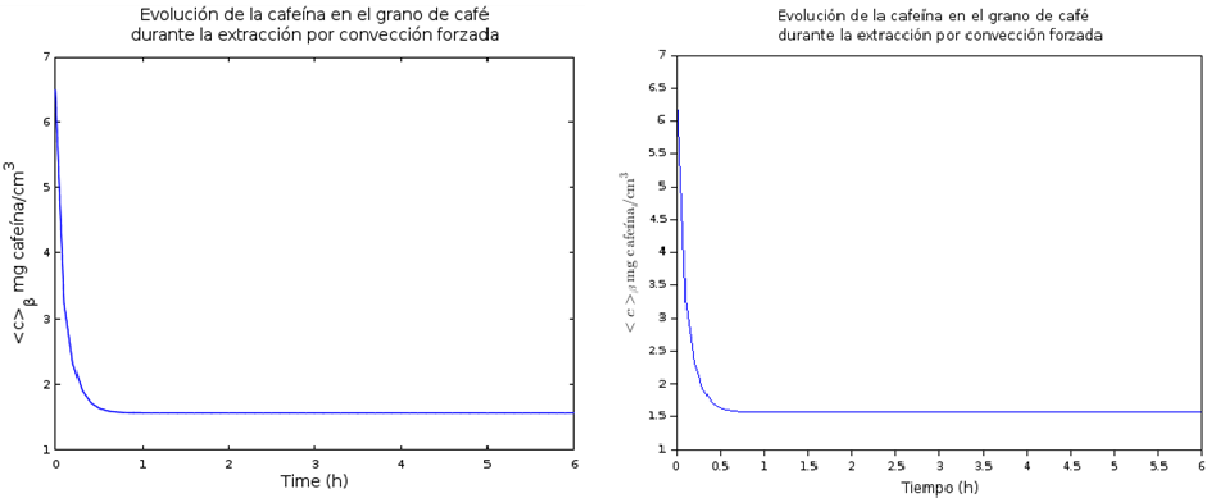
Destilación binaria, método de McCabe-Thiele. En la Figura 1 se muestra la gráfica de McCabe-Thiele obtenida con GNU Octave y con Scilab para el sistema benceno/tolueno. Ambas gráficas son generadas automáticamente por sus respectivos códigos, estos permiten al usuario cambiar los valores de los parámetros del problema y el programa calcula el número de etapas y la etapa óptima de alimentación.



(a) (b)

Figura 1. Gráficas de McCabe-Thiele para el problema de destilación. (a) GNU Octave; (b) Scilab.

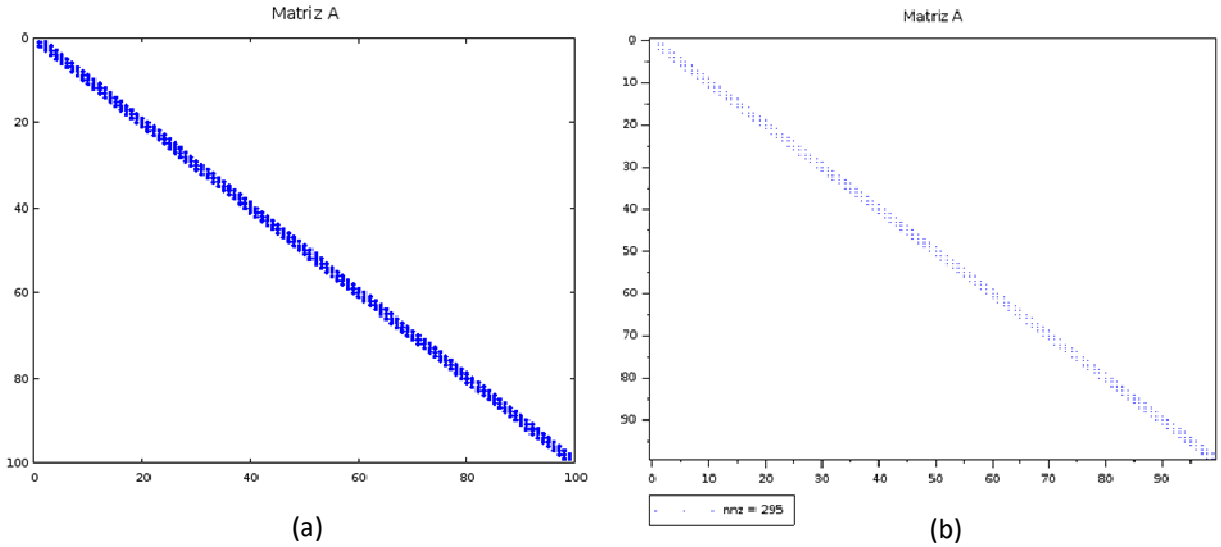
Extracción de cafeína. En la Figura 2 se observa el resultado de la simulación de la cinética de extracción de la cafeína. Las gráficas de ambos lenguajes coinciden con la que presenta Espinoza y col. [14]. El contenido de cafeína en el grano disminuye rápidamente y alcanza el estado estacionario en una hora.



(a) (b)

Figura 2. Simulación de la extracción de cafeína. (a) GNU Octave; (b) Scilab.

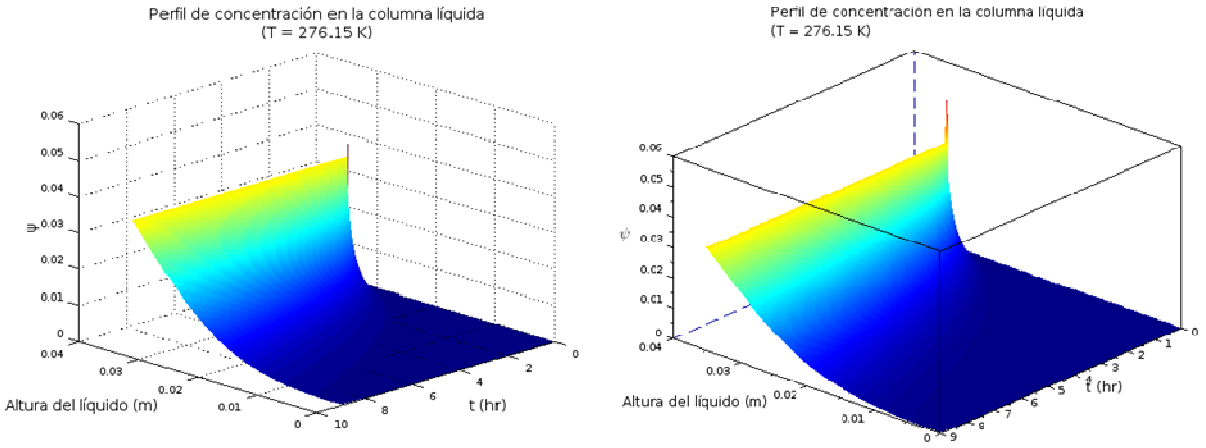
Ecuación de difusión. En la Figura 3 se encuentra la visualización de los elementos no nulos de la matriz esparcida **A** para cada lenguaje. Se puede notar que la matriz es de 100x100 y que cada fila contiene a lo mucho tres elementos no nulos. Scilab además imprime el número total de estos elementos.



(a) (b)

Figura 3. Elementos no nulos de la matriz esparcida **A**. (a) GNU Octave; (b) Scilab.

La solución de la ecuación de difusión está graficada en tres dimensiones en la Figura 4 para cada lenguaje, el resultado coincide con el de Azizi y col. [15]. Para cada tiempo t, el perfil de concentración adimensional del propileno se comporta de manera similar con respecto a la altura de líquido de N-metil pirrolidona.



(a) (b)

Figura 4. Solución de la ecuación de difusión para el problema de la absorción de propileno. (a) GNU Octave; (b) Scilab.

DISCUSIÓN

En los fragmentos de código se observa que la sintaxis de GNU Octave es muy parecida a la de MATLAB, el usuario familiarizado con el segundo probablemente notó esta similitud. Esto sugiere que una migración de MATLAB a Octave no presentaría dificultades importantes en cuanto a la sintaxis. En el caso de Scilab, esta diferencia puede ser ligeramente más pronunciada. Sin embargo, Scilab contiene una herramienta para transformar ficheros de MATLAB a Scilab. Los resultados para cada uno de los problemas abordados son prácticamente los mismos para GNU Octave y para Scilab. La programación del método de McCabe-Thiele permite al usuario entender la estrategia de solución y observar cómo funciona ya sea manipulando el código y adaptándolo o mediante una interfase. La simulación de la extracción de cafeína muestra una manera sencilla de resolver un sistema de ecuaciones diferenciales a partir de una discretización espacial. Además se demuestra que ambos lenguajes poseen herramientas suficientes para ser aplicados en un proceso real. La solución de la ecuación de difusión aplicada a un proceso de absorción muestra que ambos lenguajes pueden almacenar matrices esparcidas, esto es una práctica común para ahorrar memoria computacional y efectuar los cálculos en menor tiempo. Como se puede apreciar en la solución del tercer problema, tanto GNU Octave como Scilab son capaces de generar gráficas en tres dimensiones con muchas opciones de personalización, además se pueden rotar, acercar y alejar. En las Figuras 3 y 4 queda claro que en ambos lenguajes se permite el código LaTeX para escribir letras griegas, incluso es posible escribir una ecuación en los ejes o sobre las gráficas. En general los dos lenguajes dan los mismos resultados para cada problema abordado, con algunas diferencias en el uso de las funciones y en la sintaxis.

CONCLUSIONES

Los tres problemas abordados se resolvieron eficientemente en GNU Octave y Scilab, ya que contienen suficientes herramientas numéricas y gráficas para resolver problemas como los presentados en este trabajo, tanto académicos como aplicados. Las diferencias en la sintaxis se presentan particularmente en las funciones. Las capacidades de ambos lenguajes, para obtener y representar resultados, los convierten en una alternativa factible y económica al software comercial para resolver problemas que involucran cálculo numérico en diferentes áreas de la ingeniería química.

Material suplementario. En el siguiente enlace se pueden descargar los códigos utilizados para resolver cada problema en cada lenguaje. Además se incluyen detalles de los problemas. URL: https://dl.dropboxusercontent.com/u/57304764/SoftLibreIQ_files.rar

REFERENCIAS

[1] Free Software Foundation, (2015). “Proprietary Software Is Often Malware”. Fecha de consulta: 22-06-2015. URL: http://www.gnu.org/proprietary/proprietary.en.html.

[2] Martín, M., De-Juan, L.M., (2015). “MATLAB for Chemical Engineering”, en Introduction to Software for Chemical Engineers (Martín, M. Ed.). CRC Press, Taylor & Francis Group. 91-100.

[3] Anna, I.K., John M.H., Filipp, F., Martin, H.G., Peter, J.K., Roland, L., Frederick, R.M., Peter, P., Chris-Kriton, S., and Hans-Joachim, W., (2015). “What Is the Price of Open-Source Software?” J. Phys. Chem. Lett., 6 (14), 2751–2754.

[4] Miscione, G., Gordon, D., Johnston, K., (2008). “Free and open source software in low-income countries: emergent properties?”. IFIP International Federation for Information Processing Vol. 282,

Social Dimensions of Information and Communication Technology Policy. Chrisanthi Avgerou, Matthew L. Smith, Peter van den Besselaar; (Boston: Springer), 351–355.

[5] Alsberg, B.K., Hagen, O.J., (2006). "How octave can replace Matlab in chemometrics". Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems 84, 195–200.

[6] Van-Rooij, S.W., (2007). "Open Source software in US higher education: Reality or illusion?". Educ. Inf. Technol. 12,191–209.

[7] Gallego, M.D., Bueno, S., Racero, F.J, Noyes, J., (2015). "Open source software: The effects of training on acceptance". Computers in Human Behavior 49, 390-399.

[8] Stallman, R.M, (2004). Software libre para una sociedad libre. (Jaron Rowan, Diego Sanz Paratcha y

Laura Trinidad trad.). Traficantes de Sueños, 59-60.

[9] Glavelis, T., Ploskas, N., Samaras, N., (2010). "A computational evaluation of some free mathematical software for scientific computing". Journal of Computational Science 1, 150–158.

[10] Sharma, N., Gobbert, M.k., (2010). "A comparative evaluation of matlab, octave, freemat, and scilab for research and teaching". Technical Report HPCF.

[11] Adilson, J.A., Oliveira, L.C., (2005). "Free software for chemical engineer's educational needs". 2nd Mercosur Congress on Chemical Engineering and 4th Mercosur Congress on Process Systems Engineering. ENPROMER.

[12] Eaton, J.W., (2001). "Octave: Past, Present, and Future". TWMCC Technical Report 2001-03.

[13] Seader, J. D., Henley, E. J., Roper, D. K., (2011). Separation Process Principles. Chemical and Biochemical Operations, (3rd Edition). John Wiley & Sons, 259-300.

[14] Espinoza-Pérez J.D., Vargas A., Robles-Olvera V.J., Rodríguez-Jimenes G.C., García-Alvarado M.A., (2007). "Mathematical modeling of caffeine kinetic during solid–liquid extraction of coffee beans". Journal of Food Engineering 81, 72–78.

[15] Azizi, S., Kargari, A., Kaghazchi, T., (2014). "Experimental and theoretical investigation of molecular diffusion coefficient of propylene in NMP". Chemical Engineering Research and Design 92, 1201-1209.



STUDY OF THE FRYING PROCESS PARAMETERS ON THE PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF A SNACK MADE FROM CORNFLOUR ADDED WITH YELLOW PEA FLOUR AND OAT BRAN

(Estudio de los parámetros del proceso de freído sobre las propiedades fisicoquímicas de un alimento tipo botana a base de harina de maíz adicionada con harina de chícharo entero y salvado de avena)

Rogelio Prado-Ramírez[a], Dafnne Monserrat Gudiño García[a,*], Gonzalo E. Jacques Fajardo[a], Enrique Arriola-Guevara[b], Rosa Isela Corona Gonzalez[b], Guadalupe M. Guatemala-Morales[a,+]

[a] Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C., Av. Normalistas # 800, Guadalajara, Jalisco, C.P. 44270, México.
[b] Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Guadalajara, Blvd. Marcelino García Barragán #1421, Guadalajara, Jalisco, C.P. 44430, México.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: gguatemala@ciatej.mx

Área del Conocimiento: Ingeniería Química

ABSTRACT
The objective of this work was to evaluate the effect of the time and temperature on the physicochemical properties of a fried snack made from nixtamalized Minsa® cornflour (HMN), yellow pea whole flour (HC), and oat bran (SA), formulated considering the NOM-086-SSA1-1994 recommendations and hydrated to 47%. The evaluated properties were moisture, colour, bulk density, water absorption index (WAI) and water solubility index (WSI), lipid percentage, hardness, expansion and acceptance. A central composite design 2^2 with 3 center points and star points, and a global acceptance test applying an hedonic scale of 5 points to two hundred people were employed. The analysis showed that density and moisture decreased, while net change colour (ΔE), expansion and WAI increased with the increase of time and temperature. WAI increased due to the starch cooking (gelatinization) and showed a similar behaviour to expansion, which could be attributed to the openning of the amylopectin chains during gelatinization. The lipid percentage was lower at shorter times. Neither WSI nor hardness resulted statistically significant, that could be due to the great structural similarity among the treatments; in general each WSI was very similar to the one of the raw mix, which indicates that there were not considerable damage to the fiber, starch or protein molecules that generate a greater presence of soluble compounds. The sensory analysis showed that the friyed snack at 165 C and 198 s had greater acceptance. Its composition was: proteins, 9.43%; carbohidrates, 58.13%; total dietary fiber 4.18%; and lipids, 28.26%.

Keywords: Frying time, yellow pea flour, physicochemical properties.

EFFECT OF SPRAY-DRYING CONDITIONS ON PHYSICAL PROPERTIES OF AGAVINS FROM *Agave potatorum* Zucc

(Efecto de las condiciones del secado por aspersión sobre las propiedades físicas de las agavinas de *Agave potatorum* Zucc)

Patricia Araceli Santiago García[a*+], Mercedes G. López[b]

[a] Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Oaxaca, C.P. 71230, Hornos 1003, Oaxaca, México.
[b] Departamento de Biotecnología y Bioquímica, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN-Unidad Irapuato, C.P. 36821, Irapuato, Gto., México

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: psantiago@ipn.mx

Área del Conocimiento: Procesos Químicos.

ABSTRACT
The aim of this work was to obtain agavins in powder state from *A. potatorum* Zucc. Based on a full factorial experimental design, the effects of the feed ratio 17-25 mL min^{-1}, atomizer speed (3 or 4 bars), inlet air temperature (120, 100 y 80ºC) and % soluble solids (20, 30 y 40%) on the properties of spray-dried agavins powders were investigated. The results indicate that increasing inlet air temperature increases particle size, average time of wettability, and decreases the bulk density and moisture content of the powder. Increasing atomizer speed results in increasing the bulk density and average time of wettability of powder and decreases the particle size, moisture content and insoluble solids of powder. Increase in feed flow rate increases the bulk density, particle size, and moisture content of the powder and decreases the average time of wettability and insoluble solids of powder. The results showed a product with a moisture content of 2.59 ± 0.18 %, bulk density of 0.46 ± 0.007 gmL^{-1} and yield of 170 g of LPD agavins Kg^{-1} of *Agave potatorum,* contenting 80% and low water activity of 0.2.

Keywords: Fructans; Spray drying; *Agave potatorum* Zucc.

RESUMEN
El objetivo de este trabajo fue obtener fructanos de *A. potatorum* Zucc. en polvo. Para lo cual se evaluaron los efectos del flujo de alimentación 17-25 ml min^{-1}, la velocidad del atomizador (3 o 4 bars), la temperatura del aire de entrada (120, 100 y 80ºC) y el % de sólidos solubles (20,30 y 40%) en las propiedades fisicoquímica. Los resultados indican que el aumento de temperatura del aire aumenta el tamaño de partícula, el tiempo promedio de humectabilidad y disminuye la densidad y el contenido de humedad del polvo. El incremento de la velocidad del atomizador produjo un aumento de la densidad aparente y de la humectabilidad de polvo y disminuyó el tamaño de partícula. Un incremento en la velocidad del flujo de alimentación aumentó la densidad aparente, tamaño de partícula, y el contenido de humedad del polvo y disminuyó el tiempo medio de humectabilidad. Con el secado por aspersión se obtuvo un producto altamente estable con un contenido de humedad de 2.59 ± 0.18%, una densidad

aparente 0.46 ± 0.007 gmL^{-1} y un rendimiento de 170 g de agavinas de alto DP Kg^{-1} de mesontle de *Agave potatorum*, con un contenido de fructanos de 80%, y una actividad de agua de 0.2.

Palabras Clave: Fructanos, secado por aspersión, *Agave potatorum* Zucc.

INTRODUCCIÓN

Los fructanos consisten de una mezcla compleja de fructanos con enlaces β(2-1) y β(2-6) altamente ramificados y con una glucosa terminal o interna [1]. Los fructanos poseen numerosas propiedades nutracéuticas siendo uno de ellos su efecto prebiótico, también tienen usos en la formulación de productos alimenticios, tales como sustitutos de grasa, retenedores de agua y estabilizadores de geles [2]. El secado por aspersión es usado para preservar una amplia variedad de ingredientes y productos alimenticios conservando sus características sensoriales y nutricionales. Es también muy simple y puede ser usado con materiales sensibles al calor ya que la exposición a altas temperaturas son por periodos muy cortos (5-30 segundos). Dadas las ventajas del secado por aspersión y la necesidad de conservar los fructanos de *Agave potatorum*, diferentes tratamientos fueron evaluados para determinar las condiciones óptimas del secado por aspersión para los fructanos de agave extraídos del mesontle de este tipo de agave.

MATERIALES Y MÉTODOS

Plantas de *Agave potatorum* Zucc. fueron jimadas en una parcela de Totolapam, Oaxaca, México. La extracción y purificación de fructanos fue realizada siguiendo la metodología reportada por López, [1].

Secado por aspersión

La deshidratación de las agavinas fue llevada a cabo en un secador por aspersión en paralelo a escala piloto (Niro, modelo mobil) equipado con un atomizador rotatorio (TS-Minor, M02/A). El flujo de alimentación fue controlado con la ayuda de una bomba peristáltica (Watson-Marlow 505S/RL). Las condiciones de secado fueron las siguientes: 3 temperatura del aire de entrada: 120, 100 y 80ºC; 3 temperatura de aire de salida: 100, 80 y 60ºC respectivamente y 3 concentraciones de sólidos solubles (20,30 y 40%) con un flujo de alimentación de 1.76 L/h y una velocidad de atomización de 14,000 rpm.

Características físicoquímicas

Los fructanos secados por aspersión fueron almacenados en contenedores libres de humedad y herméticamente cerrados hasta la evaluación fisicoquímica. Los fructanos secados por aspersión fueron almacenados en contenedores libres de humedad y herméticamente cerrados hasta la evaluación fisicoquímica A.O.A.C [3]. La determinación de color fue evaluando los cambios en L, a, b con un medidor de color Hunter Lab.

RESULTADOS

En la Tabla 1 se muestran las propiedades de los fructanos en polvo de *A. potatorum*, el contenido de humedad del polvo fue inferior al 2% con una Aw de 0.2, lo que asegura la estabilidad del producto seco. Por otro lado, el perfil cromatográfico (TLC) de los fructanos en solución y secado por aspersión fue muy similar, lo que indica que no hubo degradación de los fructanos por el proceso de secado por aspersión

Tabla 1. Características fisicoquímicas de los fructanos en polvo de *A. potatorum*

Parámetro		**Producto**
Humedad (%)		2.59 ± 0.18
Solubilidad (%)		95.00 ± 4.20
Color	**L**	80.05 ± 8.18
	a	0.43 ± 0.02
	b	7.30 ± 1.50
Densidad (g mL^{-1})		0.46 ± 0.007
Fructosa (mg g^{-1})		700.50 ±50.00
pH		4.75 ± 1.34
Actividad de agua		0.20 ± 0.00

DISCUSIÓN

A presiones y temperaturas altas hubo un secado más rápido, el contenido de humedad disminuyó conforme la temperatura y la presión incrementó en el secador debido a que a altas temperaturas hubo una gran transferencia de calor hacia la gota de la solución a secar [4]. El principal carbohidrato de esta planta son los fructanos, desde que el valor de fructosa es alto comparado a especies tales como achicoria (240 mg g^{-1}) lo cual fue corroborado por su perfil cromatográfico**.**

CONCLUSIONES

Los fructanos secados por aspersión mantuvieron el perfil cromatográfico de la muestra fresca en solución y almacenados en recipientes cerrados y en ambientes secos garantizan un producto estable, resistente al crecimiento de microorganismos y descomposición química. El secado por aspersión de fructanos de pencas de *Agave potatorum* es un método rápido y fácil para obtener los fructanos como ingrediente altamente estable para ser usados en la industria de los alimentos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la SIP del Instituto Politécnico Nacional y al Cinvestav-Irapuato por las facilidades otorgadas para llevar a cabo esta investigación.

REFERENCIAS

[1] López, M.G., Mancilla-Margalli, N.A., Mendoza-Diaz, G. (2003). Molecular structures of fructanos from *Agave tequilana* Weber var. Azul. Journal of Agricultural and Food Chemistry **51**, 7835-7840.

[2] Kip, P., Meyer, D. and Jellema, R. Inulin improved sensory and textural properties of low fat yogurts. (2005). International Dairy Journal 16, 1098-1103.

[3] Association of Official Analytical Chemist (AOAC). (1994). Edited by Sidney Williams, 14 editions, USA.

[4] Hutington, D.H. (2004).The influence of the spray drying process on product properties. Drying Tech. **22**, 1261-1287

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

PROTOTYPE DESIGN TO SIMPLIFY THE EXTRACTION OF SAPONINS *Agave tequilana* WEBER VAR. AZUL.

(Diseño de prototipo para la simplificación de la extracción de saponinas de *Agave tequilana* Weber var. azul)

Rafael Rodríguez-Cortés[a*], Marcela de la Mora-Amutio[a], Julia del C. Martínez-Rodríguez[a], Tetsuya Ogura[a]

[a] Departamento de Química, Instituto de Ciencias Exactas y Terrestres (ICET), Universidad Autónoma de Guadalajara (UAG), Av. Patria 1201, Col. Lomas del Valle, CP. 45129, Zapopan, Jalisco, México.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: juliam@edu.uag.mx

Área del Conocimiento: Procesos Químicos.

ABSTRACT
Saponins are high molecular weight glycosides, consisting of a sugar linked to a triterpene or steroid aglycone. Saponins classic definition is based on their surface activity; many saponins have detergent properties and stable foams behave like water. Saponins are industrial and pharmaceutical interest due to their surfactant and antimicrobial properties, and its market price of 6 to $142 per gram depending on its purity. In the industrial process of production of inulin and agave syrup, the waste may contain a considerable amount of saponins because of the massive generation of foam in the water treatment tank, which represents a problem for the treatment of effluents. The objective of this study was to simplify the extraction technique, characterization and quantification of saponins, generated as a byproduct in the process and agave inulin syrup production, in order to generate a fast, reliable and economic method primarily, allowing industry inulin and agave syrup take advantage of their waste. METHODOLOGY: The prototype designed for extracting saponins is a small air pump connected by a hose to a sample container with liquid waste from the production process and inulin syrup to generate foam. This rich in saponins foam passes through a hose with glass beads and foam breaking generate a liquid rich in saponins. Saponins concentration is measured by colorimetry based on the reaction Liebbermann-Burkhardt and characterized by TLC. RESULTS: The saponins can be extracted by a simple method starting from the liquid sample through the generation of foam. The saponins are concentrated in the foam phase and further studies are needed to determine the type of saponin.

Keywords: Saponins; *Agave tequilana* Weber var. *Azul*; Inulin; syrup.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

EVALUATION OF EXTRACTION PROCESS OF CAPSAICINOIDS IN SERRANO PEPPER (*Capsicum annuum*) BY SUPERCRITICAL FLUID EXTRACTION

(Evaluación del proceso de extracción de capsaicinoides de chile serrano (*Capsicum annuum*) mediante CO_2 en condiciones supercríticas)

Gustavo Adolfo Castillo-Herrera[a+*], Rodrigo Mejía-Mancilla[a], Marcos Godoy-Zaragoza[a]

[a] Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.,
Unidad de Tecnología Alimentaria. Camino El Arenero #1227, CP 45019. Col. El Bajío del Arenal, Zapopan, Jalisco, México.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: gcastillo@ciatej.mx

Área del Conocimiento: Procesos Químicos.

ABSTRACT
Currently in the food industry different bioactive compounds of plant sources are obtained, these compounds are obtained from the traditional methods involving the participation of organic solvents, leaving traces in the final products, affecting the quality of the extracts and showing a negative impact over health of consumers, Besides, additional unit operations are required into the process to separate bioactives of interest, which leads to increased energy consumption and increasing costs. In recent decades, the use of an emerging technology such as supercritical fluid extraction, has attracted interest due to short processing times, and do not use organic solvents which is therefore considered a "green" technology, being carbon dioxide the main solvent. In this study, supercritical fluid extraction of capsaicinoids present in serrano pepper (*Capsicum annuum*) was assessed, evaluating how yield of extract and capsaicinoids content were affected by temperature process and pressure process, in order to maximize yield of extract and the content of the two major capsaicinoids present in the serrano pepper (*Capsicum annuum*). Serrano pepper came from Sinaloa State, which was dried at 60 ° C and ground prior to extraction. Serrano pepper powder was used immediately for the supercritical extraction where two factors in two levels were considered, temperature (50 to 60 ° C), and pressure (25.0 and 38.0 MPa), with a center point of 55 ° C and 33.5 MPa. As a result, the highest yield was obtained at high pressures and low temperatures (50 ° C and 38.0 MPa) with a yield of extract of 5.73%, but for capsaicinods content, temperatures and pressures of 33.5MPa and 55 ° C, are recommend, for yielding a maximum of 97. 840 g of capsaicin and dihydrocapsaicin 32,981 g, per kg of extract obtained.

Keywords: Capsaicin, Supercritical fluid extraction, Serrano Pepper.

EFFECT OF PRESSURE AND TEMPERATURE OVER CAPSAICINOIDS CONTENT IN A SUPERCRITICAL FLUID EXTRACT OF CHILE DE ARBOL (*Capsicum annuum* LINNAEUS)

[Efecto de presión y temperatura sobre el contenido de capsaicinoides en un extracto supercrítico de chile de árbol (*Capsicum annuum* Linnaeus)]

Jorge Alberto García Fajardo[a+], Jaime Robles Cota[a], Mirna Estarrón Espinosa[a], Gustavo Adolfo Castillo-Herrera[a*]

[a] Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C., Unidad de Tecnología Alimentaria. Camino El Arenero #1227, CP 45019. Col. El Bajío del Arenal, Zapopan, Jalisco, México.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: jgarcia@ciatej.mx

Área del Conocimiento: Procesos Químicos.

ABSTRACT
Mexico is the country with the greatest genetic variety of *Capsicum*; their genetic wealth is largely due to the diversity of climates and soils, but also to traditional farming practices that made the small producers to use seeds from selected peppers of native plants. In this work the “chile de arbol” (*Capsicum annuum Linnaeus*) was subjected to a process of oleoresin extraction by carbon dioxide in supercritical conditions, evaluating the effect of pressure process and temperature over yield extract and capsaicinoid content therein, 22 experimental orthogonal design was carried on, at the center point and star performed experiments a replica was evaluated, also, effect of two levels in pressure (200-400 bar) and two levels in temperature (40 -70 ° C) were analyzed, and finally, after obtaining the conditions of pressure and temperature, flow in a range of 5 to 25 g / min CO_2 was evaluated. It was found that only the pressure was significant for obtaining a higher concentration of total capsaicinoids at a400 bar pressure and 70 ° C temperature, achieving up to 27,278 g capsaicinids/ kg of extract, which contrast with those reported in other studies which suggest less pressure to maximize content of capsaicinoids, these extraction conditions are improved when CO2 flows at a rate of 5g / min of CO_2 were used, obtaining an average yield of 10.1% extract, contrary to the 1.2% yield obtained in the low levels of the factors evaluated (158bar 55 ° C and 5g / min flow), this can be explained by the amount of carotenoids containing in this “chile de arbol” *(Capsicum annuum Linnaeus)*.

Keywords: Supercritical fluid extraction, *Capsicum annuum Linnaeus*, Capsaicin.

SUPERCRITICAL FLUID EXTRACTION OF CHILCUAGUE (*Heliopsis longipes*)

[Extracción mediante CO_2 en condiciones supercríticas de chilcuague (*Heliopsis longipes*)]

Jorge Alberto García Fajardo[a+], Karent Magdalena Labrador Felix[a], Mirna Estarrón Espinosa[a], Gustavo Adolfo Castillo-Herrera[a*]

[a] Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. Unidad de Tecnología Alimentaria. Camino El Arenero #1227, CP 45019. Col. El Bajío del Arenal, Zapopan, Jalisco, México.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: jgarcia@ciatej.mx

Área del Conocimiento: Procesos Químicos.

ABSTRACT
Chilcuague (*Heliopsis longipes*) is a wild endemic herb from the Sierra Gorda, which is comprised by San Luis Potosi, Guanajuato and Queretaro states, and where natives have given various uses as an anthelmintic, food flavoring, local anesthetic, a treatment for cold sores; among other applications; this due to the content of affinin (N-isobutyl-2E, 6Z, 8E decatrienamida) the major alkamide in chilcuague (Heliopsis longipes). There are different methods of extracting affinin, as maceration in organic solvents, soxhlet extraction and supercritical fluid extraction. The aim of this study was to determine the conditions to maximize the amount of affinin extract in chilcuague (*Heliopsis longipes*) by supercritical CO_2 extraction process, for which a central composite experimental design was evaluated, factors evaluated were: pressure (200 bar and 400 bar) and temperature (40 ° C and 70 ° C), the values of the center point: 300 bars and 55 ° C, while the star points were : 300 bar, 34 ° C; 300, 76 ° C; 159 bars, 55 bars and 441 ° C, 55 ° C. While the response variable was the amount of extract obtained. A flow of 10 g CO2 / min was maintained constant for 2.5 h for all experiments. It was found that both the pressure and the temperature inside the evaluated parameters, have no significant effect on the amount of extract, but the results show that at higher pressure greater quantity of extract.

Keywords: Chilcuague, Supercritical fluid extraction, Affinin.



DESIGN AND IMPLEMENTATION OF FUZZY OBSERVERS FOR THE ESTIMATION OF FREE FATTY ACIDS CONCENTRATION IN AN ESTERIFICATION PROCESS

(Diseño e implementación de observadores difusos para la estimación de la concentración de Ácidos Grasos Libres en un proceso de esterificación)

Efrén Aguilar Garnica[a*+], Juan Paulo García Sandoval[b].

[a] Depto. de Química, Universidad Autónoma de Guadalajara, Av. Patria 1201, Zapopan, México
[b] Depto. de Ingeniería Química, Universidad de Guadalajara, Blvd. Marcelino García Barragán 1451, Guadalajara, México

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: efren.aguilar@edu.uag.mx

Área del Conocimiento: Procesos Químicos

ABSTRACT
An observer is an algorithm whose structure is derived from the mathematical model of certain process and is able to reconstruct the evolution of certain state variables (whose measurement is expensive or time-consuming) from continuous and cost-effective measurements. That is, an observer can be considered as a monitoring tool. On the other hand, biodiesel is a renewable blend of organic esters that can be used as fuel capable of reducing CO emissions in comparison to the petroleum diesel. The main barrier for the commercialization of biodiesel is the relatively high cost when is produced from refined oils. The cost can be reduced when biodiesel is produced from lower quality feedstock characterized by its high (>5%) content of Free Fatty Acids (FFA). Esterification is the first process that must be carried out if it is desired to transform this type of feedstock into biodiesel. There is diverse feedstock having a high content of FFA (e.g. waste cooking oil, vegetable and animal fats) including grease trap wastes. To the best of our knowledge little attention has been paid to the development of observers for biodiesel-related production processes. Thus, the aim of this work is to design and to implement a couple of fuzzy observers: Classical Fuzzy Observer (CFO) and Fuzzy Reset Observer (FRO) for monitoring purposes in the esterification of grease trap wastes. The esterification process has been conducted within a Continuous Stirred Tank Reactor and the task of the observers has been to provide FFA's concentration from temperature measurements. According to a multiple range test applied over the estimation error, the FRO provides better results than the CFO and this is probably because is able to reconstruct its behavior at each instant when the measurements were available.

Keywords: Estimation, fuzzy observer, reset fuzzy observer, esterification, grease trap wastes.



OPTIMIZATION OF OPERATING CONDITIONS IN PET'S CRYSTALLIZATION WITH A COMBINED DESIGN OF EXPERIMENTS

(Optimización de las condiciones de operación para la cristalización de PET usando un diseño de experimentos combinado)

Sinuhé César Castelo Esparragoza[a*], Efrén Aguilar Garnica[a+], Froylán Mario Espinoza Escalante[a].

[a] Depto. de Química, Universidad Autónoma de Guadalajara, Av. Patria 1201, Zapopan, México

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: efren.aguilar@edu.uag.mx

Área del Conocimiento: Procesos Químicos

ABSTRACT
Poly(ethylene terephtalate) "PET" is a thermoplastic polymer which is widely used as a container for liquids and food. Nevertheless, it can take thosands of years to biodegrade such polymer. This is why is required a recycling of PET. Cristallization of PET is an stage of the recycling process in which its crystallinity (usually measured in terms of intrinsic viscosity) is improved by following a thermal treatment in order to guarantee adequate physical properties such as flexibility, elongation and impact resistance. Currently there's an manufacturer located in the state of Jalisco (MEXICO) that generates a PET-based product with an intrinsic viscosity equal to 0.83dL/g derived for a mixture containing 10% V-PET (virgin PET), 50% RPET-BPC (recycled-purchased PET) and 40% RPET-MPI (own-recycled PET) which is processed at 155°C and 20min. This composition and operating conditions have been derived without following a scientific methodology. Thus, the aim of this work is to investigate if these current operating conditions achieves the maximum value for intrinsic viscosity or if such conditions can be modified in order to generate the aforementioned optimal value. An innovative combined design of experiments has been proposed and carried out to fulfill the proposed objective. First, a conventional factorial design of experiments is developed to analyze variations of intrisic viscosity as a function of temperature and time. Then, a design of experiment for mixtures has been carried out to analyze the behavior of the intrinsic viscosity as a function of the PET-type (V-PET, RPET-BPC or RPET-MPI). The results of the combined design of experiments show that is necessary to modify the current operating point at 5% V-PET, 50%RPET-BPC, 45% RPET-MPI at 170°C and 10min. This proposal reduces both the use of V-PET and the operation time and as a consequence, production expenses could be surely reduced if it is implemented.

Keywords: PET, Crystallization, Recycling, Combined design of experiments.

SYNTHESIS OF N-HETEROCYCLIC CARBENES DERIVED FROM AMINO ACIDS AND THEIR APPLICATION IN THE FORMATION OF RHODIUM COMPLEXES

(Síntesis de carbenos N-heterocíclicos derivados de aminoácidos y su aplicación en la formación de complejos de rodio)

Raúl Ricardo Quiñonez-López[a*+], Sara Angélica Cortés-Llamas[a], Irma Idalia Rangel-Salas[a].

[a] Departamento de Química, CUCEI, Universidad de Guadalajara, Blvd. Gral. Marcelino García Barragán 1421 Olímpica, 44430, Guadalajara, Jal. México.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: raulrqlz@gmail.com

Área del Conocimiento: Procesos Químicos.

ABSTRACT
The aim of this project is to achieve the synthesis of imidazolic salts derived from natural amino acids, which can be coupled to a metal precursor, to yield organometallic compounds. In our research group has been reported the synthesis and characterization of organometallic complexes of gold with N-heterocyclic carbenes from cationic imidazolic derivatives produced from hydrophobic side-chain amino acids as row materials. The hypothesis of the project lies in the ease of obtaining organometallic complexes in which the metal-carbon bond is favored when the carbon atom has a carbene-type functionality. In this work, the synthesis of two new ligands as target molecules is presented; derived from (*S*)-methionine and (*S*)-threonine. The final products were obtained by condensation with aldehydes to form imidazole rings. Subsequently, the methyl esters were prepared and finally, the objective products were synthesized by nucleophilic substitution reaction. Thus, the imidazolium salts produced were characterized by ^{1}H-NMR and we are working on their characterization by ^{13}C-NMR, mass spectrometry and elemental analysis. Besides the synthesis of imidazolium salts mentioned above, new ligands which a hydrophilic group as a side chain are being investigated, as well as their application in the synthesis of rodium complexes.

Keywords: Heterocyclic carbenes, synthesis, amino acids, rhodium complexes.

RESUMEN
El objetivo del proyecto es lograr la síntesis de sales imidazólicas derivadas de aminoácidos naturales, las cuales puedan ser acopladas a un precursor metálico, para obtener compuestos organometálicos. En nuestro grupo de investigación se ha reportado la síntesis y caracterización de complejos organometálicos de oro con carbenos N-heterocíclicos, derivados de aminoácidos de cadena lateral hidrofóbica. La hipótesis del proyecto radica en la facilidad de obtención de complejos organometálicos en los cuales el enlace metal-carbono es favorecido cuando el átomo de carbono presenta funcionalidad de tipo carbeno. En este trabajo se presenta la síntesis de dos nuevos ligantes como moléculas objetivo; derivados de la (*S*)-metionina y (*S*)-treonina. Los productos fueron obtenidos por condensación con aldehídos para la formación del anillo imidazólico. Posteriormente, los ésteres metílicos fueron preparados y finalmente, las moléculas objetivo fueron sintetizados mediante una reacción de sustitución nucleofílica. Así, las sales de imidazolio obtenidas fueron caracterizadas por RMN de ^{1}H y se

está trabajando en la caracterización por RMN de ^{13}C, espectrometría de masas y análisis elemental. Además de la síntesis de las sales de imidazolio ya mencionadas, se investigan nuevos ligantes que aportarán una cadena lateral alquilhidroxi extra, además de su aplicación en la síntesis de complejos organometálicos con rodio.

Palabras Clave: Carbenos heterocíclicos, síntesis, amino ácidos, complejos de rodio

INTRODUCCIÓN

Los complejos organometálicos provenientes de carbenos N-heterocíclicos (CNH) basados en el núcleo de imidazol han sido el foco de intensa investigación en química organometálica y en catálisis homogénea[1]. Por ejemplo, los complejos de rodio-CNH han sido empleados como catalizadores en la hidrogenación por transferencia y en la hidrosililación[2]. Los carbenos N-heterocílicos son definidos como carbenos singuletes, en los cuales, el centro carbénico divalente, está conectado directamente a dos átomos de nitrógeno y con éste átomo, formando parte de un heterociclo (Figura 1)[3].

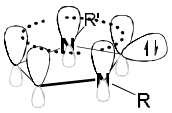


Figura 1. Un carbeno *N*-heterocíclico.

La química del iridio y rodio ha llamado considerablemente nuestra atención, debido a las propiedades catalíticas en los complejos derivados de estos metales, entre ellas, la facilidad de preparación y su estabilidad. Por lo tanto, es de especial interés para nuestro grupo de investigación la formación de complejos de iridio y rodio con ligantes carbénicos de tipo CNH, que contengan grupos laterales alquilhidroxi o alquilamino y con centros quirales que permitan su aplicación en estudios de catálisis estereoselectiva. Estas propiedades se las puede proporcionar el fragmento derivado del aminoácido[4].

En nuestro grupo de investigación ya se ha reportado la síntesis y caracterización de complejos organometálicos de oro con carbenos *N*-heterocíclicos, derivados de aminoácidos de cadena lateral hidrofóbica[5]. En este trabajo, se presenta la síntesis y caracterización de dos nuevos ligantes sintetizados a partir de la (*S*)-metionina y (*S*)-treonina llevando a cabo la formación del anillo de imidazol por condensación vía reacción de multicomponentes. Este tipo de metodología ya ha sido reportada por Merzouk y colaboradores[6] aunque utilizando diferentes sustratos a los utilizados en este proyecto.

MÉTODOS

Los disolventes involucrados fueron previamente secados antes del inicio de la síntesis. Los reactivos utilizados así como los disolventes deuterados fueron de la marca Sigma-Aldrich. Para las reacciones se utilizó una termoplaca de la marca IKA modelo RCT-basic de máximo 1500 r.p.m. y controlador digital de temperatura con termopar. Para la caracterización por espectroscopía de RMN ^{1}H y ^{13}C se utilizó el espectrofotómetro de resonancia magnética nuclear de 60 MHz, marca Anasazi para el monitoreo de la formación de los productos en las reacciones y para los productos puros el espectrofotómetro de Resonancia Magnética Nuclear de 200 MHz, marca Varian modelo Gemini 2000. Asimismo, se utilizó para la espectrometría de masas el sistema Agilent LC-MS 6400. La metodología utilizada para la síntesis de las sales de imidazolio **3a** y **3b**, consistió en la formación del anillo de imidazol vía condensación con glioxal, formaldehído y amoniaco en medio básico, utilizando un sistema de reflujo con sistema de enfriamiento acoplado. Posteriormente, se llevó a cabo la esterificación con metanol para obtener el

éster **2** y finalmente la sustitución nucleofílica con yodometano para obtener los compuestos esperados (Esquema 1). Los productos **2** y **3** fueron purificados por cromatografía de columna empacada utilizando gel de sílice como fase estacionaria y acetona como diluente. La elución fue realizada de manera isocrática.

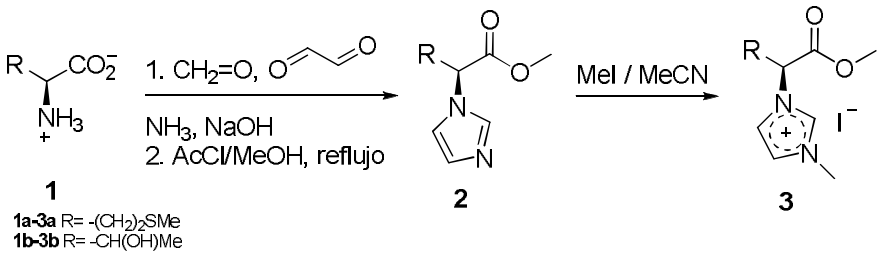


Figura 2. Ruta sintética de los ligantes imidazólicos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los productos imidazólicos obtenidos presentan una apariencia de tipo mielosa con una coloración rojizo-ámbar, de viscosidad moderada. El rendimiento total de la síntesis del derivado de (*S*)-metionina es de 82% mientras que el rendimiento total para la sal derivada de (*S*)-treonina es de 87%. La solubilidad de ambos productos se ve favorecida en disolventes polares (agua, metanol, dimetil sulfóxido), por lo cual, su purificación fue accesible por cromatografía líquida de columna empacada.

La caracterización por RMN de ^{1}H en la obtención del éster **2a** derivado de metionina (Figura 3), indica tanto la presencia del anillo de imidazol (δ 7.17 ppm, 7.33 ppm y 7.92 ppm) como la presencia del grupo metoxilo (δ 3.83 ppm) presente en la estructura. Asimismo, los desplazamientos químicos para el éster metílico **2b** (Figura 4) son semejantes a los del espectro anterior (δ 7.20 ppm, 7.39 ppm y 8.00 ppm).

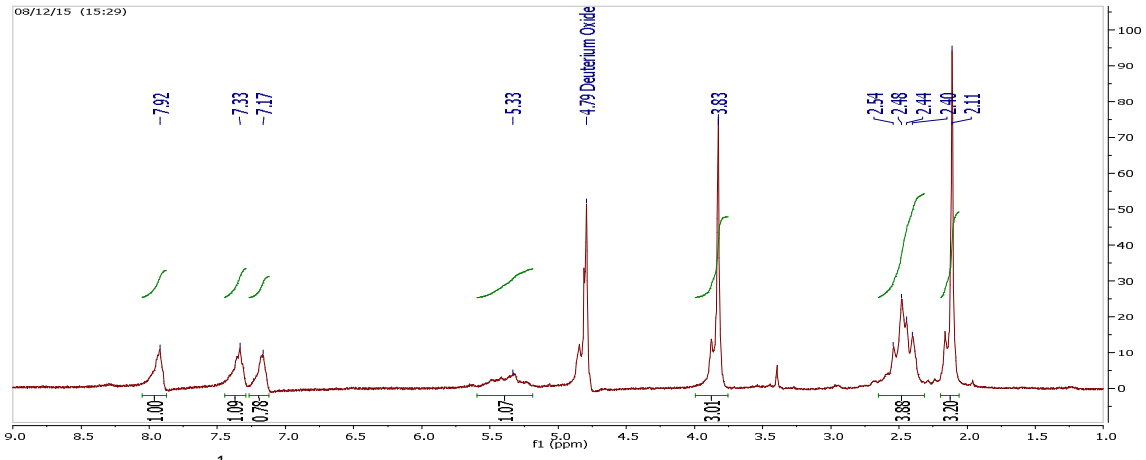


Figura 3. Espectro ^{1}H-RMN del éster metílico 2a.

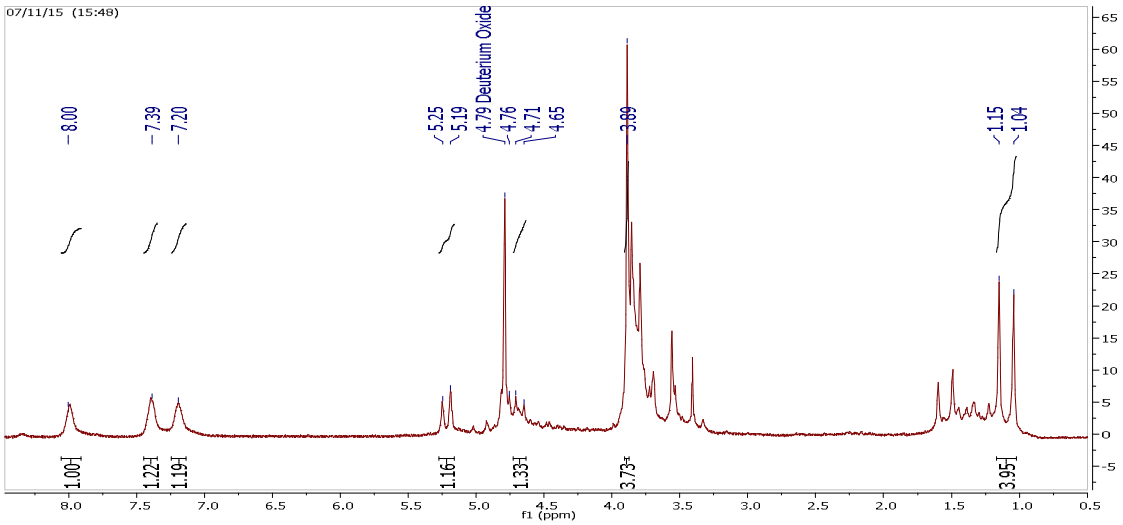


Figura 4. Espectro ^{1}H-RMN del éster metílico 2b.

Estas evidencias sugieren la viabilidad de formar productos intermediarios empleando materias primas de partida con cadena lateral polar y no polar, proporcionando accesibilidad hacia el producto final esperado. Es importante mencionar que en las dos primeras etapas los tiempos de reacción son cortos y sólo se emplea un paso de purificación.

De gran importancia es señalar el hecho de que la reacción de metilación para obtener los productos finales procedió de manera limpia, es decir, la formación de productos secundarios no fue observada una vez purificados los productos **3a** y **3b** por cromatografía de columna, lo cual agrega valor a esta última reacción química. Adicional a esto, la prueba evidente de la formación de la sal de imidazolio **3a** (Figura 5) revela el desplazamiento del singulete del protón adjunto al carbono 2 del anillo de imidazol hacia campo bajo (en el éster **2a** su valor es de 7.92 ppm mientras que en el producto final es de 9.22 ppm).

Otra característica interesante, es el desplazamiento químico que presentan el grupo metoxilo y el grupo metilo enlazado al nitrógeno del anillo en los compuestos **3a** y **3b**: para el metoxilo (4.02 y 3.98 ppm) y para el metilo-nitrógeno (4.16 y 4.09 ppm), respectivamente, en donde se aprecia en ambos que grupo metilo-nitrógeno es, en ambos productos, localizada más a campo bajo que el grupo metoxi. Consecuentemente, en el espectro de RMN de protón del producto final derivado de la treonina **3b** (Figura 6) también es evidente el desplazamiento químico para dicho protón, desde 8.00 ppm hasta 9.08 ppm, lo cual va en concordancia con la carga positiva adquirida en el fragmento orgánico de la molécula.

El gran avance en el desarrollo de una creciente diversidad de estructuras de ligantes CNH ha implicado un reto en el diseño de un precursor de carbeno N-heterocíclico específico, con frecuencia, en el paso de la reacción de ciclación. Debido a que la desprotonación de los anillos imidazólicos es el método más común para acceder al carbeno, existen métodos enfocados en las síntesis de dichos ciclos, de tipo catiónico[7].

Finalmente, cabe mencionar que todos los valores de desplazamiento químico en RMN de protón también presentaron un ligero desplazamiento a campo bajo, de acuerdo a lo anterior descrito.

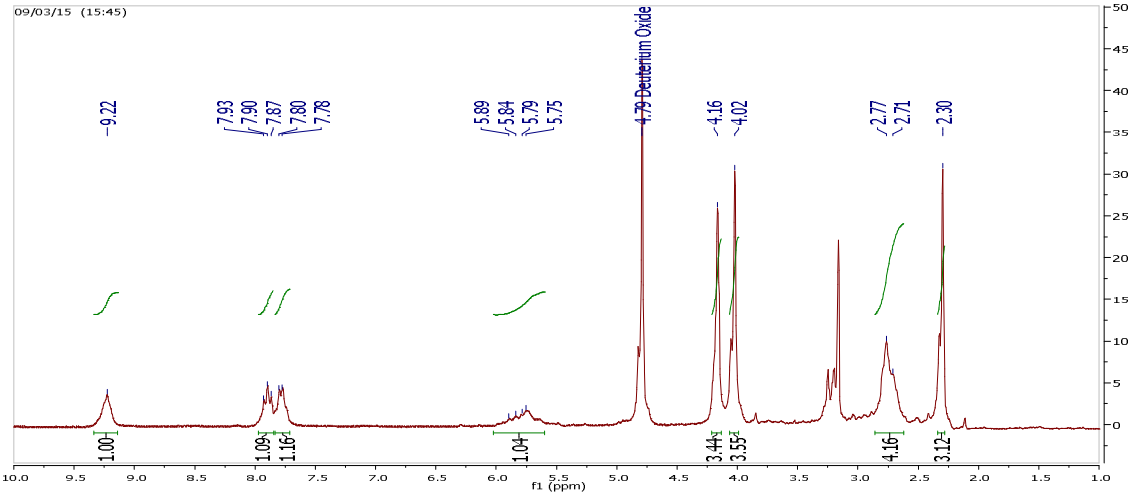


Figura 5. Espectro ^{1}H-RMN de la sal de imidazolio 3a derivada de la metionina.

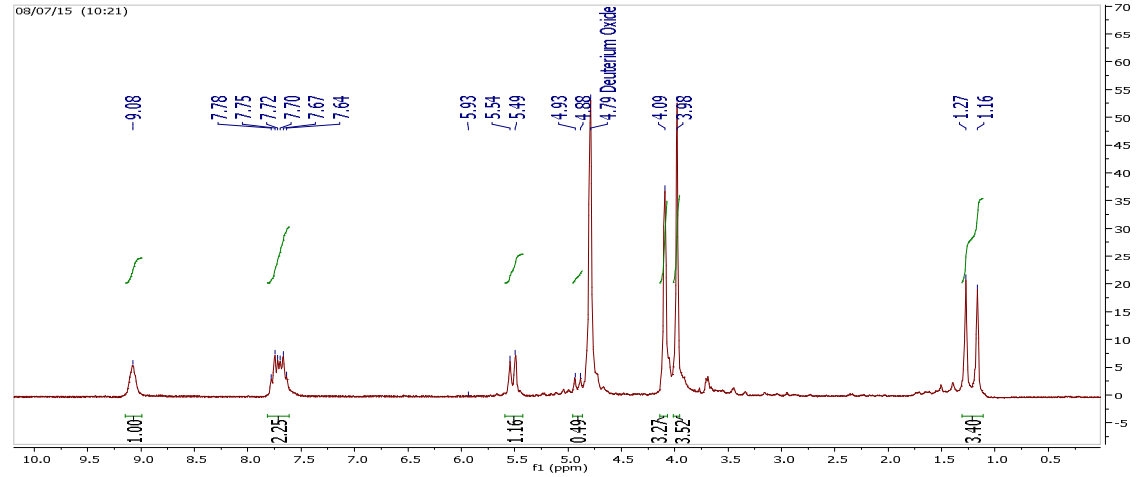


Figura 6. Espectro ^{1}H-RMN de la sal de imidazolio 3b derivada de la treonina.

CONCLUSIONES

La ruta de síntesis para las sales de imidazolio **3a** y **3b** fue demostrada utilizando aminoácidos de cadena lateral hidrofílica. Dichos productos permitirán su uso como ligantes en el estudio de la síntesis de compuestos organometálicos de rodio así como la obtención de nuevos ligantes mediante el uso de diferentes materias primas empleando nuestra metodología.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT, por el proyecto 175828 y la beca de posgrado 204946 y al M.C. José G. Torres Tolentino por el apoyo técnico en la caracterización por RMN-^{1}H y RMN-^{13}C.

REFERENCIAS

[1] Hahn, F., Jahnke, M. (2008). "Heterocyclic Carbene: Synthesis and Coordination Chemistry", *Angewandte Chemie International. Ed*., (47): 3122.

[2] Díez-González, S., Marion, N., Nolan, S. (2009). "N-heterocyclic carbenes in late transition metal catalysis", *Chemical Reviews. 109*, 3612.

[3] Melaimi, M., Soleilhavoup, M., Bertrand, G. (2010). "Stable Cyclic Carbenes and Related Species beyond Diaminocarbenes", *Angewandte Chemie International. Ed*., (49): 8810.

[4] Bao, W., Wang, Z., Li, Y. (2003). "Synthesis of Chiral Ionic Liquids from Natural Amino Acids", *Journal of Organic Chemistry,* (68): 591-593.

[5] Reynoso-Esparza, M., Rangel-Salas, I., Peregrina-Lucano, A., Alvarado-Rodríguez, J., López-Dellamary-Toral, F., Manríquez-González, R., Espinosa-Macías, M., Cortés-Llamas, S. (2014). "Synthesis and characterization of Au(I) and Au(III) complexes containing N-heterocyclic ligands derived from amino acids", *Polyhedron*, (81): 564-571.

[6] Merzouk, M., Moore, T., Williams, N. (2007). "Synthesis of chiral iminoalkyl funcionalised *N*-heterocyclic carbenes and their use in asymmetric catalysis", *Tetrahedron Letters,* (48): 8914-8917

[7] Benhamou, L., Chardon, E., Lavigne, G., Bellemin-Laponnaz, S., Cesar, V. (2011): "Synthetic Routes to N-Heterocyclic Carbene Precursors", *Chemical Reviews*. (111): 2705-2733.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

METHODS FOR INDOLE 3-ACETIC ACID AND GIBBERELLIC ACID EXTRACTION AND DETECTION IN DIGESTATES

(Métodos para extracción y detección de ácido 3-indol acético y ácido giberélico en digestatos)

Vanesa Chicatto Gasperín[a]*, Myrna Solís Oba[a], Aida Solís Oba[b], Edgar Bustos Barrera[a], Joseph Hernandez Rivadeneyra [a]

[a] Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, Tlaxcala.
[b] Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: ibq.v.chicatto@gmail.com

Área del Conocimiento: Química Agronómica.

ABSTRACT
The digestate is a semi liquid byproduct of the anaerobic digestion process; it contains organic matter, microbial biomass, macronutrients, micronutrients and small quantities of plant growth regulating substances, like indole 3-acetic acid (IAA) and gibberellic acid (GA_3). It mains use is as promoter and strengthening of plants, roots and fruits growth. There are few studies that address the issue to the production of IAA and GA_3 during the anaerobic digestion, and there is not a standardized method for the extraction and detection for them. The objective of this work is to propose a method for extraction and detection of both IAA and GA_3 produced during anaerobic digestion. The methodology followed was testing different extraction and identification methods using IAA and GA_3 standards solutions. We probed different extraction methods with various solvents, pH changes, using a C-18 cartridge and pretreatment by macerating with stirring. The detection was performed by thin layer chromatography (TLC) analyzing five mobile phases. The best method for extraction of both IAA and GA_3 was as follow: centrifuge at 1000 rpm during 15 min to remove solid particles, adjust to pH 8.5 with Na_2CO_3 and extract impurities with ethyl acetate, discharge the organic phase and adjust the aqueous phase to pH 2.8 with HCl, remove the IAA and GA_3 with ethyl acetate three times. Let to evaporate the solvent and re-dissolve with methanol. With this system was extracted 80% IAA and 62% of GA_3.The best mobile phase for TLC was chloroform: ethyl acetate: acetic acid (5:4:1), the IAA Rf was 0.87 and GA_3 Rf was 0.47. These methods were finally applied to digestates to identify IAA and GA_3 we found the presence of GA_3 at one and a half weeks of digestion process and IAA at the third week.

Keywords: Digestate; indol 3-acetic acid; gibberelic acid; extraction methods.

RESUMEN
El digestato es un subproducto del proceso de la digestion anaerobia; contiene materia orgánica, biomasa microbiana, macronutrientes, micronutrientes y pequeñas cantidades de sustancias reguladoras del crecimiento vegetal, como ácido 3-indol acético (IAA) y ácido giberélico (GA_3). Es mayoritariamente usado como promotor y fortalecedor del crecimiento de plantas raíces y frutos. Existen pocos estudios que abordan la producción de IAA y GA_3 durante la digestión anaerobia y no hay un método estandarizado para la detección de los mismos. El objetivo de este proyecto es proponer un

método para extracción y detección de IAA y GA_3 producidos durante la digestión anaerobia. La metodología seguida fue probar diferentes métodos de extracción y detección utilizando soluciones estandar de IAA y GA_3. Se probaron diferentes métodos de extracción utilizando con varios disolventes, cambios de pH, utilizando cartuchos de C-18 y pretratamiento mediante maceración con agitación. La detección se realizó por cromatografía de capa fina (TLC) analizando cinco fases móviles. Los resultados de los mejores métodos de extracción para IAA y GA_3 fue como sigue: centrifugar a 1000 rpm para remover los sólido, ajustar el pH a 8.5 con Na_2CO_3 y eliminar impurezas con etil acetato, descartar la fase orgánica y ajustar la fase acuosa a pH 2.8 con HCl; remover el IAA y GA_3 con acetato de etilo tres veces. Dejar evaporar el disolvente y re disolver con metanol. Con este sistema se extrae 80% de IAA y 62% de GA_3. La mejor fase móvil para TLC fue cloroformo: acetato de etilo: ácido acético (5:4:1), el Rf para el IAA fue de 0.87 y para el GA_3 fue de 0.47. Estos métodos finalmente fueron aplicados a digestatos para identificar IAA y GA_3, se encontró presencia de GA_3 en la primera semana y media del proceso y de IAA en la tercera semana.

Palabras Clave: Digestato, ácido 3 indol-acético, ácido giberélico, métodos de extracción.

INTRODUCCIÓN

La digestión anaerobia es un proceso microbiano donde bacterias fermentativas, acetogénicas y arqueas metanogénicas, convierten la materia orgánica en dióxido de carbono y metano, formando biogás y un efluente llamado digestato [1]. El biogás es una energía limpia y renovable considerada como un buen sustituto de los combustibles fósiles [2]. El digestato, por su parte, es una mezcla de materia orgánica parcialmente degradada, biomasa microbiana y diversos componentes orgánicos e inorgánicos.

El uso del digestato, es principalmente como promotor y fortalecedor del crecimiento de la planta, raíces y frutos, gracias a su contenido de materia orgánica, macro y micronutrientes [3] y a la presencia de sustancias reguladoras del crecimiento vegetal [4], las cuales son producto del metabolismo de las bacterias típicas de este tipo de fermentación anaeróbica. En el digestato están presentes compuestos como: giberelinas, auxinas y citoquininas, compuestos que actúan como reguladores del desarrollo vegetal [4]. La concentración de los fitoreguladores en el digestato es en el orden de μmoles, de igual forma las plantas también necesitan los fitoreguladores en cantidades micro o nano molares, por lo que si el digestato cuenta con una mayor cantidad que la requerida por un cultivo, solo se necesita aplicarlo de manera diluida. De acuerdo con Kostenber et al [5] el digestato resultante presentó efectos promotores de enraizamiento en los ensayos biológicos de esquejes de frijol y en plántulas de *Grevillea*. Por su parte Feng et al [4], relacionaron los compuestos cetónicos con la resistencia a enfermedades que se presenta en la producción agrícola usando los digestatos como fertilizantes, así como los efectos promotores del crecimiento lo atribuyen a los fitoreguladores también presentes. Por su parte Scaglia et al [6] reportaron la presencia de actividad ligada a auxinas proveniente de extracto acuoso del digestato; en la fracción neutral hidrofóbica, identificaron la presencia de ácido fenil acético y ácido 3-indol acético (9.34 mg/L); estas moléculas provenían de la biodegradación de moléculas presentes en el sustrato, por lo que aseguran que la composición del mismo probablemente juega un rol central en el efecto bio-estimulante del digestato.En cuanto a los métodos de extracción y detección de fitoreguladores en plantas existe información variada pero respecto a su extracción en digestatos existe poca investigación, además que las concentraciones son bajas y se encuentran una gran concentración de otros compuestos presentes.

Por lo que el objetivo de este proyecto es proponer una metodología para la extracción y detección de ácido 3-indol acético (IAA) y ácido giberélico (GA_3) en digestatos.

METODOLOGÍA

Se estandarizaran técnicas para extracción y detección de IAA y GA en el digestato. Se probaran diversos sistemas de extracción, sistemas para detección por cromatografía de capa fina (TLC). Para la extracción líquido-líquido de fitoreguladores, se utilizan cambios de pH y uso de varios disolventes orgánicos como: hexano, dietil éter, butanol, acetato de etilo, diclorometano, isopropanol, cloruro de metilo y 1-propanol, en diferentes concentraciones y mezclas de ellos, propuestos de acuerdo con las propiedades fisicoquímicas de los fitoreguladores objetivo. Los sistemas de extracción se ensayaron primero usando estándares de IAA y GA disueltos en agua en concentraciones de 20 y 10 mg/ml.

Posteriormente se evaluaron algunas otras metodologías, como las propuestas por Frankenberguer y Poth [7], Kostenber et al [5], Castillo el al [2] y Feng et al [4]; donde se propone un paso adicional de extracción sólido-líquido, para ello se hace pasar la muestra por cartuchos C-18 de fase reversa.
En todos los casos el rendimiento de las extracciones se calculó por diferencia de peso, restando la cantidad conocida adicionada del fitoregulador y determinando la cantidad extraída del mismo, las mediciones se realizaron por triplicado.

La separación de mezclas de moléculas mediante la cromatografía de capa fina se basa en el principio del reparto entre dos fases. Para los análisis de cromatografía de capa fina (TLC) se ha reportado el uso de diferentes fases móviles para IAA y GA, se hicieron pruebas con diferentes disolventes y mezclas de ellos [7, 5, 8, 2] para determinar la fase móvil que consiga una mejor elución y permita la separación e identificación de IAA y GA.

También se llevó a cabo la reacción de Salkowsky para corroborar la presencia de ácido 3-indol acético en el material extraído, mediante la determinación colorimétrica de auxinas y para establecer la presencia de grupos indol en la solución extraída [9]. Para la cuantificación de índoles con este método se preparó una curva de calibración. Una vez seleccionadas las metodologías para llevar a cabo la extracción de IAA y GA así como la cromatografía en placa fina usando estándares de los compuestos de interés, se procedió a probar dichas metodología en digestatos obtenidos de la co-digestión anaeróbica de residuos de frutas con estiércol de vaca y estiércol de cerdo.

RESULTADOS

Probando las diferentes alternativas indicadas en la sección de metodología, se encontró que la mejor técnica para extracción líquido-líquido es la resumida en la tabla 1, con la cual se obtuvo el mayor porcentaje de extracción tanto para ácido 3-indol acético (80%) y ácido giberélico (62%).

Tabla 1. Esquema de extracción líquido-líquido de fitoreguladores

1.- Centrifugar la muestra a 1000 rpm por 15 min a 4°C
2.-Pasar el sobrenadante por un filtro de 45 μm
3.-Ajustar a pH de 8.5 con Na_2CO_3
4.-Extraer 3 veces con el mismo volumen de acetato de etilo, decartar fase orgánica
5.-Ajustar el pH a 2.8 con ácido clorhídrico 1M
6.-Extraer tres veces con la misma cantidad de acetato de etilo

7.-Evaporar el extracto a sequedad y re-disolver en etanol

Con el sistema de extracción sólido-líquido, utilizando un cartucho C-18 de fase reversa para concentrar los fitoreguladores [4], se encontró que el porcentaje de extracción para este método fue de 35 % para ácido 3-indol acético.
En la tabla 2 se indican los resultados obtenidos para la extracción líquido-líquido y sólido-líquido siguiendo las técnicas señaladas.

Tabla 2. Rendimiento de la extracción de fitoreguladores.

Método	**% De extracción de GA**	**% De extracción de IAA**
Sistema Líq-Líq[7]	62.1 ± 3.1	80 ± 3.5
Sistema Líq-Líq [2]	33± 1.1	50± 2.4
Sistema Líq-Líq [4]	N.R	35± 4.5
Sistema Sól-Líq[10]	N.R	1) 25.5±1

Una vez llevadas a cabo las extracciones con la técnica indicada en la tabla 1, se procedió a probar diferentes fases móviles para la cromatografía en placa fina, el mejor sistema de elusión (ver figura 1) fue con cloroformo/acetato de etilo/ ácido acético (5:4:1). En los carriles 1 y 2 se muestran los estándares puros disueltos en metanol (IAA y GA_3 respectivamente), en el carril 3 el extracto de IAA, en el carril 4 el extracto de GA_3 y en el carril 5 el extracto de una mezcla de ambos estándares, el revelado se hizo con luz UV.

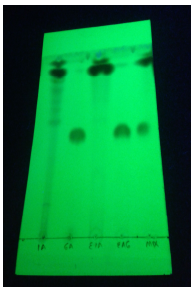


Figura 1. CCF para detección de fitoreguladores. Fase móvil: Cloroformo/Acetato de etilo/ Ácido acético (5:4:1). Revelador luz UV

Una vez seleccionado el sistema de extracción (tabla 1) y el sistema para la cromatografía en placa fina (figura 1), se procedió a aplicarlos con muestras de seis digestatos provenientes de diferentes digestiones anaerobias (3 de residuos de frutas con estiércol de cerdo y 3 de resiudos de frutas con estiércol de vaca). Los extractos resultantes se analizaron por TLC bajo las mismas condiciones mencionadas para los estándares y se observaron bandas características para ácido giberélico después de semana y media de haberse iniciado la digestión (figura 2a), así como bandas que se pueden relacionar con el ácido 3-indol-acético en digestatos a las tres semanas de digestión (figura 2b)..

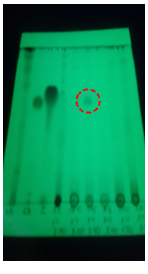




Figura 2a y 2b. TLC para detección de fitoreguladores en muestras de digestatos

DISCUSIÓN

Se puede observar que los resultados demuestran que si es posible extraer y detectar IAA y GA_3 en muestras de digestatos, como lo reportan Feng [4] y Scaglia [6]. Los métodos de extracción analizados demuestran que es importante considerar la solubilidad de los compuestos de interés, como son el IAA y GA para poder lograr un mejor porcentaje de extracción, así mismo es necesario tomar en cuenta la polaridad de los mismos para su correcta elución en la TLC.

CONCLUSIONES

Es posible extraer e identificar ácido 3-indol acético y ácido giberélico en muestras de digestatos de una manera rápida y más económica por medio del uso de técnica de extracción y detección por TLC y colorimetría.

Durante la digestión anaeróbica se producen fitoreguladores en alguna parte del proceso, estos se producen en cantidades suficientes para permitir su detección con sistemas de extracción y por TLC.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y al Instituto Politécnico Nacional

REFERENCIAS

[1] Krakat N., Schmidt S., Scherer P. (2010), “Mesophilic Fermentation of Renewable Biomass: Does Hydraulic Retention Time Regulate Methanogen Diversity”, Applied and Environmental Microbiology, 76(18): 6322-6326.

[2] Castillo, G., Ortega, G., Carabeo, V., Delgado, G; Michelena, G. (2007), “Determinación cualitativa de giberelinas y auxinas por cromatografía de capa fina”, CIDCA Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, XLI (1): 12-17.

[3] Alburquerque, J., De la fuente, C., Ferrer-Costa, A., Carrasco, L., Cegarra, L., Abad, M., Bernal, M.(2012), “Asessment of the fertiliser potential of digestates from farm and agroindustrial residues”, Biomass and Bioenergy, 40: 181-189.

[4] Feng, H., Qu, G., Ning, P., Xiong, X., Jia, L., Shi, Y., Zhang, J. (2011), “The Resource Utilization of Anaerobic Fermentation Residue”, Procedia Environmental Science, 11: 1092-1099.

[5] Kostenber, D., Marchaim, U., Watad, A., Epstein, E.(1995), “Biosynthesis of plant hormones during anaerobic digestion of instant coffee waste”, Plant Growth Regulation, 17:127-132.

[6]Scaglia, B., Pognani, M. Adani, F. (2015), “Evaluation of hormone-like activity of the dissolved organicmatter fraction (DOM) of compost and digestate Barbara”, Science of the Total Environment, 514 :314–321.

[7] Frankenberguer, W., Poth, M. (1987), "Biosynthesis of Indole-3-Acetic Acid by the Pine Ectomycorrhizal Fungus Pisolithus tinctorius", Applied and Environmental Microbiology, 57(12): 2908-2913.

[8] Kotov, A., Kotova, L (1987), "The contents of auxin and cytokinins in Pea internodes as related to the growth of lateral buds", Journal of Plant Physiology, 156: 428-448.

[9] Glickmann, E., y Dessaux, Y. (1995). "A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria". Applied and Environmental Microbiology, 61 (2): 763-796.

[10] Ludwig-Müller, J. 2011. "Auxin conjugates: their role for plant development and in the evolution of land plants", Journal. Experimental Botany 62 (6):1757-1773.

EVALUATION OF FOUR WHEAT GENOTYPES IN THREE PLANTING DATES IN NORTHERN SINALOA

(Evaluación de cuatro genotipos de trigo harinero en tres fechas de siembra en el norte de Sinaloa)

Alberto Borbón-Gracia*[a+], Héctor Eduardo Villaseñor-Mir[c], Jesús Alejandra García-Encinas[b], Luis Alberto Peinado-Fuentes[a], Jaime Macías-Cervantes[a].

[a] Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Valle del Fuerte.
[b] Auxiliar de investigación Campo Experimental Valle del Fuerte
[c] Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Valle de México

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: borbon.alberto@inifap.gob.mx

Área del Conocimiento: Química Agronómica.

ABSTRACT
In the state of Sinaloa in the cycle fall-winter 2014-2015 around 79,384 hectares of wheat were planted, which relate mainly to bread wheat. Given the importance of this crop in northern Sinaloa, the increase in planting area that has arisen in recent years, it is necessary to update the technology package of this crop in the region, therefore, the objective of this study was to evaluate different planting dates as good planting date depends largely get a good grain yield. Three advanced lines and one commercial variety were established at three planting dates, the first date was established on December first, the second and third were 15 and 30 of December respectively. Planting was dry and after the germination irrigation was applied, it was fertilized with the formula 200-52-00, applying half of nitrogen and phosphorus before of the planting and the nitrogen rest before the first auxiliary irrigation, three irrigations were applied and was not necessary to apply for the control of pests and diseases. The results indicate no significant differences between genotypes, with yields ranging from 3.451 to 3.821 kg/ha, while statistically planting dates include the second and third date with average yields of 3,758 and 3,891 kg/ha respectively.

Keywords: Performance; genotypes; quality; tolerance.

RESUMEN
En el estado de Sinaloa en el ciclo otoño-invierno 2014-2015 se sembraron alrededor 79.384 hectáreas de trigo, que corresponden principalmente a trigo harinero. Dada la importancia que tiene este cultivo en el norte de Sinaloa, por el aumento en el área de siembra que se ha presentado los últimos años, es necesario actualizar el paquete tecnológico de este cultivo en la región, por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar diferentes fechas de siembra, ya que de una buena fecha de siembra, depende conseguir en gran parte un buen rendimiento de grano. Se establecieron tres líneas avanzadas y una variedad comercial en tres fechas de siembra, la primera fecha se estableció el primero de diciembre, la segunda y tercera fueron del 15 y 30 de diciembre, respectivamente. La siembra se realizó en seco y posteriormente se aplicó el riego de germinación, se fertilizó con la fórmula 200-52-00, aplicando la

mitad del nitrógeno y todo el fósforo antes de la siembra y el resto de nitrógeno antes del primer riego de auxilio, se aplicaron tres riegos y no fue necesario aplicar para el control de plagas y enfermedades. Los resultados indican que no existe diferencias significativas entre genotipos, con rendimientos que van de 3,451 a 3,821 kg/ha, mientras que las fechas de siembra estadísticamente destacan la segunda y tercera fecha con rendimientos promedio de 3,758 y 3,891 kg/ha respectivamente.

Palabras Clave: Rendimiento; genotipos; calidad; tolerancia.

INTRODUCCIÓN

Desde el inicio de la civilización, el trigo es uno de los cereales más importantes en la alimentación humana, es originario del oriente medio según Villaseñor [1]. En general no se consume directamente; se utiliza para la elaboración de alimentos sobre todo industriales de la panificación, así como la fabricación de pastas, galletas, bebidas y hasta en la producción de combustibles [2]. El trigo ocupa el tercer lugar a nivel mundial de mayor producción procediendo del maíz y el arroz [3], y el segundo lugar a nivel nacional [4]. Este cultivo es de considerable importancia ya que en la región existen las condiciones climáticas propicias para este, es por ello que en los últimos ciclos la superficie de siembra ha ido aumentando considerablemente en el ciclo 2013-2014 la superficie fue de 62,542.41 has, pero para el ciclo 2014-2015 la superficie fue de 79,384 has [2]. Debido a la importancia que ha recobrado el cultivo en el Norte de Sinaloa, se hace necesaria la actualización del paquete tecnológico, para lo cual se estableció un ensayo de fechas de siembra con líneas y variedades de trigo harinera.

METODOLOGÍA

El presente trabajo se llevó a cabo durante el ciclo otoño-invierno 2014-2015 dentro del Campo Experimental Valle del Fuerte del Centro de Investigación Regional del Noroeste, perteneciente al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuaria, ubicado en km. 1609 Carretera Internacional México-Nogales, Juan José Ríos, Mpio. De Guasave, Sinaloa. Se evaluaron tres líneas provenientes del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) y del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), comparadas con la variedad Kronstad F2004, los materiales a evaluar fueron:

1) ROLF07/4/BOW//NKT//CBRD/3/CB RD/5/FRET2/TUKURU//FRET2
2) KRONSTAD F2004
3) TACUPETOF2001/6/CNDO/R143ENTEMEXI-2/3/AEGILPOSSQUARROSA (TAUS)/4/WEAVER/5/PASTOR/7/ROLF07
4) ALD/CEP75630//CEP75234/PT7219/3/BUC/BJY/4/CBRD/5/TNMU/PF85487/6/PBW343*2/KUKUNA/7/CNO79//PF70354/MUS/3/PAS/4/BAV92

Estos materiales se evaluaron en tres fechas de siembra, se utilizó un diseño experimental en franjas, se aplicaron tres riegos de auxilio. La primera fecha fue del primero de diciembre de 2014, la segunda y tercera fecha fueron del 15 y 30 de diciembre de 2014 respectivamente, la siembra se realizó en seco y posteriormente se aplicó el riego de nacencia. La parcela experimental fue de dos surcos de 50 m. con una separación de 80cm. y una densidad de siembra de 100 kg/ha de semilla. Se fertilizo con la fórmula 200-52-00 aplicándose la mitad de nitrógeno y todo el fosforo en presiembra y el resto del nitrógeno

antes del primer riego de auxilio. Se realizó una aplicación de herbicida para el control de maleza de hoja ancha, para el control de enfermedades no se realizaron aplicaciones preventivas ni curativas, esto con el fin de ver la resistencia de los materiales a roya de la hoja y roya amarilla o lineal. Las variables que se midieron fueron, días a floración contando desde el día de la siembra hasta que se presentó el 50% de las espigas en floración, los días a madurez fisiológica contados desde la fecha de siembra hasta que alcanzo su madurez fisiológica. Para la cosecha se realizaron cinco muestreos de los dos surco de 4 m. esto se llevó a cabo con gente y posteriormente se trillo con una trilladora tipo pulman, el rendimiento de grano se analizó estadísticamente mediante el sistema SAS al 95% de confiabilidad.

RESULTADOS

El análisis de varianza indica que no existe interacción entre genotipos y fechas de siembra, de igual manera no existe diferencia significativa entre los genotipos evaluados (Cuadro 1), sin embargo, entre fechas de siembra si existe diferencia significativa en cuanto al rendimiento de grano, obteniéndose mayor rendimiento de grano en la segunda y tercera fecha de siembra (Cuadro 2).

En el Cuadro 1 se presentan los rendimientos obtenidos en kilogramos por hectárea de los materiales evaluados. Estos rendimientos son el promedio de las tres fechas de siembra con sus cinco repeticiones, donde se puede observar que la mayoría de las líneas evaluadas obtuvieron rendimientos similares a la variedad Kronstad F2004, con la diferencia que estos nuevos materiales presentan alta tolerancia a roya de la hoja y roya amarilla.

Cuadro 1.- Rendimiento y características agronómicas de cuatro materiales de trigo harinero evaluados en tres fechas de siembra. Ciclo O-I 2014-2015.

Genotipos	***Días a floración***	***Días a madurez***	***Altura de planta (cm)***	***Rendimientos (kg/ha)***
1	*65*	*108*	*77*	*3821*
2	*68*	*108*	*88*	*3727*
3	*70*	*108*	*85*	*3468*
4	*66*	*108*	*93*	*3451*

Cuadro 2.- Rendimiento de grano de trigo promedio de cuatro materiales evaluados en tres fechas de siembra. Ciclo O-I 2014-2015.

Fechas de siembra	***Rendimientos***	***Significancia Estadística***
Primera *(1 de Dic)*	*3202*	*B*
Segunda *(15 de Dic)*	*3758*	*A*
Tercera *(30 de Dic)*	*3891*	*A*

Los bajos rendimientos obtenidos en el ciclo agrícola 2014-2015, se debieron principalmente al bajo número de horas frio acumuladas durante el desarrollo del cultivo, como se puede observar en el cuadro 3, se presentaron horas frío insuficientes para un buen rendimiento de grano como lo menciona Félix [5].

Cuadro 3.- Número de horas frío que se han presentado los últimos ciclos agrícolas en la región norte del estado de Sinaloa.

ESTACION	*2010-11*	*2011-12*	*2012-13*	*2013-14*	*2014-15*
TOROCOBAMPO	*525*	*520*	*387*	*197*	*148*

DISCUSIONES

No existen variedades que presenten altos rendimientos de grano en ninguna de las fechas evaluadas, esto debido a que en todas las fechas de siembra se presentaron condiciones de altas temperaturas durante la etapa de desarrollo del cultivo.

CONCLUSIONES

De las líneas evaluadas, existen materiales que presentan rendimientos muy similares a la variedad Kronstad F2004, con lo cual se podría liberar una nueva variedad de trigo harinero con buen potencial de rendimiento de grano y tolerancia a enfermedades, bajo las condiciones ambientales del norte del estado de Sinaloa. Estas líneas avanzadas deben sembrarse en las mejores fechas de siembra para que expresen su potencial de rendimiento.

AGRADECIMIENTOS

Investigación financiada con recurso del proyecto CONACYT-SAGARPA N° 146788, denominado, Sistema de mejoramiento genético para generar variedades resistentes a royas, de alto rendimiento y alta calidad para una producción sustentable de trigo en México.

REFERENCIAS

[1] Villaseñor, M. H. E., M. F. Rodríguez G., R. Hortelano S. y E. Espitia R. (2013), ´´Mejoramiento genético del trigo para temporal´´. XVI Congreso internacional de Ciencias Agrícolas. Mexicali, Baja California, México. 10 p.

[2] SIAP. 2015. Servicio de información y estadística agroalimentaria y pesquera. Consultado por García E. Jesús A. Junio 2015

[3] SAGARPA 2015. Delegación de la SAGARPA en el estado de Sinaloa. Consultado por García E. Jesús A. en junio de 2015

[4] Financiera Rural 2009. http://www.financierarural.gob.mx. Consultado por García E. Jesús A.

[5] Félix, V. P., Ortiz, E.J.E., Quinta, Q. J. G., et al; Horas frio en relación al rendimiento de trigo. Folleto técnico N° 63. INIFAP-CIRNO Campo Experimental Valle del Yaqui. Cd. Obregón Sonora, México. 40 p.

INDUCTION TO CALLOGENESIS OF *Bougainvillea glabra* CHOISE

(Inducción a callogénesis de of *Bougainvillea glabra* Choise)

Christian Marely Rodriguez Salazar[a*], Silvia Evangelista Lozano [a]

[a] Centro de Desarrollo de Productos Bióticos (CEPROBI). Departamento de Biotecnología. Laboratorio de cultivo de células vegetales. Carretera Yautepec-Jojutla, Km. 6, calle CEPROBI No. 8, Col. San Isidro, Yautepec, Morelos, México. C.P. 62731.Tel: (735) 394 20 20. Fax 82512.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: crodriguezs1405@alumno.ipn.mx

Área del Conocimiento: Química Agronómica.

ABSTRACT
Bougainvillea (*B. glabra*) is a the species most used to ornament owing to great varieties that it has. The principal method of propagation is by cutting, however this method presents plant health problems, mainly. Through biotechnology tools such as plant tissues culture is possible establish systems of mass propagation efficient. In this study it had aim, evaluate different mixes of plant growth regulators (PGR) to formation callus from explants leaves and microcuttings. The explants were cleaned and desinfested, and after they were sown in medium culture MS supplemented with PGR: auxins (2,4-D) in concentrations 0.20, 0.30, 0.70 y 1.0 mgL^{-1}, and cytokinins (BAP) to concentrations 1.0, 2.70 y 5.30 mgL^{-1}. The results showed that the concentrations of BAP 2.7 mgL^{-1} and 1.0 mgL^{-1} of 2,4-D was obteined 100% callus formation in 31 days.

Keywords: *Bougainvillea; callus; auxins; cytokinins.*

RESUMEN
Bougainvillea (*B. glabra*) es una de las especies de ornato más usadas, debido a la gran variedad de especies que tiene. El principal método de propagación es por estacas, sin embargo, este método presenta problemas fitosanitarios, principalmente. Mediante herramientas biotecnológicas como el cultivo de tejidos vegetales es posible establecer sistemas eficientes de propagación masiva. Este estudio tuvo por objetivo, evaluar diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento vegetal (RCV) para la formación de callos a partir de explantes de hojas y microesquejes. Los explantes fueron lavados y desinfestados, posteriormente fueron sembrados en medio de cultivo MS, suplementado con RCV: axinas (2-4D) en concentraciones 0.20, 0.30, 0.70 y 1.0 mgL^{-1}, y citoquininas (BAP) a concentraciones 1.0, 2.70 y 5.30 mgL^{-1}. Los resultados mostraron que las concentraciones de BAP 2.7 mgL^{-1} y 1.0 mgL^{-1} de 2,4-D, se obtuvo 100% de formación de callo a los 31 días.

Palabras Clave: *Bougainvillea, callo, auxinas, citoquininas*

INTRODUCCIÓN

El género *Bougainvillea* comprende especies ornamentales y es el de mayor uso por el colorido de sus brácteas (comúnmente llamadas flores), la fácil adaptación a distintas alturas así como la tolerancia a la sequía la hace sumamente atractiva [1]. Dentro de este género se encuentran tres especies de importancia; *B. spectabilis*, y *B. peruviana B. glabra*, siendo esta última la de mayor interés, pues ocupa el cuarto lugar en Morelos en cuanto el valor de la producción, esto, debido a la amplia gama de variedades [2].

El método convencional de propagación de la *B. glabra* se hace a través de estacas, si bien los ciclo de producción se reducen, los problemas fitosanitarios limitan por mucho la productividad, tal es el caso de la Variedad variegata [3]; la cual es considerada de gran impacto económico debido a las características físicas que esta presenta.

Mediante herramientas biotecnológicas como es el cultivo de tejidos vegetales, permite el desarrollo de sistemas eficientes de propagación ya que se pueden obtener plantas libres de patógenos, entre otros atributos. Por lo que esta investigación tuvo por objetivo establecer un método eficiente para la formación de callo a partir de explante de hoja y esquejes de *Bougainvillea glabra* Choise Variedad Variegada, para su posible inducción en el futuro en embriones somáticos.

METODOLOGÍA

Las hojas y microesquejes fueron colectados de plantas crecidas en invernadero de CEPROBI-IPN. Los explantes fueron desinfestados con una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 1%, se sumergieron por 15 minutos las hojas y por 30 minutos los microesquejes. Posteriormente, los explantes fueron lavados tres veces con agua desionizada estéril dentro de la campana de flujo laminar. Las hojas se cortaron aproximadamente de 1 cm^2 y los esquejes fueron fragmentados a 1.5 cm de longitud, estos presentaron de uno a dos nudos, de acuerdo a la metodología propuesta por Estrada, 2003 [4]. Los explantes desinfestados se sembraron en medio de cultivo semisólido MS [5] al 100% complementado con vitaminas, aminoácidos y reguladores de crecimiento (Tabla 1), usando como agente gelificante Phytagel® ajustado a un pH de 5.7, se esterilizaran en autoclave a 121 °C 15 lb por 15 minutos. Se colocaron 4 explantes por cada frasco. Se incubaran por 31 días a una temperatura 25 °C ± 1, fotoperiodo 16 horas luz y 8 oscuridad. Se evaluó la formación de callo.

Tabla 1. Combinación de reguladores de crecimiento para la inducción de callo en explantes de hoja y microesquejes de *Bougainvillea glabra* Choise.

Regulador	Tratamientos (mg/l)				
	T_1	T_2	T_3	T_4	T_5
BAP	1.0	2.7	2.7	5.3	0
2,4-D	0.2	0.3	1.0	0.7	0

Fuente: Moncada *et al*., 2004 [6]

RESULTADOS

Se evaluó diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento para la inducción de callo en condiciones *in vitro* partiendo de explantes de hoja y esquejes. Los callos generados de hoja presentaron coloración verde (Figura 1a), mientras que los callos formados de los microesquejes tuvieron una coloración amarillo verdosa (Figura 1b). Siendo los verde más compactos en comparación con los callos con coloración más clara, por lo estos últimos son más friables.

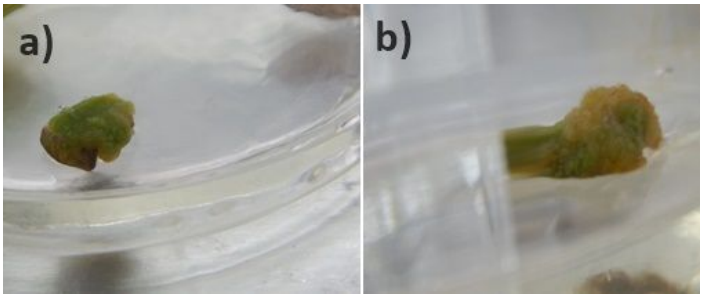


Figura 1. Respuesta callogénica de dos diferentes explantes de B. glabra var. variegata, cultivadas medio MS adicionado con 27 mg/l de BAP y 1.0 mg/l de 2,4-D. **a)** Inducción a callogénesis a partir de explante de hoja. **b)** Formación de callo utilizando como explante microesquejes

Los tratamientos T_1, T_2,T_3 y T_4 indujeron una respuesta callogénica, sin embargo, en el tratamiento tres se obtuvo un 100% de formación de callo en 31 días.

CONCLUSIONES

- Tanto las hojas como los microesquejes son una buena fuente de explante para la formación de callo, para posteriormente formar masas embriogénicas.
- Las concentraciones de RCV de 2.7 mg/l y 1.0 mg/l de 2,4-D, permitió el mayor porcentaje en la inducción de callo.

REFERENCIAS

[1]Kobayashi D. K., McConnell J. and Griffis J. **2007**. Bougainville. Department of Tropical Plant and Soil Sciences, University of Guam. Hawaii

[2] Cabrera R. J., Armas D. F., Granada C. L. **2006**. Producción de Bugambilia *Bougainvillea spp*. en Morelos. INIFAP.

[3]Evangelista Lozano, S., Manzanares Castro, Y., Escobar Arellano, S. L., Ventura Zapata, E. y Morales Franco L. **2004**. Propagation of three cultivars of *Bougainvillea glabra* Choise by cuttings in different substrates. Proceedings of the Interamerican Society for Tropical Horticulture. 48:181-183.

[4]Estrada G. F. 2003. Propagación por cultivo de tejidos en bouganvilioa (Bougainvillea glabra choisy) variedad sorpresa. Tesis Maestría. Instituto Politécnico Nacional.

[5] Murashige T. and Skoog F. **1962**. A revised médium for rapid growth and bioassays with tabacco tissue cultures. Physiologia Plantarum. 15: 473-497.

[6] Moncada E., Vielma M. y Mora A. **2004**. Inducción *in vitro* de embriogénesis a partir de tejido foliar de *Coffea arábica L*. Variedad Cantauí Amarillo. Academia. 1:1-6

5° Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

THE EFFECT OF TWO POLYMERS WITH POTENTIAL FOR THE RETENTION OF SOIL ON HERBACEOUS PLANTS GERMINATION

(Efecto de dos polímeros con potencial para la retención del suelo en la germinación de plantas herbáceas)

Edith Gutiérrez-Fernández[a]*, Ana Aguilar-Chama[b], Roger Guevara-Hernandez[b+].

[a] Facultad de Biología, Universidad Veracruzana
[b] Red de Biología Evolutiva, Instituto de Ecología A.C.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: roger.guevara@inecol.mx

Área del Conocimiento: Química Agronómica.

ABSTRACT
Nowadays the accelerated transformation and changes in soil use have caused an increase in the disappearance of the natural vegetation cover. The removal of vegetation leads to the loss of soil by the direct action of rainfall, runoff and wind. Restoring vegetation cover especially in areas of slope is the best protection against soil loss. The use of synthetic polymers to give stability to the soil is one of several alternatives. The aim of this study was to evaluate the effect of two polymers in the germination of two herbaceous species for which microcosm experiment was performed. In plastic pots (15 cm high x 7cm diameter) with sterile substrate (soil:sand, 2:1), were applied the treatments: a) seeds + polymer A, b) seeds + polymer B and c) control, adding 0.15 g of *Bouteloua gracillis* seeds and 1 g of *Vicia sativa*. Polymer treatments included in all cases, dilutions of 1:7 to 1:10 (polymer: water). In total there were 12 replicates per treatment and 3 for dilution. After six weeks the number of germinated seeds was evaluated. It was observed that the polymer had a penetration about 1 cm in the substrate. *Vicia sativa* germinated 70% more than the control in dilutions 1:7 to 1:10 and no differences were observed between polymers, dilution or interaction between these. In the case of *Bouteloua gracilis* was observed increased germination relative to the control (on average 2.5 times) when the seeds were in the polymer B, and even appears to increase in dilutions 1: 8 and 1: 9 no significant differences observed with dilutions 1:7 and 1:10. By contrast with the polymer A, the germination was just 40% relative to control and no significant difference between dilutions were detected. For *Bouteloua gracilis,* the polymer B appears to have a scarifying action increasing seed germination relative to control.

Keywords: revegetation, erosion, slopes, stabilization.

MICROMORPHOLOGY OF STEM AND ROOT OF MAIZE PLANTS TREATED WITH NANOPARTICLES OF IRON, TITANIUM AND ZINC, IN GREENHOUSE

(Micromorfología de tallo y raíz de plantas de maíz tratadas con nanopartículas de hierro, titanio y zinc, bajo invernadero)

Francisca Ramírez Godina[a*], Fabián Fernández Luqueño[b], Valentín Robledo Torres[a], Leticia Escobedo Bocardo[a], Hermila Trinidad García Osuna[a]

[a]Departamento de Fitomejoramiento, Departamento de Horticultura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Calzada Antonio Narro No.1923, Saltillo Coah. México.
[b]Centro de Investigación y de Estudios Avanzados CINVESTAV. Sustentabilidad de los Recursos Naturales y Energía. Avenida Industrial Metalúrgica No. 1062, C.P. 25900, Parque Industrial Saltillo-Ramos Arizpe, Coah. México.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: godramf@gmail.com

Área del Conocimiento: Química Agronómica

ABSTRACT
The objective of this study was to evaluate the effect of nanoparticles in the micromorphology of roots and stems of corn grow in greenhouse, because is unknown the impact of nanoparticles on the micromorphology of plants and their development. The work was conducted at the Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro in Saltillo, Coahuila. Nanoparticles of magnetite, ferrihydrite, hematite, zinc oxide and titanium oxide were applied to corn plants in 3 and 6g.L^{-1} and a control, were taken samples of tissues to 23 and 73 days of growth. The samples were processed by paraffin histology technique, and the xylem vessels area, number of vessels of xylem in root and stem, cross sections were evaluated. In roots was found that the area of xylem vessels was increased by applying magnetite in 3 and 6 g.L^{-1}, at 23 and 73 days of growth, exceeding to the in witness 389 and 178.09 % respectively, but with the application of the five nanoparticles was decreased the number of xylem vessels for vascular bundle in root in the two samples. In stems to 23 days was increased the xylem vessels area in 22.05% with ferrihydrite to 3 g.L^{-1}, however to 73 days with zinc oxide to 3 g.L^{-1}, was 68.56% more area compared with the control , the application of magnetite to 6 g/l and hematite to 3 g/l, increased the number of xylem vessels in stems at 23 days by 20% compared with the control, the titanium dioxide to 73 days increased the number of xylem vessels by 50% compared with the control. The micromorphology of flow tissue was modified with applied nanoparticles magnetite and ferrihydrite in corn, and the effect depends on the type and concentration of nanoparticle that is supplied to the plant.

Keywords: xylem vessels; stems; root; histology.

RESUMEN
El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de nanopartículas a nivel micromorfológico en raíz y tallo de maíz bajo invernadero, debido a que se desconoce el impacto de las nanopartículas en la micromorfología de las plantas y su desarrollo. El trabajo se realizó en la Universidad Autónoma Agraria

Antonio Narro en Saltillo, Coahuila. Se utilizaron plantas de maíz a las que se le aplicaron nanopartículas de magnetita, ferrihidrita, hematita, óxido de zinc y dióxido de titanio a 3 y 6 $g.L^{-1}$ más un testigo, los muestreos fueron a 23 y 73 días de desarrollo. Las muestras fueron procesadas por la técnica de la parafina, se evaluó área vasos de xilema, número de vasos de xilema en raíz y tallo en cortes transversales. En raíces se encontró que el área de vasos de xilema aumentó al aplicar magnetita en 3 y 6 $g.L^{-1}$, a 23 y 73 días de crecimiento, superando al testigo en 389 y 178.09% respectivamente, pero con la aplicación de las cinco nanopartículas disminuyó el número de vasos de xilema por haz vascular en raíz en los dos muestreos. En tallos de 23 días aumentó el área de vasos de xilema en un 22.05% con la ferrihidrita a 3 $g.L^{-1}$, a 73 días el óxido de zinc a 3 $g.L^{-1}$ produjo 68.56% mas área comparado con el testigo, la aplicación de magnetita a 6 $g.L^{-1}$ y hematita a 3 $g.L^{-1}$ aumento el número de vasos de xilema en tallo de 23 días en un 20% comparado con el testigo, el dióxido de titanio a 73 días aumentó el número de vasos de xilema en 50% en comparación con el testigo. La micromorfología de tejidos de conducción sufrió modificaciones con nanopartículas de magnetita y ferrihidrita en maíz, y el efecto dependerá del tipo de nanopartícula y la concentración que se le suministre a la planta.

Palabras Clave: vasos de xilema; tallo; raíz; histología.

INTRODUCCIÓN

Con el surgimiento de la nanotecnología se han abierto una serie de posibilidades con respecto a lo que se pueden hacer con las naopartículas para potencializar tecnologías existentes. La nanotecnología se refiere al diseño, síntesis, caracterización y aplicación de materiales que tienen su funcionalidad en la escala de los nanómetros (nm), en un rango que puede variar desde pocos nanómetros hasta los 100 nm [1]. Las nanopartículas generadas a través de los procesos de producción o durante los procesos de combustión en la industria tienen el potencial para entrar en contacto con los cultivos y plantas silvestres. Investigaciones demuestran el efecto de las nanopartículas en los cultivos como *Cucúrbita pepo* donde la germinación de la semilla y la elongación de las raíces no fueron significativamente diferentes en presencia de 1.0 $mg{\cdot}L^{-1}$de ZnO, mientras que el Cu y Ag inhibieron el crecimiento de la raíz [2]. En un estudio con nanopartículas de óxido de zinc administradas a *Lolium perenne* L. (ryegrass) en concentraciones de 8 a 1000 $mg{\cdot}L^{-1}$ encontraron que estas se translocaron en la endodermis y células de la planta, además provocó daño severo en la raíz, provocando gran inhibición del crecimiento de la planta [3]. Nanotubos carbono mostraron afectaciones significativas en la zona de elongación radicular de cultivos como tomate, repollo, zanahoria y lechuga [4]. Estudios realizados con nanopartículas de TiO^2 a concentraciones de 2.5 a 40 g kg^{-1} de suelo, mejoraron el crecimiento de la espinaca [5]. Se ha demostrado que nanopartículas Titanio, Hierro y Zinc recubiertas de carbono pueden penetrar fácilmente a la raíz de cuatro especies de plantas cultivadas (guisante, girasol, tomate y trigo) [6]. Las nanopartículas liberadas diariamente al ambiente a través de los procesos de producción o durante los procesos de combustión en la industria (termoeléctrica, ladrillera, cementera, etc.) son fuente de contaminación, el cual podría causar efectos toxicológicos afectando el medio ambiente. Las nanopartículas son utilizadas en la actualidad en diversos ámbitos como la industria, medicina, cosméticos, entre otros productos comerciales, siendo liberadas potencialmente en diversas concentraciones al medio ambiente, teniendo efectos y propiedades diferentes a la de los materiales en tamaños normales y en pocos años se puede convertir en un problema ecotoxicológico que pueden ocasionar riesgos para la salud del hombre y de otras especies [7].

En México aún no hay investigaciones que evalúen el efecto potencial en las biotransformaciones de

cultivos, y la posible transmisión para la próxima generación de plantas expuestas a los nanomateriales, surge entonces la necesidad utilizar nanopartículas con el fin de determinar si este tipo de materiales podría favorecer o perjudicar la obtención de plantas con potencial. Es por eso que con esta investigación se pretende conocer cuál es la repuesta de las plantas a nivel histológico con la aplicación de dos concentraciones de Nanopartículas de Hierro,Titanio y Zinc en plantas de maíz.

METODOLOGÍA

Establecimiento del cultivo

El trabajo se realizó en el invernadero del CINVESTAV Unidad Saltillo y Laboratorio de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en Saltillo, Coahuila, México. Se utilizó semilla de maíz de la variedad Antonio Narro (VAN-210). Para el establecimiento de cultivo en invernadero se utilizaron bolsas de polietileno color negro de 22 x 42 cm, con 7 kg de suelo y un total de 28 bolsas. Un día antes de la siembra se realizó una saturación de suelo con 1.5 litros de agua, posteriormente se sembraron dos semillas por bolsa, se realizaron riegos cada tercer día.

Aplicación de Nanopartículas

Para la preparación de las soluciones de nanopartículas, se disolvieron 30 gramos de cada una de las cinco nanoparticulas para la primera concentración y 60 gramos para la segunda en 10 litros de agua desionizada, para obtener dos concentraciones 3 $g.L^{-1}$ y 6 $g.L^{-1}$. Estableciéndose 11 tratamientos donde se aplicaron las siguientes nanoparticulas: Magnetita 3 y 6 $g.L^{-1}$, Hematita 3 y 6 $g.L^{-1}$, Ferrihidrita 3 y 6 $g.L^{-1}$, Óxido de zinc 3 y 6 $g.L^{-1}$, Dióxido de titanio 3 y 6 $g.L^{-1}$ y el testigo sin nanopartículas. Se realizaron cinco aplicaciones de 300 ml con nanopartículas de acuerdo al tratamiento, cada aplicación tuvo una separación de 15 días cuidando de no tener contacto directo con las hojas de las plantas. Las nanopartículas que se utilizaron se obtuvieron de la empresa Materiales Nano estructurados S.A de C.V.

Análisis Histológico de tallo y raíz

A lo largo del proyecto se realizaron dos muestreos destructivos, las muestras de tejidos de cada tratamiento se tomaron a los 23 y 73 días después de la siembra, de la siguiente forma; se cortaron trozos (1cm) de tallo en fresco a 5 cm de altura y trozos (1cm) de raíz a 5 cm de desarrollo de la misma. Se utilizó la técnica de la parafina como sigue: Para conservar los tejidos con un mínimo de alteraciones se procedió a la fijación, colocando los tallos y las raíces, en fijador Formaldehido Ácido Acético Glacial FAA, (5 ml de formaldehido 36-40 %, 5 ml de ácido acético glacial y 90 ml de alcohol etílico al 70%). En el que permanecieron como mínimo ocho días. Trascurrido el tiempo de fijación se pasaron los tejidos a deshidratación alcohólica la cual consiste en quitar el agua de los tejidos para esto se pasó la muestra por diferentes agentes deshidratantes, soluciones de alcohol etílico al 50, 60, 70, 85 y 96 % más colorante eosina para diferenciarlos; continuando con alcohol etílico absoluto I, alcohol etílico absoluto II, alcohol etílico absoluto más xilol en proporciones de 3:1, alcohol etílico absoluto más xilol en proporciones de 1:1, alcohol etílico absoluto más xilol en proporciones de 1:3, xilol puro I y xilol puro II, en esta serie de soluciones permanecerán por intervalos de dos horas en cada una. Después de la deshidratación los tejidos se colocaron en frascos con xilol, posteriormente se pasaron a estufa a 30 ºC, agregando parafina y ahí permanecieron por 24 horas a la misma temperatura, después se cambian a 45 ºC agregando parafina hasta saturar, en seguida se vacía a moldes de aluminio, donde se acomodan los tejidos con su etiqueta [8, 9, 10]. El cuadro de parafina con el tejido se colocó en la platina del micrótomo (“820” Spencer American Optical), los cortes fueron transversales a 20 micras de grosor. La tira de parafina obtenida con 5 cortes, se pegaron sobre portaobjetos con adhesivo de Haupt (1g de

gelatina, 15 ml de glicerina, 2g de metabisulfito de sodio por cada 100 ml de agua destilada) y unas gotas de agua destilada, además se dio calor hasta que el tejido queda bien adherido y extendido. Para la tinción se uso la doble coloración de safranina-fast green, donde pasaron por diferentes soluciones de alcohol y xilol. Se sellaron con una gota de bálsamo de canadá y encima un cubreobjetos. Así las preparaciones se pusieron a secar en una estufa a 30 ºC por espacio de una semana. Para el análisis de imágenes se seleccionaron las muestras de tejidos que mejor exhibían las variables a evaluar por tratamiento. Se tomaron 15 fotografías con los objetivos de 5, 10 y 40X por tratamiento. Se evaluó el área de vasos del xilema y el número de vasos de xilema, en tallo y raíz. Se utilizó un microscopio Vista Visión con cámara digital Pixera Winder Pro y un software de medición AxionVision versión 4.8. Se realizó una comparación de medias de los valores obtenidos con los 11 tratamientos (5 nanopartículas por 2 concentraciones más un testigo).

RESULTADOS

Área de vasos de xilema de raíz de maíz.

El área de vasos de xilema en cortes trasversales en raíz de maíz a 23 días de desarrollo, se incrementó notablemente con la aplicación de nanopartículas dado que nueve tratamientos superaron al testigo, solo uno fue menor al testigo (935 μm^2), el mayor aumento (4572 μm^2) fue al aplicar las nanopartículas de magnetita a concentración de 3 $g.L^{-1}$ y superó al testigo en un 389%, mientras que a 73 días de desarrollo de las plantas, el aumento fue general ya que todos los tratamientos superaron al testigo, la mayor área de vasos de xilema fue al aplicar nanopartículas de magnetita a concentración de 6 $g.L^{-1}$ (7958 μm^2) ya que superó al testigo (2862 μm^2) en un 178.09% (Figura 1A y Figura 3).

Número de vasos de xilema de la raíz de maíz

En la Figura 1B, en raíz de plantas de maíz a 23 días de desarrollo se observa que el testigo presentó 12 vasos de xilema y supero a todos los tratamientos con aplicación de nanopartículas, dejando en claro que las nanopartículas pueden reducir el número de vasos de xilema en las plantas jóvenes. Mientras que en plantas de 73 días de desarrollo se observa que cuatro tratamientos con nanopartículas presentaron mayor número de vasos de xilema, observando que con la aplicación de las cinco nanopartículas a sus dos concentraciones se tuvieron de 8 a 22 vasos de xilema, el testigo tuvo 18 vasos y fue superado en un 22.22% con la aplicación de las nanopartículas de ferrihidrita a 6 $g.L^{-1}$ y dióxido de titanio a 3 $g.L^{-1}$ (Figura 1B y Figura 3).

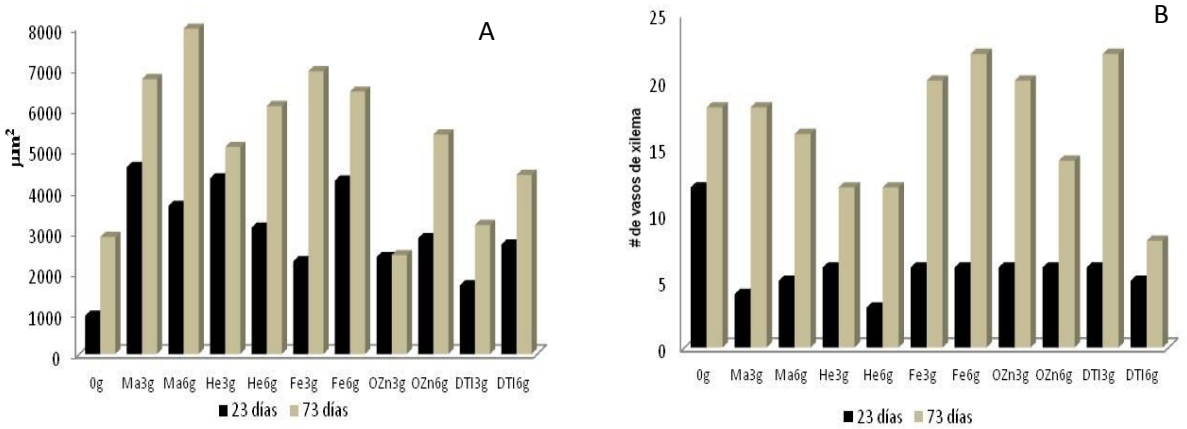


Figura 1. Área de vasos de xilema (A) y número de vasos de xilema (B) de cortes transversales en raíz de plantas de maíz a 23 y 73 días de crecimiento, acondicionado con cinco nanopartículas (Magnetita, Hematita, Ferrihidrita, Oxido de Zinc y Dióxido de titanio) a dos concentraciones 3 y 6 g.L^{-1} y el testigo.

Área de vasos del xilema del tallo del maíz

En el área de vasos de xilema de tallo a 23 días de desarrollo se puede observar que solo la aplicación de magnetita y hematita a 6 g.L^{-1} y ferrihidrita a 3 g.L^{-1} superaron al testigo, presentándose la mayor proporción de área de vasos de xilema en tallo con la nanopartícula ferrihiditra a 3 g.L^{-1} (935 µm^2), quien supero al testigo (766 µm^2) en un 22.05%. A diferencia de las plantas con 73 días de desarrollo el testigo con un área de vasos de xilema de (2220 µm^2) fue superado por ocho de los tratamientos, encontrándose que el mayor tamaño de vasos de xilema en tallo lo presentaron las plantas a las que se les aplicó la nanopartículas de Óxido de Zinc a una concentración de 3 g.L^{-1} (3743 µm^2) superando al testigo en un 68.56% (Figura 2A y Figura 3).

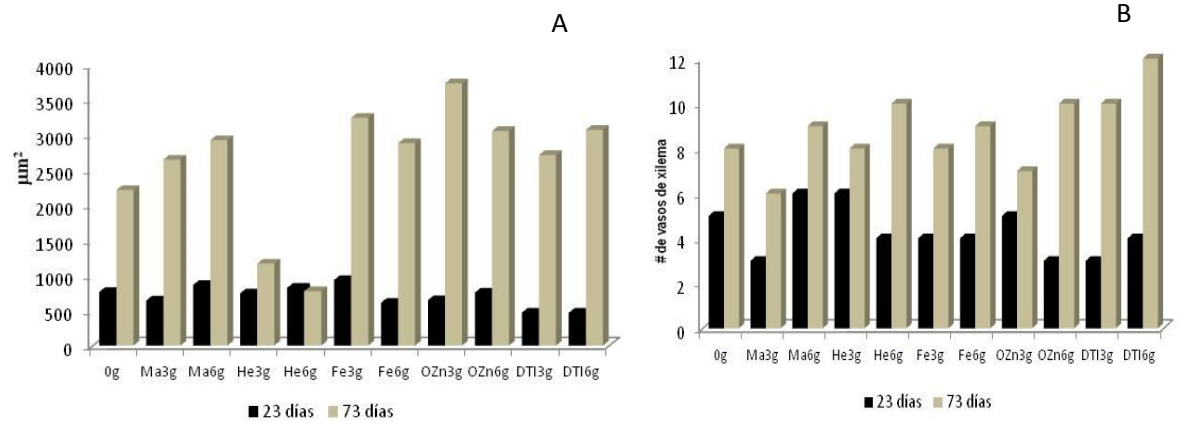


Figura 2. Área de vasos de xilema (A) y número de vasos de xilema (B) de cortes transversales en Tallo de plantas de maíz a 23 y 73 días de crecimiento, acondicionado con cinco nanopartículas (Magnetita, Hematita, Ferrihidrita, Óxido de Zinc y Dióxido de titanio) a dos concentraciones 3 y 6 g.L^{-1} y el testigo.

Número de vasos de xilema en el tallo del maíz

En plantas con 23 días de desarrollo, solo los tratamientos con magnetita a 6 $g.L^{-1}$ y la hematita a 3 $g.L^{-1}$ superaron en el número de vasos de xilema en 20% al testigo, mientras que a 73 días de desarrollo seis tratamientos superaron al testigo, y las nanopartículas de dióxido de titanio aumentaron el número de vasos de xilema en un 50% más comparado con el testigo (Figura 2B). Sin embargo el aumento de número de vasos en tallo fue muy bajo, comportándose de la misma forma que en la raíz, observándose que con la aplicación nanopartículas aumentó el tamaño de los vasos de xilema en raíz y tallo de plantas de maíz, pero disminuyó el número de vasos de xilema.

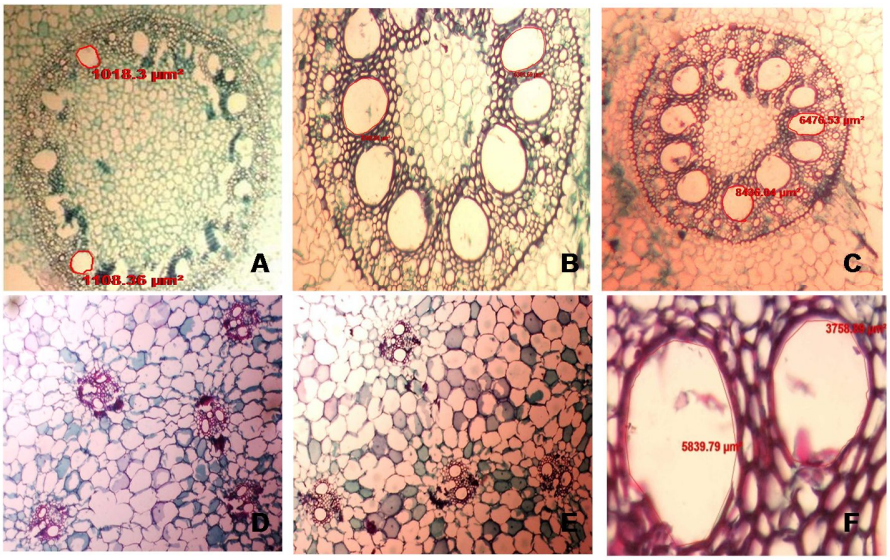


Figura 3. Cortes transversales de raíz y tallo de maíz tratadas con nanopartículas. A) testigo de raíz 5X, B) Magnetita a 6 $g.L^{-1}$ 10X, C) Hematita a 6 $g.L^{-1}$ 5X, D) testigo de tallo 5X, E) Ferrihidrita a 3 $g.L^{-1}$ 5X, F) Dióxido de titanio a 6 $g.L^{-1}$ 40X.

DISCUSIÓN

La aplicación de la nanopartícula a base de magnetita puede incrementar el área de vasos de xilema lo cual podrían resultar en un mejor desarrollo y producción de las plantas y dada la importancia de estos tejidos en la conducción de agua y nutrientes, en éste sentido se menciona que la mayoría de las nanopartículas son necesarias en concentraciones altas para ocasionar un efecto en las plantas [5], aunque en algunos trabajos no se observan resultados significativos por la presencia de nanopartículas, pero los efectos son más notorios cuando estas nanopartículas son acompañadas por un estabilizador.

Estos resultados difieren con lo encontrado en otros trabajos donde se indica que la influencia de suspensiones de nanopartículas magnéticas sobre las células de diferentes cultivos presentan una tendencia general de inhibición en la proliferación de plantas [11], de igual forma se encontró que las nanopartículas de óxido de zinc administradas a Lolium perenne L. (ryegrass) en concentraciones de 8 a1,000 mg L^{-1} se acumularon en la endodermis y demás células de la planta, además se observó daño severo en la raíz, provocando inhibición del crecimiento de la planta [3].

En plantas de calabaza (*Cucurbita maxima*), que se cultivaron en un medio que contenía nanopartículas de magnetita acuosa (Fe^3O^4), encontró que éstas partículas se pueden absorber, trasladar y acumular en

los tejidos de la planta [12]. Sin embargo [13], se menciona que el efecto de las nanopartículas sobre las plantas está determinada por numerosos factores que operan dentro del sistema de nanopartículas-suelo-planta encontrando diferencias considerables en los niveles de fitotoxicidad observados en los experimentos hidropónicos y los obtenidos en cultivos en suelo.

CONCLUSIONES

La aplicación de nanopartículas de magnetita y ferrihidrita y óxido de zinc, evidenciaron que los vasos de xilema aumentaron su tamaño, pero disminuyeron en número en raíz y tallo de plantas de maíz, encontrándose que los efectos se observaron mejor en plantas adultas.

Las modificaciones micromorfológicas de tejidos de conducción en plantas de maíz, dependerá del tipo de nanopartícula y la concentración que se le suministre a las plantas, estas modificaciones podrían aumentar o inhibir el crecimiento de las plantas dependiendo del ambiente donde se desarrollen.

REFERENCIAS

[1] Reisner, D. (2008). Bionanotechnology. Global Prospects. CRC Press, Taylos & Francis Group. Florida, Estados Unidos. 349 p.

[2] Stampoulis, D., Sinha, S.K., White, J.C. (2009). “Ensayo dependiente fitotoxicidad de las nanopartículas a las plantas”. Environ Sci Technol. 43:9473–9479

[3] Lin, D., Xing, B. (2008). “Raíz de captación y fitotoxicidad de nanopartículas de ZnO”. Ciencia y Tecnología del Medio Ambiente. 42 (15): 5580-5585.

[4] Cañas, J. E., Long, M., Nations, S., Vadan, R., Dai, L., Luo, M., Ambikapathi, R., Lee, H., Olszyk, D. (2008). “Efectos de los nanotubos de carbono de pared simple funcionalizados y no funcionalizados en el alargamiento de la raíz de las especies de cultivos seleccionados”. Ciencia y Tecnología del Medio Ambiente. 27 (9): 1922–1931.

[5] Xingmao, M., Geiser-Lee, J., Deng, Y., Kolmakov, A. (2010) “Las interacciones entre las nanopartículas artificiales (ENPS) y plantas: fitotoxicidad, la absorción y la acumulación”. Science of the Total Environment. 408 (16): 3053–3061.

[6] Cifuentes, Z., Custardoy, L., Fuente J. M. de la., Marquina, C., Ibarra, M. R., Rubiales, D., Pérez, A. de L. (2011). Absorción y traslocación a la parte aérea de nanopartículas magnéticas a través de la raíz de diferentes cultivos. III Encuentro sobre Nanociencia y Nanotecnología de Investigadores y Tecnólogos Andaluces. Ed. Universidad de Córdoba. Área de Mejora y Biotecnología. P 38.

[7] Weiss, C., Diabate, S. (2011). A special issue on nanotoxicology. Arch Toxicol 85(7): 705–706.

[8] Hernández, S.M. (1990). Manual de Laboratorio Citología y Citogenética. Editorial Trillas. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro 105 p.

[9] Cañizares, A., Sanabria M., Rojas, E. (2005). “Anatomía de la hoja de Lima Tahití (Citrus latifolia Tanaka)”. Revista UDO Agrícola, 5(1): 68–73.

[10] Jáuregui, D. (2003). Manual Práctico de Microtecnia Vegetal. Departamento de Botánica Agrícola. Laboratorio de Botánica. Facultad de Agronomía. Postgrado de Botánica Agrícola. Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela. 71 p.

[11] Focacini, E., Capraru, G., Creanga, D. (2010). Comparative Cytogenetic Study on the Toxicity of Magnetite and Zinc Ferrite Nanoparticles in Sunflower Root Cells. Rev. AIP Conference Proceedings 7: 131-345.

[12] Oparka, K. J. (2004). "Getting the message across: how do plant cells exchange macromolecular complexes?". Trends in plant science, 9(1): 33-41.

[13] Jósko, I., Oleszczuk, P. (2013). "Influence of soil type and environmental conditions on ZnO, TiO^2 and Ni nanoparticles phytotoxicity". Chemosphere. 92 (1): 91-99.



EVALUATION OF FOLIAR FERTILIZERS IN PEANUT YIELDS (*Arachis hypogaea* L.)

[(Evaluación de fertilizantes foliares en el rendimiento de cacahuate (*Arachis hypogaea L.*)]

Julio César León Vargas*[+a], Luis Patricio Guevara Acevedo[b], Enrique AndrioEnriquez[b], Raúl René Robles Lacayo[b], Davino Pérez Mendoza[b,] Hugo Cesar Cisneros López[b].

[a] Instituto Tecnológico de Roque. Departamento de Ciencias Agropecuarias

*Autor que presentó el trabajo: Julio Cesar León Vargas
+Autor para correspondencia: julioitroque@gmail.com.mx

Área del Conocimiento: Química Agronómica

ABSTRACT
One of the main problems peanut production faces in Bajio Guanajuato region is nutrition due to light or nule application of solid or foliar fertilizers and the lack of information about it. Based on that, the objective of this investigation was to evaluate the effect of foliar fertilizers on peanut yields. The experiment took place on a 2,592 m^2 plot, the plantation was done manually on 180m long and 90cm wide rows, using 540 seeds per row on average, spaced at 35cm each. After 40 days an application of 2kg calcium carbonate and 250mL of Maxi-Grow Excel with 250mL of Inex as adherent was made. After another 40 days (80dds) the treatments to evaluate were applied on a ramdom blocks experimental design with 16 repetitions. Three treatments were evaluated: 250 Kg ha^{-1} of calcium carbonate, 2 L ha^{-1} of Poliquel Multi® with 2 Kg ha^{-1} of Kelatex Ca-B® and 500 mL ha^{-1} of Delfan plus®and an absolute check. Harvest was done manually. All the plants in 3m long and 2 central rows were collected of each experimental unit only. Plants and fruits were placed in paper bags and labeled. The variables evaluated were: fresh weight, dry weight, biomass, number of fruits per plant and number of seeds in 100 fruits. Variance analysis and mean test (Tukey, $\alpha = 0.05$) was performed. Results show that the treatment with micronutrients had the mayor fresh weight with 0.76833kg per plant, meanwhile the treatment with Ca+B and amino acids had the mayor weight on average for fruit fresh weight, biomass, number of fruits per plant and number of seeds on 100 fruits.

Keywords: peanut, foliar fertilization, yield, fruit

REFLECTANCE IN LEAVES AND ITS RELATIONSHIP WITH NITROGEN IN CORN CROP

(Reflectancia en hojas y su relación con el nitrógeno en el cultivo de maíz)

José Guadalupe Quintana Quiroz[a]*, Gabriel Antonio Lugo García[b+], Álvaro Reyes Olivas[b], Bardo Heleodoro Sánchez Soto[b], Carlos Patricio Sauceda Acosta[b].

[a] Estudiante de Doctorado, Universidad Autónoma de Sinaloa
[b] Facultad de Agricultura del Valle del Fuerte, UAS.

*Autor que presentó el trabajo.
+ Autor para correspondencia: gabriel_lugo9010@hotmail.com
Área del Conocimiento: Química agronómica.

ABSTRACT
Over fertilization of nitrogen (N) is a common practice in the fields of northern Sinaloa, so the risks are increased by contamination, affecting not only the profitability of the crop. The objective of this study is to measure the reflectance of RGB model components in corn leaves scanned under the assumption that any of the RGB components can relate to the state of nitrogen in the crop. The work was established in a greenhouse of the Faculty of Agriculture of the Valle del Fuerte in Sinaloa Juan Jose Ríos, the December 15, 2014 DK-2038 hybrid was sowed in black polyethylene bags (48 experimental units) filled with sand. Treatments consisted of increasing doses of nitrogen (100, 200, 300 and 400 ppm) applied in irrigation from the seven-stage vegetative leaves (V7) in a randomized block design with four replications. The reflectance of corn leaves and Greenness Index (GI) with Spad 502 was measured in the V7, V8, Leaf Flag (LF), and female flowering (FF) stages and grain weight was obtained from each unit experimental. Analysis of variance and means comparison was made. The greater weight of grain was presented with a dose of 300 ppm of N, significant differences were observed in the V8, VT and FF stages for the color components R and G, for component B no statistical differences were observed for doses produced N, LF stage further adjustment of the coefficient of determination (R2 = 0.71) was distinguished even higher the GI (r^2 = 0.68). The GI had the best adjustment in stages V8 (r^2 = 0.47) and FF (r^2 = 0.41). The reflectance of G and R color scanner measure may represent an economical and viable for the diagnosis of nitrogen in land planted to corn in northern Sinaloa option.

Keywords: RGB, Spad, Corn, Contamination.

RESUMEN
La sobre fertilización de nitrógeno (N) es una práctica común en los campos agrícolas del norte de Sinaloa, por lo que se incrementan los riesgos por contaminación, afectando no solo la rentabilidad del cultivo. El objetivo del trabajo es medir la reflectancia de los componentes del modelo RGB en hojas de maíz escaneadas, bajo el supuesto que alguno de los componentes RGB pueden relacionarse con el estado del nitrógeno en el cultivo. El trabajo se estableció en un invernadero de la Facultad de Agronomía del Valle del Fuerte en Juan José Ríos Sinaloa, el 15 de Diciembre de 2014 se sembró el híbrido DK-2038, en bolsas de polietileno negro (48 unidades experimentales) rellenas con arena. Los tratamientos consistieron en dosis crecientes de nitrógeno (100, 200, 300 y 400 ppm) aplicados en el riego a partir de la etapa de siete hojas vegetativas (V7), en un diseño de bloques al azar con cuatro

repeticiones. Se midió la reflectancia de hojas de maíz y el Índice de Verdor (IV) con el clorofilometro Spad 502 en las etapas V7, V8, Hoja bandera (VT), y Floración femenina (FF) y se obtuvo el peso de grano de cada unidad experimental. Se realizaron análisis de varianza y comparación de medias. El mayor peso de grano se presentó con la dosis de 300 ppm de N, se observaron diferencias significativas en las etapas V8, VT y FF para los componentes de color R y G, para el componente B no se apreciaron diferencia estadística producida por las dosis de N, en etapa de VT se distinguió un mayor ajuste del coeficiente de determinación (r^2=0.71) incluso superior que el IV (r^2=0.68). El IV tuvo un mejor ajuste en las etapas de V8 (r^2=0.47) y FF (r^2=0.41). La reflectancia de color en la banda G y R medida con escáner puede representar una opción económica y viable para el diagnóstico del nitrógeno en predios sembrados con maíz en el norte de Sinaloa.

Palabras Clave: RGB, Spad, Maíz, Contaminación.

INTRODUCCIÓN

La fertilización química es considerada como el aporte más importante de nutrientes en la mayoría de los cultivos, en este rubro el nitrógeno es crucial ya que puede tener un alto impacto en el rendimiento potencial de la cosecha, así como en los costos de producción, sobre todo en cereales ya que no pueden fijar nitrógeno como las leguminosas. El alto costo de los fertilizantes y su baja eficiencia de aplicación sugieren el desarrollo e implementación de técnicas que mejoran la forma en que se realizan las recomendaciones de éste nutriente durante la temporada de desarrollo del cultivo, ya que se ha determinado la eficiencia no supera el 50% [1]. Actualmente se emplean diversos métodos para realizar las recomendaciones de nutrientes previo al establecimiento de los cultivos y durante el periodo de crecimiento, entre los más conocidos se encuentran los análisis de suelo o de tejido vegetal, además de equipos de medición en campo para la estimación rápida de nutrientes como los cardis y sensores infrarrojos (Greenseeker y SPAD), los cuales se ha demostrado su eficiencia en la recomendación de nitrógeno y un alto grado de adopción en países desarrollados.

La coloración de las plantas tiene el potencial de indicar el estado del N en los cultivos, sin embargo condiciones diferentes a deficiencias de este nutriente pueden afectar o limitar el diagnóstico, como lo podrían ser condiciones de iluminación, valores propios de coloración de los híbridos, mantener constante la incidencia de la luz sobre la hoja así como el ángulo de adquisición de la imagen. De acuerdo con Chapelle [2], las hojas de los cultivos tienen la capacidad de absorber la luz visible de forma selectiva, en este sentido los pigmentos fotosintéticos de las plantas absorben principalmente azul (B, 450 nm) y rojo (R, 660 nm) reflejando el color verde (G, 550 nm). El procesamiento de imágenes se ha utilizado para detectar el cambio de color de las hojas y poder estimar el contenido de nutriente de los cultivos. En las últimas décadas se han utilizado de la medición en el modelo del espacio de color del RGB, con la adquisición de imágenes con cámaras digitales [3]. Yuzhu et al [4] midieron el color de plantas de pimiento a través de imágenes de fotografía y calcularon un índice de cobertura aplicando la siguiente formula G / (R + G + B), encontraron una alta correlación negativa (r=0.763) del índice con el nitrógeno inorgánico del suelo, concentración total de nitrógeno en la planta, concentración de nitratos medidos de peciolos y lecturas SPAD.

Mata et al. [5] estimaron el contenido de nitrógeno en plantas de tomates mediante transformación del RGB a valores de Matiz, Luminancia y Saturación de imágenes adquiridas con cámara digital, los valores de Matiz tuvieron una correlación alta R2=0.86 con valores de nitrógeno obtenido a través de análisis de

laboratorio, respecto a otros métodos propuestos en espacio de color RGB. Además el Matiz fue el menos afectado por variaciones en condiciones de la luz. El empleo de scanner es una opción confiable y de bajo costo en la adquisición de imágenes ya que tiene una fuente de luz propia y la distancia entre la luz y la hoja son constantes, además las correlaciones obtenidas respecto a la obtenida con clorofila medida en laboratorio fueron superiores respecto a métodos no destructivos comerciales [6]. El objetivo del presente trabajo fue determinar el nivel de asociación del color medido en hojas de maíz con las lecturas SPAD utilizando un software de uso libre.

METODOLOGÍA

El estudio se estableció en los invernaderos de la Facultad de Agricultura del Valle del Fuerte, Juan José Ríos, Guasave Sinaloa con coordenadas 25.7561994 Latitud Norte y -108.840290 de Longitud Oeste, a una altitud de 5 msnm, temperatura media anual de 25 °C, máxima de 36 durante los meses de mayo a julio y mínima de 10.5 °C en el mes de enero. La siembra fue el día 15 de diciembre de 2014 en bolsas de polietileno negro con dimensiones de 40 cm de diámetro por 60 cm de alto se empleó arena como sustrato, el híbrido empleado fue el DK-2038.

Se prepararon soluciones nutritivas en base a la solución universal Steiner, la cual se modificó según los tratamientos crecientes de nitrógeno (N), pero se conservó el equilibrio entre cationes y aniones. La solución se mantuvo en recipientes cerrados para evitar el contacto con los rayos solares, la evaporación y presencia de algas; los riegos se aplicaron de forma diaria un total de 400 ml divididos en dos etapas (200 ml por la mañana y 200 ml por la tarde). Los tratamientos consistieron en 100, 200, 300 y 400 ppm de nitrógeno, además se aplicó fósforo potasio calcio magnesio azufre fierro manganeso boro zinc cobre con 31, 273.5, 180, 45, 318, 2, 1, 0.5, 0.1 y 0.1 ppm respectivamente.

El arreglo de los tratamientos mantuvo una densidad de población de 10 plantas por metro cuadrado, cada planta establecida en una bolsa de polietileno consistió en una unidad experimental. Se estableció un total de 48 unidades experimentales producto de cuatro repeticiones y cuatro tratamientos y tres bloques, la medición se realizó en la etapa de V4 (aparición de la cuarta hoja ligulada), V7, V8, VT (Hoja bandera) y FF (Floración Femenina).

Se obtuvieron imágenes con un escáner marca Epson stylus CX5600, se recolectó muestras de la última hoja que presentara lígula y que fuera de reciente aparición. Las muestras fueron tomadas de la parte central de la hoja con un sacabocado de una perforadora (mm) y colocado en un recipiente con agua para evitar la deshidratación de la muestra, posteriormente fue escaneada a 300 pixeles por pulgada en formato JPEG. Se colocó en la tapa del escáner un fomix de color rosa, lo cual permite resaltar el color de la muestra. Una vez adquirida la imagen se procesó con el software imageJ con el empleo de una macro que separa el color en valores RGB (del inglés Red, Green y Blue), las bases de datos fueron manipuladas con el procesador Microsoft Excel. El primer paso consistió en convertir los valores RGB a valores HSB (Matiz, Saturación y Brillo) de acuerdo a lo propuesto por Rorie [7], en base a las siguientes formulas:

Hue (Matiz)

Sí el máximo (RGB) = R, $60*\{(G - B)/[(\max(RGB) - \min(RGB)]\}$

Sí el máximo (RGB) = G, $60*\{2+\{(B - R)/[\max(RGB) - \min(RGB)]\}\}$

Sí el máximo (RGB) = B, $60*\{4+\{(R - G)/[\max(RGB) - \min(RGB)]\}\}$

Saturación
{[max (RGB)–min(RGB)]/max(RGB)}
Brillo
max(RGB)

Una vez convertidos los valores RGB a HSB se procedió a calcular el Índice de Color Verde Oscuro (DGCI por sus siglas en inglés) con la siguiente formula:

DGCI = {[(H – 60)/60 + (1 – S) + (1 –Br)]/3}*-1
Donde:
H =es el Matiz
S=Saturación
Br=Brillo.

Durante el desarrollo del cultivo se estimó la concentración de clorofila con el medidor portátil de clorofila SPAD-502 de marca Minolta. El muestreo se realizó durante las diferentes etapas de crecimiento en la parte media de la hoja recientemente ligulada de la planta, ya que hojas maduras pueden sobre estimar el valor de clorofila (Zhang et. al, 2008). Fueron utilizados como lectura final el promedio de tres lecturas en cada hoja.

Se realizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk y análisis de varianza para los valores de RGB, HSB, DGCI y Peso de Grano y comparación de medias (Tukey $\alpha \leq 0.05$). Los datos obtenidos de lecturas Spad, y reflectancia de imágenes digitales se correlacionaron a través del método de Pearson con los tratamientos, Los valores de Clorofila fueron sometidos a un modelo de regresión cuadrática con los valores de DGCI, componentes R, G del modelo RGB y H, S y B del moldeo HSB.

RESULTADOS
La distribución de la variable RGB, HSB, DGCI y peso de grano fue de forma normal en las diferentes etapas medidas, se observaron valores superiores para cada variable en etapas tempranas del cultivo respecto a etapas posteriores, para los componentes RGB, con forme se presentó el desarrollo del cultivo las lecturas de color disminuyeron proporcionalmente entre las diferentes longitudes de color con valor superior en la variable G y el valor menor en la variable B. Para los valores HSB no se observó un incremento o disminución lógica de los valores a razón de los tratamientos. La relación de la reflectancia con los tratamientos fue alta para la banda de Rojo (R) y Verde (G) en las etapa vegetativa de ocho hojas (V8, R^2=-0.5462), Espiga (VT, R^2=-0.8080) y Floración Femenina (FF, R^2=-0.5741), las etapas de cuatro y siete hojas no mostraron relación del tratamiento respecto a la reflectancia debido a la aplicación de los tratamientos los cuales fueron establecidos a partir de la sexta hoja (V6).

Al igual que los valores medidos del modelo RGB la transformación de estos a valores Matiz (H) tienen correlación con los tratamientos en la etapa de V8 y VT con valores de R^2=-0.3585 y -0.7909 respectivamente, la Saturación (S) -0.35849 -0.81091 y -0.63465 y Brillo (B) -0.58442, -0.82203, -0.48016 presentaron correlaciones medias y altas en las etapas de V8, VT y FF. En el análisis de varianza (Cuadro 1) realizado a las lecturas RGB se observó que los diferentes tratamientos produjeron un efecto estadísticamente diferente para las los valores de R y G, desde la etapa de ocho hojas, para el componente B el análisis no muestra diferencias estadísticas para las diferentes etapas de desarrollo del

cultivo, por lo que el componente G y R pueden mostrar de forma eficiente la deficiencia del nutriente nitrógeno. La etapa de Espiga muestra un mejor ajuste en el análisis de varianza con una r^2 superior a las demás etapas.

No se observa diferencia estadística en los tratamientos de 300 y 400 ppm de nitrógeno (N) para el componente G y R en la etapa de espiga (VT), en cambio para los tratamientos de 100 y 200 ppm es notable, en la etapa V8 y FF a partir del tratamiento de 200 ppm se puede observar efectos mínimos respecto del nutriente. El mejor peso de grano lo obtuvo el tratamiento de 300 ppm de N con 155.23 g y no se observan diferencias estadísticas respecto al tratamiento de 400 (149.07 g), el tratamiento de 100 ppm de N peso 123.12 g, mientras que el peso del grano del tratamiento de 200 peso 137.21 g.

Tabla 1. Valores medios de R, G y B en las etapas vegetativas en ocho hojas (V8), Espiga (VT) y Floración femenina (FF).

TRAT (ppm de N)	RV8	GV8	BV8	RVT	GVT	BVT	RFF	GFF	BFF
100	53.13a	69.67a	22.851	52.951	53.966a	25.266	52.573a	49.534a	26.257
200	50.77ab	64.342ab	25.41	48.563	49.165b	25.484	47.169ab	44.526ab	27.766
300	45.96bc	60.18bc	22.79	42.979	43.035c	25.039	43.08b	41.585b	27.375
400	42.86c	55.764c	22.669	40.409	39.241c	26.102	41.518b	41.824b	27.938
DMS	6.93	8.1	4.36	3.94	4.06	3.16	6.67	7.35	4
R^2	0.3	0.34	0.08	0.66	0.71	0.02	0.35	0.2	0.05

La relación que guarda el espacio de color RGB respecto a las dosis de nitrógeno aplicadas el análisis de varianza el modelo HSB (Cuadro 2), tiene coeficientes de determinación altos en la etapas de Espiga, esto debido al efecto de los tratamientos y la similitud con el espacio de color RGB, se podría atribuir al hecho de que no existió interferencia por condiciones de luz, ya que el escáner permite mantener constante la cantidad y ángulo de incidencia de la luz.

Tabla 2. Valores medios de H, S y B en las etapas vegetativas de ocho hojas (V8) y reproductivas de Espiga (VT) y Floración Femenina (FF).

Trat (ppm de N)	Hv8	Sv8	Brv8	Hvt	Svt	Brvt	Hff	Sff	Brff
100	81.339	0.67a	69.67a	62.01a	0.53a	53.99a	55.812	0.49a	52.60a
200	80.836	0.60ab	64.34ab	61.44ab	0.48a	49.23b	53.887	0.41b	47.37ab
300	82.653	0.62ab	60.18bc	60.06b	0.42b	43.18c	53.349	0.37b	43.86b
400	83.777	0.59b	55.76c	55.05c	0.35c	40.41c	51.818	0.36b	43.32b
DMS	2.959	0.07	8.10	1.76	0.0541	4.05	13.04	0.07	6.83
R^2	0.164	0.05	0.34	0.76	0.66134	0.69	0.02	0.45	0.28

En la figura 1 se presentan los modelos de regresión para las variables de reflectancia con los valores de índice de verdor, se puede observar que el modelo DGCI presenta el mejor ajuste del coeficiente de determinación, el mejor coeficiente de correlación se aprecia en el componente Verde.

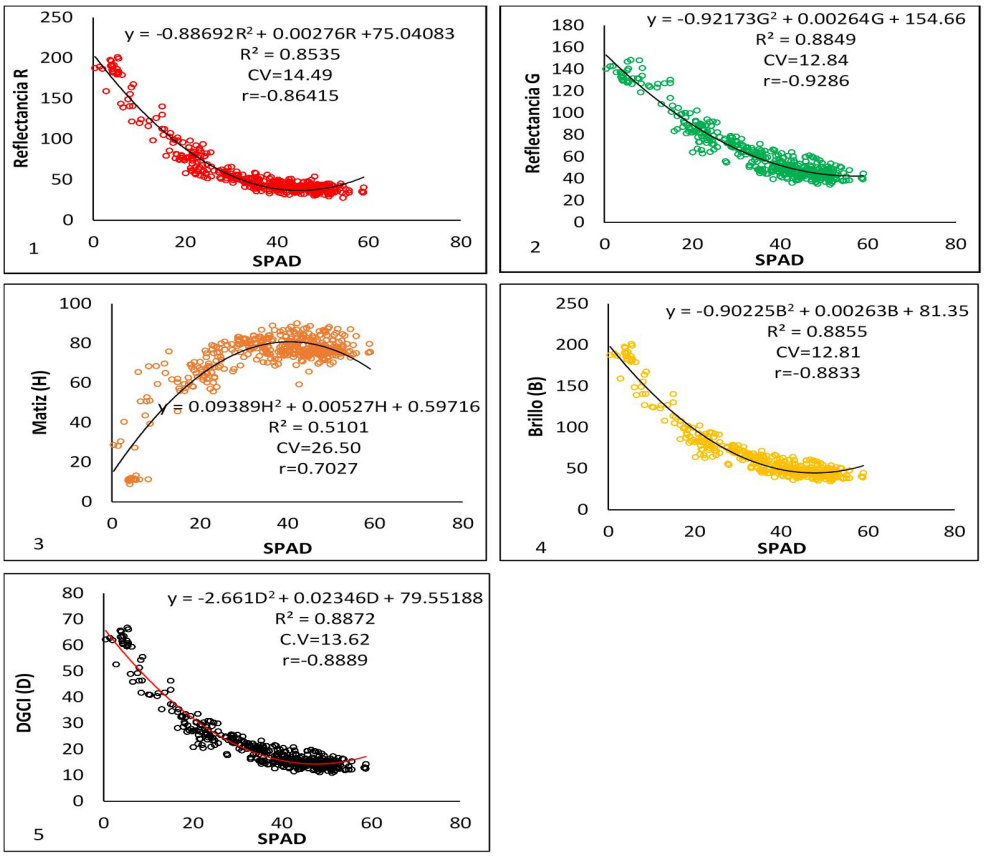


Figura 2. Regresión lineal múltiple, coeficiente de determinación y coeficiente de correlación de lecturas SPAD y Red (1), Green(2), Matiz(3), Brillo(4) y DGCI(5).

DISCUSIONES

El componente del color azul (B) no tiene relación con los tratamientos debido a que la planta tiene la capacidad de absorber luz en longitud de onda de forma selectiva, por lo que el color azul es absorbido principalmente, seguido del color rojo, lo cual refleja en mayor cantidad la longitud de onda del color verde [2], por esta razón los valores medidos deben presentarse como máximos en el componente del verde (G). El análisis para HSB presentó menor ajuste lo que difiere a los resultados de Mata [5], esto puede deberse a que las condiciones de luz siempre fueron constantes, así como el ángulo de adquisición de las imágenes, lo que situó al modelo RGB como mejor predictor de deficiencias de nitrógeno en el cultivo de maíz, en cambio el modelo HSB puede ser una opción viable donde las condiciones de luz son variables y las imágenes son obtenidas con cámaras digitales.

Los resultados sugieren que dosis superiores a 300 ppm de nitrógeno no producen efectos en la coloración de las hojas en las etapas de V8, VT y FF. Las dosis inferiores a 200 ppm son insuficientes para el adecuado desarrollo del cultivo, por esta razón se observó clorosis en tratamientos con dosis de 200 y 100 ppm, mismas que se reflejaron en el peso de grano. En la etapa de Espiga (VT), la planta demanda mayores cantidades de nutrientes, y se da una translocación de la clorofila a órganos reproductivos y

hojas nuevas, por esta razón fue evidente la deficiencia de nitrógeno, lo cual sitúa a la etapa de espiga como una etapa clave para verificar el estado nutricional del cultivo y poder realizar correcciones en los programas de fertilización.

CONCLUSIONES

Los componentes R y G del espacio de color RGB podrían utilizarse para estimar la deficiencia de N en el cultivo de maíz, lo que permitiría hacer un mejor uso del nitrógeno y reducir las pérdidas de este nutriente al medio ambiente, además de que se puede mejorar la rentabilidad del cultivo.

REFERENCIAS

[1] Lassaletta L., Billen G., Grizzetti B., Anglade J., Garnier J. (2014). 50 year trends in nitrogen use efficiency of world cropping systems: the relationship between yield and nitrogen input to cropland. Environmental. Research. Letters. 9 105011

[2] Chapelle, E., Kim M., McMurtrey J. (1992). Ratio analysis of reflectance spectra (RARS). An algorithm for the remote estimation of the concentrations of chlorophyll-a, chlorophyll-b, and carotenoids in soybeans leaves. Remote Sensing of Environment, 39 (3):239-247

[3] Mercado A., Rico E., Lara A., Soto G., Ocampo R., Guevara R., Herrera R., Torres I. (2010). Nitrogen determination on tomato (Lycopersicon esculentum Mill.) seedlings by colour image analysis (RGB). African Journal of Biotechnology, 33: 5326-5332

[4] Yuzhu Han, Wang Xiaomei and Song Shuyao. (2011). Nitrogen determination in pepper (Capsicum frutescens L.) plants by color image analysis (RGB). African Journal of Biotechnology Vol. 10(77), pp. 17737-17741.

[5] Mata G., Mercado A., Rico E., Herrera G. (2012). Use of improved hue, luminance and saturation (IHLS) color space in the estimation of Nitrogen on tomato seedlings (Lycopersicon esculentum). Sciences Research Essays. 7(27) 2343-2349

[6] Ali M., Al A., Eamus D., Tan D. (2012). A New Image Processing Based Technique to Determine Chlorophyll in Plants. American-Eurasian Journal Agriculture. & Environment Science, 12 (10): 1323-1328

[7] Rorie R., Purcell L., Morteza M, Douglas E., King A., Marsh M., Longer D. (2011). Association of "Greenness" in Corn with Yield and Leaf Nitrogen Concentration. Agronomy Journal. 103:529–535.

ORGANIC ROOTINGS ON *Stevia rebaudiana* Bertoni

María Isabel Martínez Rodríguez[a*+], José Ángel Robles Cervantes[b], Marisol Hernández Ortíz[b], Manuel Ortega González, Gerardo Martínez Mendoza, Daniel Rodríguez Mercado[b].

[a] Estudiante de Ingeniería en Innovación Agrícola Sustentable, Instituto Tecnológico de Roque
[b] Instituto Tecnológico de Roque

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: roca.8692@gmail.com

Área del Conocimiento: Química Agronómica

ABSTRACT
Stevia consumption has increased lately because medical investigations have shown that is a low carbohydrate that can be used to manage obesity and hypertension, on top of that its organic production has increased acceptation for consumers, due to the fact that organics foods are assimilated correctly by the body without alter metabolic functions. Therefore the objective of this investigation was to evaluate the effect of vegetal extracts on rooting on Stevia cuts. To do that Stevia cuts of 7-10cm and 8 leaves were planted on a random blocks experimental design with 4 treatments, a commercial check (indol-3-butíric -acid Raizone® Plus) and an absolute check with 5 repetitions, each repetition consisted of one cut that was submerged 30 mins on each one of the treatments studied: Sabila (*Aloe vera barbadensis miller*) at 6, 8 y 10 % (v/v); Sauce (*Salix alba*) at 10, 15 y 20 % (v/v); Raizone®Plus 0.10 g per cut and the absolute check with water. After that they were planted in trays with 200 cavities filled with mine sand and were placed in a microtunnel of shade cloth. They were watered daily with no fertilization. Twice a week 5 plants per treatment were taken and stem length, plant length, stem diameter, root length, root diameter, number of roots, fresh weight, dry weight, biomass and chlorophyll content were measured. Results of variables evaluated were submitted to a variance analysis and multiple comparison of means test (Tukey at $\alpha = 0.05$). Results show *Aloe vera* at 10% treatment was more than 18% better than the rest of the treatments studied.

Keywords: Stevia, Rootings, vegetal extracts, *Aloe vera*.

ELICITOR EFFECT ON PEPPER PRODUCTION (*Capsicum annuum* L.)

José Ángel Robles Cervantes[a*+], Marisol Hernández Ortíz[b], Julio César León Vargas[b], Enrique Andrio Enriquez[b], Raúl René Robles Lacayo[b], Hugo Cesar Cisneros López[b].

[a] Estudiante de Ingeniería en Innovación Agrícola Sustentable, Instituto Tecnológico de Roque
[b] Instituto Tecnológico de Roque

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: roca.8692@gmail.com

Área del Conocimiento: Química Agronómica.

ABSTRACT
Pepper is a high perishable product, therefore its production value is determined by the offer and demand law where a wide variation exists all year long, on winter a high price is caused for low temperatures in production areas. Elicitors application helps plant to get more resistance to abiotic factors that could decrease production. Because of that, the objective of this investigation was to determine the elicitors effect in poblano pepper in early planting. Seedlings were transplanted on February 2014 in a randomized block design with four repetitions and a check. H3 hybrid (Harris-Moran®) was transplanted in 3 rows of 6m length and 1m width with 20 cm distance between plants in a single line. Useful plot consisted in a half row of 4 m length. Fertilization background was done with 25 kg of urea and 27 kg of 18-46-00 and foliar fertilization at 30 days after transplantation (ddt) with 50 kg of Nitromac® (27N-6Ca-4Mg), every 15 days was applied 1 g L^{-1} of 20-30-10 and 3 mL L^{-1} of amino acids. Irrigation was applied every 15 days. Treatments consist in two applications at 30 and 60 ddt with 10^{-6}, 10^{-5} y 10^{-4} µM doses of salicylic acid and 1, 67 y 100 µM of chitosan and a check with water. Every 8 days plant height, stem diameter, number of leaves, chlorophyll content and number of flowers was measured. Agronomic variable results were submitted to a variance analysis and a mean comparison (Tukey, $\alpha = 0.05$). The observed results show that 67 µM chitosan dose increased 21% harvest rating evaluated in relation with the other treatments, at the same time this treatment was 12% superior for agronomic evaluated variables.

Keywords: Pepper, elicitors, chitosan, salicylic acid.

ATTRACTIVENESS OF THE VOLATILES RELEASED BY *Polianthes tuberosa* TO *Scyphophorus acupunctatus*

Compuestos volátiles de nardo (*Polianthes tuberosa*) con efecto atrayente sobre el picudo del nardo (*Scyphophorus acupunctatus*)

Maritza Vega-Petlacalco[a*+], Patricia Romero-Arellano[a], Norma Robledo[a], René Arzuffi [a].

[a] Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional. Km 8.5 Carretera Yautepec-Jojutla, Yautepec, C.P. 62731, Morelos. Tel. (735) 3942020. Tel/Fax (735) 3941896, Ext 82500/82505. Fax 82512.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: vega.petlacalco@gmail.com

Área del Conocimiento: Química Agronómica.

ABSTRACT
Scyphophorus acupunctatus is a phytophagous insect commonly known as tuberose weevil or agave weevil which is the main pest of those crops. Insecticides has been the main technique for the management of this pest, but this had not shown effectiveness and had development negative effects in human health and environment. The use of semiochemicals (pheromones and host volatiles) is a viable alternative for its management. *S. acupunctatus* is attracted by its aggregation pheromone, food baits and volatiles of two host plants (*Agave tequilana* y *Agave fourcroydes*). In field the mix of pheromone (2-methyl-4-octanone) and the compounds identified (terpenes) in *A. tequilana* did not improve the catches of the taps baited with it. The objective of this work is to know the attractive volatiles of *P. tuberosa* to *S. acupunctatus*. The volatile collection from the aerial part of the plant (AP) and bulb (B) with and without mechanical damage was made with dynamic air space in a glass chamber using SuperQ as adsorbent material for 18 h. The volatiles were eluted from the SuperQ with 2 mL of solvent (methanol, dichloromethane, hexane) and then concentrated to 200 µL in order to get the volatiles extract. With an Y-tube olfactometer using an air flow of 500 mL/min, one chamber held the extract and the other contained solvent as a control, the response of males and females was evaluated during 5 minutes. The compounds were identified with a CG-EM, compared their fragmentation pattern with NIST library. Males showed no preference, females preferred the AP and B volatiles both whit mechanic damage. In the AP with mechanic damage were identified one terpene, one ester, one aldehyde and one organic acid. In the B with mechanic damage were identified five terpenes, three alcohols, one acetate, one ketone, one ester and five organic acids.

Keywords: *Polianthes tuberosa, Scyphophorus acupunctatus*, plant volatiles, mechanical damage.

FORMATION OF HYBRIDS IN CHILI PROTRUDING IN YIELD AND NUTRITIONAL QUALITY

(Formación de híbridos en chile, sobresalientes en rendimiento y calidad nutricional)

Valentín Robledo Torres[a*+], Rosalinda Mendoza Villarreal[a], Francisca Ramírez Godina[b], Luis Alonso[a] Valdez Aguilar, Gibran Jaciel Alejandro Rojas[c]

[a] Departamento de Horticultura, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Calzada Antonio Narro 1923, C.P. 25315 Saltillo, Coahuila, México
[b] Fitomejoramiento, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Calzada Antonio Narro 1923, C.P. 25315 Saltillo, Coahuila, México
[c] Estudiante de Posgrado, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Calzada Antonio Narro 1923, C.P. 25315 Saltillo, Coahuila, México

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: varoto@prodigy.net.mx

Área del Conocimiento: Química Agronómica.

ABSTRACT
Are produced in México more than 2,100 000 tons of green chily, the jalapeño has the largest national production with 722.900 tons per year, followed by bell pepper with 358 600. Mexico has broad varaibility in color, shape, size, spicy, taste and nutritional value. Five jalapeños (Invicto , UAN32, UAN23 , Ciclon, Euforia) as females and four colored peppers (UANYw , UANRd , UANOg , UANPp) as males and 20 hybrids were used. The peppers are rich in vitamins A and C, are source of potassium, iron and magnesium also have antioxidants that help to improve the health, currently per capita consumption in Mexico varies between 8 and 9 kg .The objective was to study the performance and nutritional quality of parents and hybrids resulting from crosses between types of chilies. The total yield, number of fruits per plant, average fruit weight, vitamin C, capsaicin, total carotene, β -carotene and xanthophylls in parents and hybrids were estimated. The variance analysis showed significant differences in all the variables under studied. The highest yield and number of fruits was achieved by the hybrid Invicto*UANOg, with 5.28 kg and 543 fruits, respectively. The hybrid UAN32 * UANOg, exceeded 69% in vitamin C at the best parent and the UANOg bell pepper highest content showed of total carotenoids (21753.48 mg / 100g) and Beta carotene, in fruit (217.59 mg / 100g).The hybrid UAN23 * UANYw showed the highest content of xanthophylls (239.5 mg / 100g of fruit), while the Ciclon* UANYw hybrid exceeded at 125.19 % to euforia parent who had the highest value spicy. From the above it is concluded that the formation of hybrid can to help to obtain populations that surpass their parents in characteristics of important economic.

Keywords: *Capsicum annuum*; antioxidants; hybrid vigor; greenhouse.

RESUMEN
En México se producen más de 2,100 000 toneladas de chile verde, siendo el chile jalapeño el de mayor producción a nivel nacional con 722,900 toneladas anuales, seguido del pimiento con 358 600, los cuales varían en cuanto, color, forma, tamaño, picor, sabor y valor nutricional. Los chiles son ricos en

vitaminas A y C, además son fuente de potasio, hierro y magnesio, además poseer antioxidantes que ayudan al mejoramiento de la salud y actualmente el consumo *per capita* en México varía entre 8 y 9 kg. Sin embargo en México se continúan usando variedades de bajo rendimiento y calidad de fruto, por lo tanto el objetivo del presente trabajo fue identificar híbridos intervarietales con rendimiento y calidad nutricional, superiores al mostrado por los progenitores. Se utilizaron cinco chiles jalapeños (Invicto, UAN32, UAN23, Ciclón, Euforia) como hembras y cuatro pimientos de colores (UANYw, UANRd, UANOg, UANPp) como machos y 20 híbridos. Se estimó el rendimiento total, número de frutos por planta, peso promedio de fruto, vitamina C, capsaicina, carotenos totales, β-carotenos y xantofilas en progenitores e híbridos. Se encontraron diferencias estadísticas significativas en todas las variable bajo estudio y el mayor rendimiento y numero de frutos fue logrado por el híbrido Invicto*****UANOg con 5.28kg y 543 frutos, respectivamente. El mayor peso promedio de fruto lo presento el pimiento UANYw (85.869 g). El hibrido UAN32*****UANOg, supero en 69% en contenido de vitamina C al mejor progenitor y el mayor contenido de carotenoides totales (21753.48 mg/100grs) y Beta carotenos, por fruto (217.59 mg/100grs) fue presentado por el pimiento UANOg. El híbrido UAN23*UANYw fue el que presento el mayor contenido de Xantofilas (239.5 mg/100g de fruto), mientras que el híbrido Ciclón * UANYw, supero en 125.19% al progenitor euforia que presentó el valor más alto en pungencia. De lo anterior se concluye que la formación de híbridos permite lograr progenies que superan a sus progenitores en variables de importancia económica.

Palabras Clave: *Capsicum annuum*, antioxidants, vigor híbrido , invernadero.

INTRODUCCIÓN

El chile es originario de México, Centro y Sudamérica y el consumo de chile en México ha perdurado desde tiempos prehispánicos, además ha formado parte de la dieta diaria de los mexicanos. Entre los tipos de chile más importantes desde el punto de vista económico se encuentran: Jalapeño, Serrano, Ancho y Guajillo. En México se producen más de 2,100 000 toneladas de chile verde, siendo el chile jalapeño el de mayor producción a nivel nacional con 722,900 toneladas anuales, seguido del pimiento con 358 600, los cuales varían en cuanto, color, forma, tamaño, picor, sabor y valor nutricional.

En chile la variabilidad genética es amplia [1], por lo que es importante realizar estudios que nos indiquen el camino para identificar caracteres agronómicos de interés en el cultivo, además los recursos genéticos relacionados con el género *Capsicum* son muy importantes y adquieren gran relevancia por el potencial genético que presenta [2], y se menciona que éste potencial lo aprovechan los mejoradores como base para empezar programas de mejoramiento y obtener variedades o híbridos sobresalientes [3].

Las hibridaciones espontáneas naturales entre estas especies son difíciles de determinar, pero en algunos casos muy especiales se presentan [4]. Aunque los mejores progenitores para formar una población base para mejoramiento por selección, serán aquellos que en sus combinaciones híbridas se comporten mejor que el promedio de los progenitores involucrados en el cruzamiento[5], aunque afirma que una cruza simple será de alto rendimiento si sus dos progenitores son de alta ACG, o si su efecto de ACE es alto y al menos uno de los progenitores muestra alta ACG, por lo que se espera el máximo rendimiento cuando sus progenitores presentan alta ACG y su efecto de ACE en su cruza también es alto, sin embargo, si los progenitores son de baja ACG y su efecto de ACE también es bajo el rendimiento de la cruza será bajo[6]. En éste sentido se indica que el mejoramiento genético es un

proceso continuo en la formación de nuevas variedades e híbridos comerciales; el conocimiento de los diversos tipos de acción génica y la importancia de éstos en la determinación de caracteres de interés, es básico para lograr avances rápidos en un programa destinado a la obtención de híbridos superiores [7], lo cual es relevante ya que en México a pesar de ser centro de origen de ésta especie, con frecuencia se utilizan variedades criollas que tienen bajos rendimientos de fruto, por lo tanto el objetivo del presente trabajo fue identificar híbridos intervarietales con altos valores de heterosis para rendimiento y calidad nutricional.

METODOLOGÍA

La investigación se llevó a cabo en un invernadero de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), en Saltillo, Coahuila. El material genético usado fueron chiles del género *Capsicum annuum*, cinco jalapeños usados como hembras (Invicto, UAN32, UAN23, Ciclón y Euforia) y como machos cuatro pimientos de colores (UANYw, UANRd, UANOg, UANPp), estos materiales fueron sembrados el 12 de Marzo del 2013, en charolas de poliestireno de 200 cavidades, usando como medio de germinación peat moss y perlita en una proporción 70:30 respectivamente, 40 días después de la siembra se trasplantaron 10 plántulas por genotipo, en invernadero. El trasplante fue realizado en camas de 1.8m de ancho en doble hilera en forma de tresbolillo con una separación de 40 cm entre hileras y entre plantas. Cuando todas plantas estaban en floración se realizó la emasculación y cruzas de forma manual. Una vez realizada la polinización de las flores hembras fueron etiquetadas indicando progenitores usados en la cruza, además fueron cubiertas con glassines para evitar una posible contaminación con el polen de otras plantas. Cuando el fruto alcanzo la madurez fisiológica (cambio de coloración) se cosecharon y se mantuvieron 3 días a temperatura ambiente, antes de extraer las semillas.

La siembra de los 20 híbridos y de los progenitores fue el 15 de Septiembre del 2013, con los mismos procedimientos realizados en la siembra de los progenitores en la primera etapa, posteriormente, las plántulas fueron trasplantadas en suelo con acolchado plástico de color negro y riego por goteo dentro del invernadero, con la misma separación entre camas, entre hileras y entre plantas, bajo un diseño experimental de bloques al azar con cuatro repeticiones. Como parcela útil se utilizaron 5 plantas con competencia completa.

Para la estimación del rendimiento total, se sumó el peso de fruto de 7 cortes, realizados con intervalos de 10 días, en una muestra aleatoria de 5 plantas en cada genotipo y cada una de las cuatro repeticiones, posteriormente se estimó el rendimiento total de frutos por planta (RFPP), el número de frutos por planta (NFP) fue estimado de las mismas plantas que la anterior variable, además se estimó el peso promedio de fruto en gramos (PPF). La cantidad de vitamina C (Vit.C) en los frutos de los progenitores e híbridos F1, fue estimada mediante una metodología ya determinada [8], mientras que la cuantificación del contenido de capsaicina(Caps) en frutos de chile se determinó por el método descrito ya estandarizado [9] que consiste en la utilización de un espectrofotómetro (Bio-145025 BIOMATE-5 Thermo Electron Corporation) a una longitud de onda de 286 nm. Las lecturas se realizaron por triplicado para cada muestra. Para determinar la concentración de capsaicina en las muestras se construyó, una curva de calibración de este antioxidante (Sigma, Co.) dentro de un rango de 0 a 0.40 mg ml^{-1}, el contenido de capsaicina se expresó en unidades Scoville (Shu) para determinar el picor de los materiales obtenidos. Mientras que para la cuantificación de los carotenos totales (Car.To), se utilizó la técnica descrita que consiste por en la utilización de un espectrofotómetro calibrado a una longitud de onda de 454 nm [10]. Con el mismo método, pero a una longitud de onda de 430, 450 y 480nm se

obtiene la absorbancia de los diferentes tipos de β-caroteno (β-Car) y con la misma muestra pero con una longitud de onda de 474 nm se estimó la cantidad de xantofilas (Xant.) que contienen los progenitores e híbridos formados.

RESULTADOS

Se encontraron diferencias significativas (P≤0.01) entre machos, hembras y en la interacción de M x H, en las variables RTF, NFP, PPF, y diferencias estadísticas significativas (P≤ 0.05) en el contenido de capsaicina, vitamina C, carotenoides totales, β caroteno y xantofilas. La comparación de medias realizada entre machos indica que el progenitor UANOg fue uno de los que tuvieron los mejores comportamientos en las diferentes variables estudiadas, éste fue estadísticamente superior (p≤ 0.05) a los tres machos en RFPP, mientras que en el caso de las hembras todas fueron estadísticamente iguales, mostrando escaza variabilidad respecto a ésta variable, en el PPF los progenitores macho UANYg y UANOg fueron estadísticamente iguales pero diferentes de los dos restantes progenitores macho y todas las hembras fueron estadísticamente iguales en la variable antes indicada. El análisis de comparación de medias realizado a grupo de híbridos muestra que en la variable RFPP el híbrido 5x3 fue estadísticamente superior al resto de los híbridos obtenidos (Tabla 1), aunque en segundo lugar se presentó un grupo de cuatro híbridos (6x1, 6x4, 9x3, 5x1), registrando una gran variabilidad en el rendimiento por planta, ya que el hibrido más rendidor superó en aproximadamente 70% al de menor rendimiento de fruto por planta. En la variable PPF los híbridos 5x1, 7x4 y 8x4 fueron los de mayor peso y fueron estadísticamente iguales, sin embargo su peso fue muy inferior a los progenitores macho que fueron los pimientos, sin embargo en el NFPP el hibrido 5x3 tuvo el mayor valor superó en 15% al segundo mejor híbrido que fue el 6x4, además supero en 116% al hibrido con la menor cantidad de frutos por planta. En relación a las variables bioquímicas (Tabla 1), se encontró que el híbrido 8x2 presentó la mayor pungencia con un valor de 43462.5 unidades Scoville, superando a todos los progenitores. En contenido de vitamina C el híbrido 7x3 (235 $mg \cdot 100g^{-1}$) fue el que presentó el mayor contenido, superando estadísticamente (p≤ 0.05) al todos los híbridos y progenitores utilizados en ésta investigación.

Tabla 1. Comparación de medias de rendimiento y componentes del rendimiento y de la calidad bioquímica de fruto de progenitores e híbridos de chile.

Genotipos	RFPP Kg.	PPF g.	NFPP	Caps (Shu)	Vit.C	Car.To	β-Car	Xant.
					$mg.100g^{-1}$			
Machos								
1.- UANRd	1.96b	55.6b	35 ab	900c	32 b	15100b	31d	206 b
2.- UANYw	1.85b	85.9a	22 b	1200 a	137 a	17549b	174b	229 a
3.- UANOg	2.18a	85.2a	26 b	750c	139 a	21753a	218a	215 ab
4.- UANPp	1.18 c	26.7c	46 a	1000 ab	22 b	1419c	142c	210 ab
Hembras								
5.- Invicto	1.59 a	17.9a	88 c	18970a	32 c	9936c	12 d	215 ab
6.- UAN23	1.59 a	10.7a	149 b	16000b	69 b	14194a	158 ab	215 ab
7.- UAN32	1.54 a	16.5a	94 c	2400 c	35 c	14070ab	165ab	219 a
8.- Ciclón	1.58 a	9.4a	168 a	16845b	94 a	14070ab	185 a	219 a
9.- Euforia	1.57 a	11.0a	142 b	19300a	63 b	6163d	99 c	219 a
Cruzas								

5x1	4.60 bc	15.5 a	297 l	39585 b	113 c	5619 n	51 m	219 hij
5x2	4.02 hij	11.0 efghij	364 fghij	28725 f	118 c	10372 f	108 e	238 a
5x3	5.28 a	9.7 j	543 a	15900 h	99 d	7423 j	74 i	238 ab
5x4	4.50 cdef	10.2 hij	443 cb	10162 j	99 d	11606 d	114 d	224 efg
6x1	4.84 b	13.5 bc	359 ghij	8212 k	8 j	3457 q	91 g	228 de
6x2	3.11 l	12.4 cde	251 m	31875 e	67 f	8788 h	92 g	239 a
6x3	4.36 defg	11.5 defgh	379 efghi	28612 f	74 f	15042c	132 c	215 j
6x4	4.75 bc	10.1 ij	472 b	13106.3 i	57 g	7081 k	69 j	230 cd
7x1	4.56 cde	11.9 def	382 efgh	19192.5 g	97 de	6387 l	68 j	224 efg
7x2	4.24 fgh	12.4 cde	343 j	4263.8 l	44 h	7081 k	69 j	219 fghi
7x3	4.32 efg	12.2 cdef	352 hij	19440.0 g	235 a	17895 b	143 b	217 ij
7x4	4.31 efg	14.4 ab	301 kl	10162.5 j	99 d	11606 d	114 d	224 efg
8x1	4.36 defg	12.6 cd	347 ij	13179.0 i	112 c	9442 g	94 g	224 efg
8x2	3.90 jk	11.1 efghij	350 hij	43462.5 a	113 c	9442 g	94 f	224 efgh
8x3	3.96 jkl	11.9 def	331 jk	8002.5 k	44 h	20828 a	177 a	215 j
8x4	3.71 k	14.5 ab	257 m	37837.5 c	218 b	11245 e	177 a	224 ef
9x1	4.50 cdef	11.4 defghi	394 def	35925.0 d	100 d	5786 m	55.9 k	224 efg
9x2	4.22 ghi	10.9 fghij	388 defg	4912.5 l	89 e	3610 p	34.1 n	233 bc
9x3	4.66 bc	11.6 defg	401 de	32025.0 e	95 de	8424 i	87.4 h	219 ghi
9x4	4.31 efg	10.3 ghij	420 cd	29350.0 f	44 h	4813 o	51.7 l	215 j

En relación a carotenoides totales el híbrido 8x3 fue el que presento la mayor cantidad con 20827.7 $mg \cdot 100g^{-1}$, superando en 48% a su segundo mejor progenitor. Es éste trabajo se encontró que los híbridos 8x3 y 8x4 fueron los que presentaron la mayor cantidad de β carotenos, que es un importante pigmento que contribuye a la salud humana. En el caso de las xantofilas, es un pigmento que infiere el color amarillo a algunos frutos, se encontró en mayores cantidades en los híbridos 5x2,5x3, 6x2 los cuales fueron estadísticamente iguales y el 6x2 supero en 4% al progenitor con el mayor contenido de xantofilas.

La estimación de la heterosis mostró (Tabla 2) que el híbrido que exhibió el menor valor en rendimiento fue el 6 x 2 con un valor de (80.6%), mientras que el más alto fue presentado por el híbrido 6 x 4 que presentó una heterosis de 242.47%, esto indica un incremento del rendimiento de dicha magnitud, por encima de la media de los dos progenitores, en PPF ningún híbrido supero la media de los progenitores involucrados en alguna cruza, en cambio en la variable NFPP el híbrido 5 x 3 presentó una expresión heterótica que supero en 853.89 % a la media de los dos progenitores estudiados, indicando la alta posibilidad de incrementar el número de frutos mediante cruzas interraciales, ya que en la estimación de heterosis no se encontró ningún valor negativo en los híbridos formados.

Tabla 2. Heterosis en variables relacionadas con el rendimiento y calidad nutricional de híbridos inter-raciales de *Capsicum annuum* L., estudiados en Saltillo, Coahuila.

Hibrido	RFPP	PPF	NFPP	Caps.	Vit.C	Car.To	β-Car	Xant.
	kg	grs		Shu	mg/100grs			
5x1	159.74	-57.87	381.36	298.44	255.24	-55.11	135.27	4.25
5x2	133.92	-78.72	562.06	184.83	39.71	-24.52	16.01	7.46

5x3	180.48	-81.15	853.89	61.26	15.89	-53.15	-35.34	10.63
5x4	225.26	-54.42	561.74	1.77	267.78	104.42	48.50	5.43
6x1	172.75	-59.25	289.69	-2.82	-83.50	-76.40	-3.44	8.43
6x2	80.60	-74.29	193.89	270.64	-35.40	-44.63	-44.74	7.96
6x3	131.18	-75.98	333.89	241.64	-28.62	-16.31	-29.48	-0.02
6x4	242.47	-46.12	384.75	54.19	26.13	-9.29	-54.17	8.30
7x1	161.09	-66.90	491.93	1063.15	189.22	-56.21	-30.61	5.55
7x2	150.30	-75.72	493.27	136.83	-48.96	-55.21	-59.40	-1.92
7x3	132.51	-75.92	489.02	1134.29	170.53	-0.09	-25.10	0.14
7x4	217.14	-33.55	331.36	497.76	248.68	49.85	-25.60	4.33
8x1	146.75	-61.31	242.01	48.54	78.01	-35.26	-12.66	5.50
8x2	127.47	-76.62	269.43	381.71	-2.41	-40.28	-47.44	-0.22
8x3	110.81	-74.73	242.35	-9.04	-62.60	16.28	-12.07	-1.06
8x4	168.94	-19.80	140.85	324.06	274.42	45.20	8.53	4.47
9x1	155.39	-65.63	343.44	255.69	110.52	-45.58	-14.59	5.41
9x2	146.86	-77.48	372.42	-52.08	-10.61	-69.55	-75.05	4.11
9x3	148.73	-75.81	376.96	219.45	-5.93	-39.65	-44.91	1.15
9x4	213.57	-45.48	346.36	189.16	3.05	26.95	-57.20	0.00

La capsaicina está relacionada directamente con el picor del fruto en chile y es un elemento importante en la cocina mexicana que determina la aceptación o no de un tipo de chile, en el presente caso se encontraron valores significativamente altos como fue el caso del híbrido 7 x 3, que supero en 1134.29% la media de los progenitores e incrementando de forma significativa la pungencia del hibrido formado. La vitamina C es un elemento importante desde el punto de vista nutricional y el chile es un fruto rico en éste metabolito que contribuye en el mejoramiento de la nutrición del ser humano, sin embargo existe poca información respecto a los contenidos en diferentes variedades o razas de chile, en este trabajo se encontró que existe una gran variabilidad en éste aspecto pero lo más importante es que se puede incrementar de forma significativa mediante la hibridación de diferentes razas de chile, en el presente caso se encontraron valores heteróticos de hasta 274.42% de incremento en el contenido de vitamina C.

DISCUSIÓN

Las diferencias significativas encontradas entre progenitores y progenies son consecuencia de la variabilidad presente entre los progenitores estudiados. Además se indica que las diferencias significativas ($P \leq 0.01$) en la interacción de M x H se le puede atribuir a la alta variabilidad genética entre los progenitores, así como al diferente grado de combinación entre los progenitores involucrados en las cruzas [11]. Las diferencias en variables agronómicas de progenitores e híbridos son en parte el resultado de la divergencia genética de la poblaciones bajo estudio, que en los híbridos se manifiestan debido a la presencia de genes favorables para lograr valores medios superiores a los de los progenitores, aunque el ambiente también juega un papel importante en la expresión del genotipo, en algunos trabajos se ha mencionado que algunas características de rendimiento se ven favorecidas por condiciones climáticas favorables que se presentan en ambientes protegidos, al aumentar la carga de frutos por planta[12], sin embargo existe la posibilidad de que al juntar por selección caracteres, se

podría contribuir a la formación de poblaciones o genotipos sobresalientes[13], ya que se ha señalado que los híbridos más sobresalientes son aquellos que permiten lograr la complementariedad de frecuencias génicas favorables[14], lo cual ocurre también para incrementar las cantidades de vitamina C que en las plantas cumplen función de protección, aunque se menciona que para lograr la mayor cantidad de este antioxidante se debe de tener en cuenta la etapa de desarrollo del fruto [15]. Los diferentes pigmentos como carotenoides y xantofilas tienen la función de captar energía luminosa en la planta, sin embargo para el ser humano son de importancia tienen una función como precursores de la provitamina A, o bien en la protección ante la presencia de radicales libres debido a una actividad antioxidante, igualmente la vitamina C, tiene un efecto protector del sistema inmunológico, de ahí la importancia del estudio de éstos pigmentos y metabolitos secundarios como es la vitamina C y capsaicinoides, los cuales es posible incrementar aumentando por incremento de frecuencias génicas mediante procesos de selección aprovechando la amplia variabilidad genética de las poblaciones bajo estudio. En metabolitos como los carotenoides totales, β carotenos y xantofilas también se encontraron incrementos significativos en los híbridos formados, indicando que la hibridación también puede permitir mejorar éstas características de tal manera que se pueden desarrollar variedades o híbridos de mayor valor nutricional, lo anterior gracias a que existen genes que pueden ser aprovechados mediante la formación de híbridos y por lo tanto la expresión de la varianza genética de dominancia.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se encontró amplia variabilidad fenotípica en cuanto a las variables agronómicas y bioquímicas bajo estudio.

El progenitor UANPp en su cruza con los otros progenitores hembras fue el que manifestó los mayores valores de heterosis para la variable rendimiento de fruto, mientras que el progenitor Invicto en sus cruzas con los progenitores machos fue que el que manifestó mayores valores de heterosis.

Desde el punto de vista de calidad nutricional nuevamente el progenitor UANPp fue el que presento el mejor comportamiento promedio de heterosis considerando todos los híbridos progenitores y otro genotipo exhibió un comportamiento aceptable fue el progenitor invicto.

REFERENCIAS

[1] Bosland, W. P. (1996). Capsicums: Innovative uses of an ancient crop. pp. 479-487. In: J. Janick (ed.), Progress in New Crops. ASHS Press, Arlington, VA.

[2] González, A.F., Pita, V.J.M. (2001). Conservación y Caracterización de Recursos Fitogenéticos.

Mundi-Prensa. Madrid, España. 279 p.

[3] Gunn, S. (2004). Why genetic diversity matters?. International Board for Plant Genetic Resources. Edit. Marchesi Grafiche Editoriali Spa. Roma, Italia. 22 p.

[4] Jarret, R.L., Dang, P. (2004). “Revisiting the waxy locus and The *Capsicum annuum* L. complex”. Georgia Journal of Science 62: 117-133.

[5] Serrano, C.L., Mendoza O. L. (1990). “Formación de híbridos de sorgo para grano III. Proposición de un modelo de selección de progenitores con base en sus parámetros genéticos”. Revista Fitotecnia Mexicana Vol 13: 44-55.

[6] Reyes, L.D., Molina, G. J. D., Oropeza, R.M.A., Moreno, P. E. C. (2004). Cruzas dialélicas entre líneas autofecundadas de maíz de la raza Tuxpeño. Rev. Fitotec. Mex. 27:49-56.

[7].- Malacara, M. F., San Vicente, G.F.M. (2003) "Patrones Heteróticos de Líneas Tropicales Blancas de Maíz". Agronomía Tropical. 53:32-40

[8] AOAC, (2000). Official methods of analysis, 17th ed. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD.

[9] Bennett, D.J., Kirby, G.W. (1968). Constitution and biosynthesis of capsaicin. Journal of the Chemical Society. 442-446.

[10] Silverstein, R.M., Webster F. X. (1988). Spectotrometric identification of organic compounds. Six Edition. Ed. John Wiley and Sons, N.Y.

[11] Luna, O.J.G., García, H.J.L., Valdez, C.R.D., Gallegos, R.M.A., Preciado, R. P., Guerrero, G. C., Espinoza, B. A. (2013). Aptitud combinatoria y componentes genéticos en líneas de maíz. Universidad y Ciencia, 29(3):243-253

[12] Rodríguez, Y., Depestre, T., Gómez, O. (2008). "Eficiencia de la selección en líneas de pimiento (*Capsicum annuum*), provenientes de cuatro sub-poblaciones, en caracteres de interés productivo". Ciencia e Investigación Agraria. 35(1): 37-49.

[13] Moreno, P. E. de C., Avendaño, A.C.H., Mora, A. R., Cadena, I. J., Aguilar, R.V.H., Aguirre, M. J.F. (2011). "Diversidad morfológica en colectas de chile guajillo (*Capsicum annuum* L.) del centro-norte de México". Revista Chapingo. Serie Horticultura, 17(1): 23-30.

[14] Duvick, D.N. (1999) Heterosis: Feeding people and protecting natural resources. In: The Genetics and Exploitation of Heterosis in Crops. J G Coors, S Pandey (eds). CIMMYT. Pp:19-29.

[15] Cruz, P.A.B., González, H.V.A., Soto, H. R. M., Gutiérrez, E. M. A., Gardea, B.A.A., Pérez, G. M. (2007). "Capsaicinoides, vitamina C y heterosis durante el desarrollo del fruto de chile manzano". Agrociencia. 41: 627–635.

CHEMICAL CHARACTERIZATION BAGASSE SUGARCANE (*Saccharum officinarum*), WASTE OF SUGAR INDUSTRY STATE OF COLIMA, MEXICO.

(Caracterización química del bagazo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), residuo de la industria azucarera del Estado de Colima, México)

Karina de la Paz García Mariscal[+*a], José Anzaldo Hernandez[b], Rubén Sanjuán Dueñas[b]

[a] INIFAP, Campo Experimental Tecomán, Colima.

[b] Departamento de madera celulosa y papel. Universidad de Guadalajara, CUCEI.

*Autor que presentó.

+Autor para correspondencia: garcia.karina@inifap.gob.mx

ABSTRACT

Mexico has established approximately 780 300 hectares of sugar cane cultivation, achieving an average productivity of 61.4 million tons[*]. Of which 8.8 million are obtained from the Central-Pacific region (Jalisco, Colima and Michoacan), the only agro end sugar extraction. Obtained between 25 and 40% of the material processed as agroindustrial residue which, despite being used as fuel in the boilers of the mills, large amounts remain stored without being used. The objective was to make the chemical characterization of residual bagasse Central-Pacific region, for percentages of alpha-cellulose, and lignin holocelulosa. Representative samples of the residual bagasse, were provided by the Quesería Ingenio, located in Cuauhtemoc, Colima. Prior to the determinations, the samples were subjected to a moisture reduction, washing solvent extraction technique according to Tappi 264 subsequently determinations in acid insoluble lignin, holocelulosa (WISE), alpha, beta and gammacelulosa were performed. According to the results, the residue shows potential to be used sustainably achieving high Klasson lignin contents, 19.81% from 76.21% holocelulosa and 43.21% alpha cellulose, beta and gammacelulosa the results were 0.61 and 6.30% respectively, indicating that the residue of the sugar industry may be used as raw material in industries products of lignin and cellulose, as well as balanced output, agglomerates for construction, production of paints, fertilizers and other foods.

Keywords: bagasse; sugarcane; lignin.

5° Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

FIBER RICH SNACKS FROM PLANTAIN, CHICKPEA AND MAIZE BLENDS: CHEMICAL COMPOSITION, TEXTURE AND OVERALL ACCEPTANCE

(Botanas con alto contenido de fibra a partir de la mezcla de plátano, garbanzo y maíz: composición química, textura y aceptabilidad)

Pamela Celeste Flores-Silva[a]*, Sandra Leticia Rodriguez-Ambriz[a], Luis Arturo Bello-Pérez[a+]

[a] Departamento de Desarrollo Tecnológico, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Yautepec. Carr. Yautepec-Jojutla km 6, Calle CEPROBI, No. 8, Col. San Isidro, Yautepec, Morelos, México C.P. 62731

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: labellop@ipn.mx

Área del Conocimiento: Q. Alimentos.

ABSTRACT
A considerable increase in the global prevalence of overweight and obesity has been observed over the last three decades, and Mexico has experienced one of the fastest increases in the prevalence of these diseases. Currently, Mexico holds first place in the world for child obesity which has been related, by recent reports, to frequent snacking with an increased caloric intake and weight gain. For that reason, there is a growing interest to develop healthy foods, specifically snacks since these products are widely consumed, to battle overweight and obesity problems around the world. The objective of this study was to develop fiber rich snacks using plantain, chickpea and maize blends, and to evaluate its chemical composition, texture and overall acceptability. Chemical composition was assessed according to AACC methods. Texture characteristics (crispiness, hardness) of extrudates were measured using a TAXT2i Texture Analyzer. To determine the expansion ratio, the cross-sectional diameter of the extrudates was measured with a Vernier digital caliper. For preference assessment a 9-point hedonic scale was used. Extrusion and deep-frying of blends of unripe plantain, chickpea, and maize flours produced snacks with higher dietary fiber content (13-7-18.2 g/100g) and lower fat content (12.7-13.6 g/100g) than those reported in similar commercial snacks. The expansion rate and crispiness of the snacks decreased as fiber content increased, and as it was expected hardness of the snacks was inversely proportional to crispness and expansion rate. The overall acceptability of the snacks with the highest unripe plantain flour was similar to that chili-flavored commercial snack.

Keywords: Dietary fiber, snack, sensory evaluation.

DIGESTIBLE AND INDIGESTIBLE CARBOHYDRATES OF GLUTEN-FREE SNACKS

(Estudio de los carbohidratos digeribles y no digeribles de botanas sin gluten)

Pamela Celeste Flores-Silva[a]*, Sandra Leticia Rodriguez-Ambriz[a], Luis Arturo Bello-Pérez[a+]

[a] Departamento de Desarrollo Tecnológico, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Yautepec. Carr. Yautepec-Jojutla km 6, Calle CEPROBI, No. 8, Col. San Isidro, Yautepec, Morelos, México C.P. 62731

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: labellop@ipn.mx

Área del Conocimiento: Q. Alimentos

ABSTRACT
An increase in celiac patients has caused an increasing interest to develop good quality gluten-free food products with high nutritional value. Snack foods are consumed worldwide and have become a normal part of the eating habits of the celiac population making them a target to improve their nutritive value. Healthy foods must include a significant amount of indigestible carbohydrates, low amounts of digestible carbohydrates and low glycemic index (GI). Therefore, the objective of this study was to evaluate the in vitro starch digestibility and predict the glycemic index (pGI) of gluten-free snacks, and to evaluate the in vitro fermentation by human microbiota of the indigestible fraction of the snacks. Total starch content, starch fractions and starch hydrolysis index were determined. In vitro fermentation of the indigestible fraction was also assessed. Extrusion and deep-frying of unripe plantain, chickpea, and maize flours blends produced gluten-free snacks with low predicted glycemic index (28 to 35). The snack with the highest unripe plantain flour showed higher slowly digestible starch (11.6 and 13.4 g/100 g) than its counterpart with the highest chickpea flour level (6 g/100 g). However, the indigestible fraction content was higher on the snack with the highest chickpea level (38.7 g/100g). During the fermentation of the indigestible fraction of the gluten-free snacks was observed that the formation of three short-chain fatty acids (SCFAs) (acetic, propionic and butyric) increased with time. Acetic acid was the main SCFA produced (19.90 mmol ml-1), followed by propionic acid (7.99 mmol until ml-1) and butyric acid (3.43 mmol until ml-1).

Keywords: Glycemic index, fermentation, snack, gluten free.

FOOD TECHNOLOGY APPLICATION OF MALTODEXTRIN AND ITS ASSESSMENT AS A WALL MATERIAL IN THE SPRAY DRYING PROCESS

(Aplicación tecnológica en alimentos de la maltodextrina y su evaluación como material pared en el proceso de secado por aspersión)

Sandra Berenice Araujo Díaz[a], Rosa Eréndida Fosado Quiroz[b], Claudia Álvarez Salas[c], Ana Lourdes López Pablos[ab], María Zenaida Saavedra Leos[b*+].

[a] Doctorado Institucional en Ingeniería y Ciencia de Materiales (DICIM). Sierra Leona No. 530 Col. Lomas 2da. Sección, Planta Baja, C.P. 78210 . San Luis Potosí, S.L.P., México. Tel. 01 (444) 8262300.
[b] Coordinación Académica Región Altiplano. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Carretera Cedral Km. 5+600 Ejido San José de las Trojes Matehuala, S.L.P. C.P. 78700. México. Tel. 01 (488) 882-72-15.
[c] Facultad de Ingeniería. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Av. Dr. Manuel Nava 8, Zona universitaria. C.P. 78290. San Luis Potosí, S.L.P., México. Tel. 01 (444) 8262330.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: zenaida.saavedra@uaslp.mx

Área del conocimiento: Q. Alimentos.

ABSTRACT
Spray drying is defined as the transforming a liquid feed to a dried particulate form. For this, the feed is atomized into a chamber with hot air, and results in a flash evaporation of the moisture in the food. However, drying of foods rich in sugars, such as fruit juices is difficult due to high water content and to sugars with low molecular weight. These foods, when in contact with hot air at a temperature above its Tg and with a proper water content, become attached to the walls of the dryer and thus, obtaining at the end of the process a structure in the form of pasta instead of a powder form. This has led to low yields, operating problems and difficulty in predicting product quality. In this type of process, maltodextrin can be used for its physical properties. Therefore, the objective of this research was to assess the maltodextrin in the spray drying process to obtain an orange juice powder with good quality characteristics in order to prolong its shelf life. Batches of orange juice-maltodextrin were obtained. Approximately 2 g of dry extract of each batch were placed into individual desiccators containing saturated salt solutions (NaOH, CaCl2, K2CO3, MgCl2, SrCl2 and NaCl) that were stored in an incubator at 35 ° C for a period of 10 days or until reaching equilibrium (Kiranoudis et al., 1993). For a_w = 0.07, both systems have an amorphous structure and the moisture content was 2.77g and 1.637 g per 100 g of dry matter respectively. For a_w = 0.530, physical changes in the structure were observed, in the case of orange juice - maltodextrin system an amorphous state to a crystalline state was observed and a moisture content of 7.70 g of maltodextrin anhydrous per 100g of dry matter.

Keywords: Maltodextrin, Orange juice, Spray drying process.

5° Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

COMPARATIVE STUDY OF NUTRACEUTICAL PROPERTIES OF MEXICAN MAIZE FLOURS

(Estudio comparativo de propiedades nutracéuticas de harinas de maíz mexicano)

Gustavo Adolfo Camelo-Méndez[a]*, Glenda Pacheco-Vargas[a], Francisco Javier García-Suárez [a], Luis Arturo Bello-Pérez[a+]

[a] Departamento de Desarrollo Tecnológico. Instituto Politécnico Nacional, CEPROBI. Km. 6.6 Carr. Yautepec-Jojutla Col. San Isidro, 62731, Yautepec, Morelos, México. Phone: +52 735 3942020, Fax: +52 735 3941896

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: labellop@ipn.mx

Área del Conocimiento: Q. Alimentos.

ABSTRACT
The demand for products of high nutritional value from sustainable sources is growing rapidly in the global food market. Pigmented maize varieties are an excellent source of bioactive components for human consumption. However, there is limited scientific literature on the biological activities of phytochemicals from cereals and their nutraceutical properties. The aim of this study was to compare proximal and phenolic composition, antioxidant capacity and inhibition of human pancreatic α-amylase from white, blue and red maize. The moisture, protein, ash, and carbohydrates content of the flours were determined. Multivariate statistical analysis was used to determine the importance of each component in the nutritional effect. The results indicated that maize flours presented significant amounts of total phenolic and anthocyanin content (red and blue maize). Phenolic and anthocyanin extracts showed considerable antioxidant activity (DPPH, ABTS and FRAP assays), indicating the nutraceutical effect of pigmented and white maizes. The extracts presented inhibition on α-amylase activity, and it was that maize polyphenols inhibit enzyme before starch was hydrolyzed; maize can be considered a natural ingredient to control the glycaemia. Further work is underway to design functional foods with the proper use of maize that could reduce glucose release and provide health benefits.

Keywords: Mexican maize flours, nutraceutical properties, α-amylase inhibition, multivariable statistical analysis.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

EFFECT OF EXTRUSION PROCESSING ON PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES, DIETARY FIBER, AND SENSORY ACCEPTABILITY OF BREAKFAST CEREALS ADDED WITH NARANJITA FRUIT (*Citrus mitis*) BAGASSE

(Efecto del proceso de extrusión sobre propiedades fisicoquímicas, fibra dietaria y aceptabilidad sensorial de cereales para desayuno adicionados con bagazo del fruto de naranjita (*Citrus mitis*))

Karen María Ruiz-Beltrán[a**], José de Jesús Zazueta-Morales[a], Ernesto Aguilar-Palazuelos[a], Carlos Iván Delgado-Nieblas[a], Miguel Ángel Urrea-Gámez[a], Irma Leticia Camacho-Hernández[a], Roberto Gutiérrez-Dorado[a]

[a] Posgrado en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa. Calzada de las Américas y Josefa Ortiz de Domínguez, Ciudad Universitaria, Culiacán, Sinaloa., México. C.P. 80013. Phone: (52) 667-7136615. Fax: (52)667-7136615.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: karenruizbeltran@gmail.com

Área del Conocimiento: Q. Alimentos.

ABSTRACT
Nowadays, people have less time to prepare their food due to current time-demanding jobs. Therefore, there is a high consumption of so-called fast food, including high-fiber breakfast cereals (HFBC). To improve its nutritional/nutraceutical content, it has been suggested the addition of materials rich in nutrients and bioactive compounds, including some by-products from citrus, such as naranjita fruit, which are important sources of carotenoids, dietary fiber, and phenolic compounds, whose consumption has been associated with potential health benefits. The objective of this research was to study the effect of extrusion processing on physicochemical properties, dietary fiber, and sensory acceptability (SA) of HFBC added with dehydrated naranjita fruit bagasse (DNFB). It was evaluated the effects of extrusion temperature (ET: 88.79-131.21°C), and content of DNFB (0.64-13.36%) in a mixture of wheat-bran:oat-bran:yellow-corn-grits (55:36:9, %). Hypothesis: it is possible to obtain by extrusion processing, HFBC added with DNFB, with good physicochemical properties, dietary fiber, and SA. It was used a single screw extruder, and for data analysis the response surface methodology was employed. The lowest expansion index (< 1.12) was obtained at high ET in all the range of DNFB. Whereas, the lowest water solubility index (< 14%), was presented at low content of DNFB throughout all the range of ET. Also, the highest values of b* color parameter (> 25) were obtained at high content of DNFB throughout all the range of ET. In addition, the highest content of insoluble dietary fiber (> 11%) and soluble dietary fiber (> 2.8%) was presented at high ET, and at intermediate levels of DNFB. The greatest SA was presented at ET (> 126°C) and DNFB (3.5-10.5%). HFBC added with DNFB, with appropriate physicochemical properties and good SA, were obtained, which eventually could present important content of bioactive compounds due to the materials used in their elaboration.

Keywords: high-fiber breakfast cereals, naranjita fruit bagasse, extrusion, bioactive compounds.

CHARACTERIZATION OF PHENOLIC COMPOUNDS AND THEIR ASSOCIATION WITH THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF WILD TOMATO FROM MEXICO

(Caracterización de compuestos fenólicos y su asociación con la actividad antioxidante de tomate silvestre de México)

Anayanci Guadalupe Luna-Mandujan[a]*, Laura Yaneth Sicairos-Medina[a], Gabriela López-Angulo[a], Nancy Yareli Salazar-Salas[a], Karen Virginia Pineda-Hidalgo[a], Pedro Sánchez–Peña[b], Francisco Delgado-Vargas[a], José Ángel López-Valenzuela[a+].

[a] Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa, Culiacán, Sinaloa, México.
[b] Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Sinaloa, Culiacán, Sinaloa, México.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: jalopezvla@uas.edu.mx

Área del Conocimiento: Q. Alimentos.

Tomato (*Solanum lycopersicum*) is one of the most consumed vegetables worldwide and represents an important source of bioactive compounds. The development of commercial varieties has focused on agricultural characteristics (*e.g.* yield, disease resistance, size), which decreases wild populations and consequently the genetic biodiversity and variability associated with the nutritional components. Phenolic compounds are one of the main groups of bioactive components in tomato, which have been associated with potential positive health effects due to their diverse biological activities such as the antioxidant activity (AA). The aim of this study was to characterize the phenolic compounds of wild tomato (S. *lycopersicum* var. Cerasiforme) fruit and their association with the AA. Methanol extracts were prepared from 38 individuals corresponding to 19 wild tomato accessions from different regions of Mexico. Phenolic compounds were analyzed by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-ESI-MS) and identified by comparing their retention time, UV/Vis and MS/MS spectra with those of commercial standards. The levels of phenolic compounds were correlated with the AA of the methanol extracts determined by the ABTS, DPPH and ORAC methods. The peaks of major phenolic compounds were collected and their AA was measured by the ABTS method. The main phenolics were characterized as phenolic acids (caffeic acid derivative, chlorogenic acid, and di- and tri- caffeoylquinic acids) and flavonoids (rutin and rutin pentoside) whose levels varied widely among the accessions. The content of chlorogenic acid and rutin correlated significantly with the AA of the extracts by ABTS ($r=0.803$, $p<0.01$) and DPPH ($r=0.7$, $p<0.01$); and only rutin pentoside correlated with AA by ORAC. The collected peaks corresponding to the caffeic acid derivative, chlorogenic acid and rutin accounted for 70% of the AA in the crude extracts, suggesting that they are mainly responsible for the antioxidant activity of the wild tomato accessions.

Palabras Clave: *Solanum lycopersicum;* phenolic compounds; HPLC-MS; antioxidant activity.

EVALUATION OF QUALITY, NUTRITIONAL CONTENT AND ANTIOXIDANT CAPACITY OF PRICKLY PEAR (*Opuntia ficus-indica*) TREATED WITH ASCORBIC ACID AND CALCIUM CHLORIDE

(Evaluación de la calidad, contenido nutricional y capacidad antioxidante de frutos de tuna (*Opuntia ficus-indica*) tratados con ácido ascórbico y cloruro de calcio)

Blanca Alicia López-Zazueta[a*], Yuridia Lizet Chaidez-Fernández[a], Marcela de Jesús Vergara-Jiménez[a], Feliznando Isidro Cárdenas-Torres[ab], Misael Odín Vega-García[b], Martha Edith López-López[ab+].

[a] Licenciatura en Nutrición. Unidad Académica de Ciencias de la Nutrición y Gastronomía. Universidad Autónoma de Sinaloa. Culiacán, Sinaloa, México.
[b] Posgrado en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Facultad de Ciencias Químico Biológicas. Universidad Autónoma de Sinaloa. Culiacán, Sinaloa, México.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: mc.marthal@hotmail.com

Área del Conocimiento: Q. Alimentos.

ABSTRACT
Tuna is a non-climacteric fruit, native and domesticated in México, which has a good content of vitamin C and phenolic compounds actuating as antioxidant agents. The latter are able to quench free radicals and because of this, they are linked with prevention of many diseases related to oxidative stress. However, tuna is highly perishable and its quality decreases quickly during postharvest handle, presenting a short shelf life and commercial life limiting its consumption. The aim of this work was to apply a postharvest treatment in order to extend shelf life, maintaining the quality and nutritional content of prickly pear. The hypothesis was that the application of an ascorbic acid and calcium chloride solution on prickly pear would allow maintaining the quality and extending the shelf life, preserving the nutritional content and antioxidant activity of the fruit. Weight lost, quality parameters, vitamin C content, total phenolic compounds and antioxidant capacity (ORAC) were evaluated. The fruits were divided into 4 lots, and the postharvest treatments (Control, ascorbic acid (AA), calcium and AA-calcium combination) were applied. Then the fruits were stored for 36 day at 6°C taking samples each 6 days. The results did not show significant difference between postharvest treatments on weight lost, firmness, color parameters L and ΔE, nevertheless a trend on changes was observed. Moreover, in Control and combination treatments, °Brix presented an accumulation as a result of senescence of the fruit. Vitamin C content decreased in all postharvest treatments, but AA treatment retained it during more time. Furthermore, total phenolic compounds and antioxidant capacity (ORAC) increased during ripening; however, the fruits treated with AA presented the highest values.

Keywords: prickly pear; ascorbic acid; calcium chloride; antioxidant capacity.

RESUMEN
La tuna es un fruto climatérico nativo y domesticado en México, el cual presenta un buen contenido de Vitamina C y compuestos fenólicos que actúan como agentes antioxidantes. Estos últimos son capaces de eliminar radicales libres y debido a esto, se encuentran vinculados con la prevención de muchas enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo. Sin embargo, la tuna es altamente perecedera y su calidad disminuye rápidamente durante el manejo poscosecha, presentando corta vida de anaquel, limitando su comercialización y consumo. El objetivo de este trabajo fue aplicar tratamientos poscosecha con la finalidad de extender su vida de anaquel, manteniendo la calidad y contenido nutricional y actividad antioxidante en la fruta. La pérdida de peso, parámetros de calidad, contenido de vitamina C, compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante (ORAC) fueron evaluados. Las frutas fueron divididas en 4 lotes, y los tratamientos poscosecha (Control, ácido ascórbico (AA), calcio y la combinación AA-calcio) fueron aplicados. Los frutos fueron almacenados por 36 días a 6°C haciendo retiros cada 6 días. Los resultados no mostraron diferencia significativa entre los tratamientos poscosecha en pérdida de peso, firmeza, los parámetros de color L y ΔE, sin embargo si se observó un cambio de tendencia. Por otra parte los tratamientos Control y la combinación presentaron una acumulación de °Brix como resultado de la senescencia del fruto. El contenido de Vitamina C disminuyó en todos los tratamientos poscosecha, sin embargo el tratamiento AA retuvo el contenido por más tiempo. Además, los compuestos fenólicos totales y la capacidad antioxidante (ORAC) incrementaron durante la maduración; sin embargo, las frutas tratadas con AA presentaron los valores más altos.

Palabras Clave: Tuna, ácido ascórbico, cloruro de calcio, capacidad antioxidante.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad es cada vez más importante para el consumidor ingerir alimentos que además de los beneficios originales que le puedan proporcionar, le ayuden en el mantenimiento de la salud y en la prevención de enfermedades [1]. Algunos estudios científicos han correlacionado una buena alimentación con el consumo constante de vitaminas, minerales y otros compuestos bioactivos como polifenoles, los cuales presentan propiedades antioxidantes. Estos antioxidantes son necesarios para la prevención y reducción de la incidencia de ciertos tipos de enfermedades crónicas degenerativas generadas por efecto del daño oxidativo [2].

La tuna (*Opuntia spp.*), perteneciente a la familia de las cactáceas, es un fruto muy apreciable por su sabor característico y por los múltiples atributos que posee. Estudios recientes han demostrado que contiene altos niveles de agentes antioxidantes como el ácido ascórbico, compuestos fenólicos y compuestos betalaínicos, así como concentraciones de calcio, magnesio, prolina y taurina que le confieren características de un alimento funcional [3]. También se ha documentado que este efecto funcional le confiere un efecto protector sobre las células vasculares relacionadas directamente con la inflamación [4,5]. Participando asimismo en la prevención de enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus y trastornos del tracto gastrointestinal [6].

Para aprovechar estas propiedades funcionales del fruto es muy importante mantener la calidad del mismo; para ello, el buen manejo de las condiciones de distribución, comercialización y almacenamiento es un factor clave. Sin embargo, la tuna es altamente perecedera y sensible a la manipulación [3]. Algunos métodos de conservación, como el almacenamiento en atmósferas modificadas y la refrigeración, se han venido empleando para reducir la actividad metabólica del fruto y contrarrestar

dichas limitaciones; pero no siempre han resultado efectivas, por lo que existe la necesidad de buscar alternativas para la conservación de la tuna. La aplicación de aditivos químicos pudiera ser una opción de bajo costo y efectiva para mantener la calidad poscosecha. Por lo que el objetivo de este trabajo consistió en evaluar el efecto de la aplicación de cloruro de calcio y ácido ascórbico sobre los atributos de calidad y el contenido nutrimental de frutos de tuna, así como sobre su capacidad antioxidante.

METODOLOGÍA

MATERIALES

Los frutos de tuna fueron obtenidos de un mercado local de la ciudad de Culiacán, Sinaloa (México) en un estado de madurez comercial. Se trasladaron al Laboratorio de Fisiología y Tecnología Poscosecha perteneciente al Posgrado en Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad Autónoma de Sinaloa donde se seleccionaron tomando aquellos que se encontraban libres de golpes, magulladuras y presencia de microorganismos. Posteriormente fueron lavados y desinfectados con hipoclorito de sodio (300 ppm) durante 3 min. Transcurrido este tiempo, la fruta fue escurrida y dividida en 4 lotes para la aplicación de los diversos tratamientos: control, Cloruro de Calcio (5g/L), ácido ascórbico (0.05M), y la combinación (AA-$CaCl_2$), para luego ser almacenados por 30-36 días a 6°C con retiros cada 6 días.

MÉTODOS

Porcentaje de pérdida de peso

Para la pérdida de peso se registró el peso de 10 frutos por tratamiento durante el almacenamiento a 6°C, realizándose las mediciones cada tercer día [7]. Se utilizó una balanza Sartorius modelo TE 4101 (Goettingen, Alemania). Los valores se expresaron como porcentaje de pérdida de peso en relación al peso inicial.

$$\%PP=\frac{peso\ inicial-peso\ final}{peso\ inicial}x100$$

Color externo e interno

El color se evaluó en tres puntos ecuatoriales equidistantes de cada fruto en la parte externa y dos puntos en cada cachete en la parte interna (4 en total), utilizando un colorímetro Minolta CR 200 (Minolta Co., Japón). Se registraron los parámetros de luminosidad (L), parámetro a* (verde-rojo) y parámetro b* (azul-amarillo) necesarios para la determinación de la diferencia total de color (ΔE) [8].

Firmeza

La firmeza se determinó en la pulpa de la tuna empleando un penetrómetro digital Chatillon DFE 100 (DFE AMETEK, Florida, E.U.), midiendo la fuerza máxima de penetración en Newtons (punta 11 mm, velocidad de 50mm/min y penetración de 5mm) en tres diferentes puntos de cada cachete de la fruta sin cáscara, con un total de seis mediciones por fruto y nueve por tratamiento [8].

Solidos solubles totales (SST-°Brix)

Se determinó el contenido de sólidos solubles (°Brix) colocando una gota del jugo de la fruta en el refractómetro manual. Obteniéndose tres mediciones por fruto, nueve por tratamiento. Y fue reportado como porcentaje de azúcar (°Brix) [9].

Ácido ascórbico (Vitamina C)

La cuantificación del ácido ascórbico se realizó utilizando una técnica espectrofotométrica, basándose en una reacción de óxido-reducción donde el ácido ascórbico presente en la muestra reacciona con la sal 2,6-diclorofenolindofenol (DCPI) [10]. Se pesaron 2g de tejido fresco y mezclaron con 10mL de ácido oxálico (0.4%, p/v). Se tomó un mL del extracto y se hizo reaccionar con el DCPI (0.0012%, p/v) más un buffer de acetato de sodio, pasado 14 segundos la muestra fue llevada a cuantificación a 520nm con la ayuda de un espectrofotómetro UNICO (UV/VIS 2800). Como blanco de cada extracto se utilizó la muestra, buffer de acetato de sodio y agua en lugar de la sal DCPI.

Fenólicos totales

Los fenólicos totales se determinaron mediante el método de Folin-Ciocalteau (FC) [11]. Se pesó 1 g de muestra, se le agregaron 10 mL de metanol-agua (80:20 v/v), la mezcla se sónico por 15 min, se filtró y recuperó el sobrenadante, el residuo se extrajo de nuevo bajo las mismas condiciones, los sobrenadantes se mezclaron y se aforaron a 50 mL con H_2O; se tomaron 10 µL de esta solución, se les añadió 0.1 mL del reactivo FC. La mezcla se dejó reposar 5 min y se le adicionó una solución de carbonato de sodio saturada dejándose reposar por otros 30 min a 40 °C en baño maría. La absorbancia fue leída a 765 nm en un espectrofotómetro UNICO (UV/VIS 2800). La cuantificación se realizó utilizando una curva estándar con ácido gálico, y se reportó como mg de ácido gálico/100gff.

Actividad antioxidante (Método ORAC)

Para el método de ORAC las muestras del extracto metanólico fueron diluidas con metanol de acuerdo a las curvas elaboradas con Trólox [12]. En placas negras de 96 pozos se mezclaron 25 µL del extracto metanólico o estándar, 200 µL de fluoresceína (0.96 µM) y 75 µL de AAPH (95.8 mM). En la preparación de la muestra y durante el ensayo, la temperatura se mantuvo a 37 °C. La reacción inició con la adición de AAPH y la fluoresceína. Las lecturas se realizaron cada 2 minutos midiendo la fluorescencia producida. El estudio se detuvo cuando ocurrió la desaparición de la fluorescencia (aprox. 70 min). Las longitudes de onda para la excitación y emisión fueron de 485 nm y 580 nm, respectivamente. Las lecturas se realizaron en un lector de microplacas modelo Synergy HT (BioTek Inc., EEUU). Se preparó una curva de calibración con Trólox y los resultados se presentaron como µmol ET/ 100 gff.

RESULTADOS

Porcentaje de Pérdida de Peso

En la figura 1 se presenta el porcentaje de pérdida de peso de los frutos de tuna almacenados a 6 °C. En esta figura se puede apreciar que los frutos de tuna tratados con AA, $CaCl_2$ y la Combinación (AA-$CaCl_2$) tuvieron un comportamiento muy similar al tratamiento Control, mostrando un porcentaje de pérdida de peso por abajo del 5%. El tratamiento Control mostró una pérdida de 3.93% al día 30 de almacenamiento, mientras que la Combinación (AA-$CaCl_2$) obtuvo 4.61%, sin presentar diferencia estadística entre ellos.

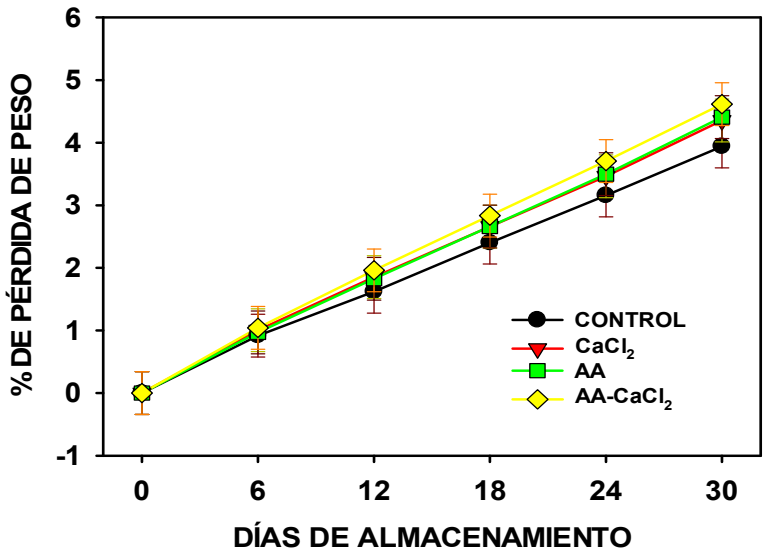


Figura 1. Porcentaje de pérdida de peso en frutos de tuna (*Opuntia ficus-indica*) durante su almacenamiento a 6 ºC. Las barras verticales indican LSD=0.05.

Color Externo e interno

En la figura 2 se puede observar el cambio de color de los frutos mediante el parámetro L y el ΔE tanto para cáscara como en pulpa. La cáscara de fruta presentó una reducción de la luminosidad conforme los días de almacenamiento, siendo el tratamiento Control el que presentó la mayor pérdida mostrando diferencia estadística significativa con los tratamientos $CaCl_2$ y la Combinación (AA-$CaCl_2$) al día 30 (figura 2A). Con respecto a la diferencia total de color se puede apreciar que el tratamiento con $CaCl_2$ fue el que presentó el mayor cambio los primeros 18 días, mostrando diferencia estadística el día 12 y 18 con el resto de los tratamientos, para permanecer constantes el resto del almacenamiento (figura 2C).

La luminosidad en pulpa presentó al igual que en cáscara una reducción conforme los días de almacenamiento (figura 2B), mostrando el tratamiento AA y $CaCl_2$ una retención los primero 6 días de almacenamiento, presentando diferencia estadística entre el tratamiento Control y AA. Al día 30 de almacenamiento el tratamiento $CaCl_2$ presentó la mayor reducción de la luminosidad con diferencia estadística con AA. Con respecto a la diferencia total de color (figura 2D) la pulpa presentó poco cambio conforme los días de almacenamiento sin presentar diferencia estadística entre los tratamientos.

Firmeza (N)

Con respecto a la firmeza se pudo observar que los frutos no presentaron mucha variabilidad durante el almacenamiento, siendo los tratamientos Control y $CaCl_2$ los que retuvieron la firmeza conforme los días de almacenamiento obteniendo al día 30 valores de 13.74 y 14.65N respectivamente, mientras que el tratamiento con AA presentó una reducción alcanzando un valor de 13.35N, mostrando una pérdida de 2.04N.

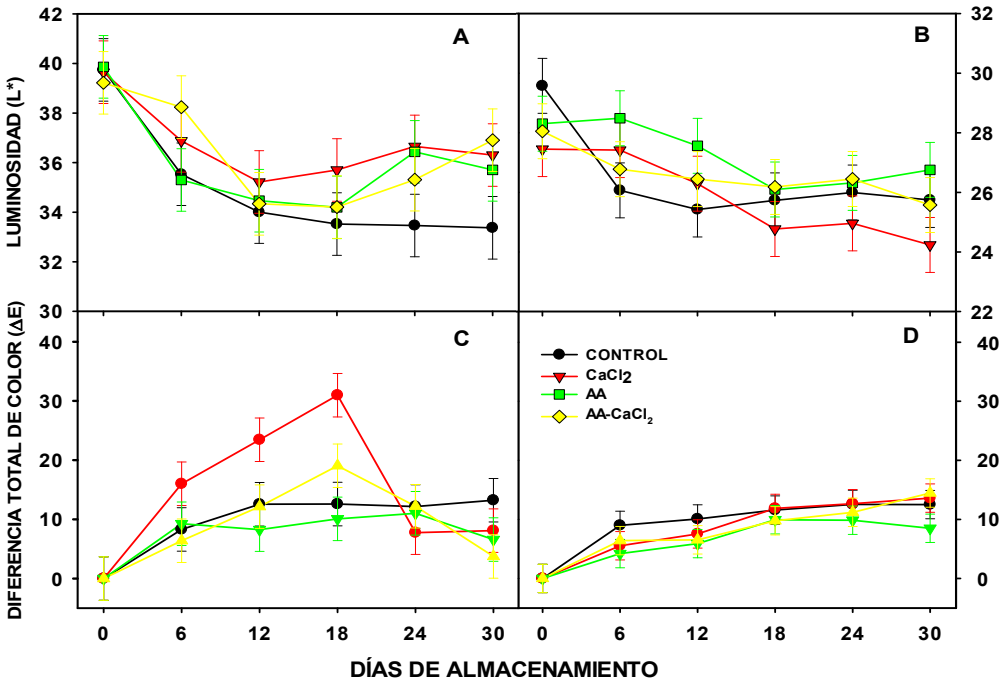


Figura 2. Cambios de color en frutos de tuna durante el almacenamiento a 6°C tanto en cáscara (A y C) como en pulpa (B y D). Las barras verticales indican LSD=0.05.

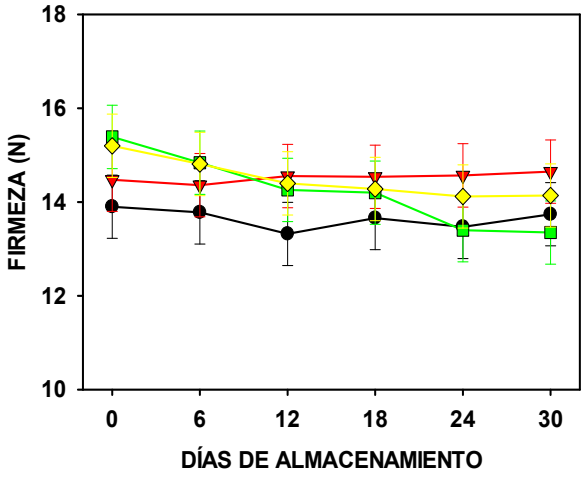


Figura 3. Firmeza en frutos de tuna almacenados a 6°C. Las barras verticales indican LSD=0.05.

Sólidos Solubles Totales (°Brix)

Los valores de SST entre 9 y 10 °Brix muestran un fruto ideal para el consumo en fresco [14]. En la figura 4 se muestra el contenido de °Brix en frutos de tuna con respecto a los tratamientos, donde se puede observar que los SST oscilaron entre los 9.3-9.6 °Brix el día inicial. Los frutos del tratamiento Control y la combinación (AA-$CaCl_2$) mostraron un incremento hasta el día 12 para posteriormente ser el tratamiento Control el que presentó una reducción. Mientras que los tratamientos AA y $CaCl_2$ presentaron una retención de los SST, incrementando al día 30. Sin embargo, no se logró observar diferencia estadística significativa entre los tratamientos.

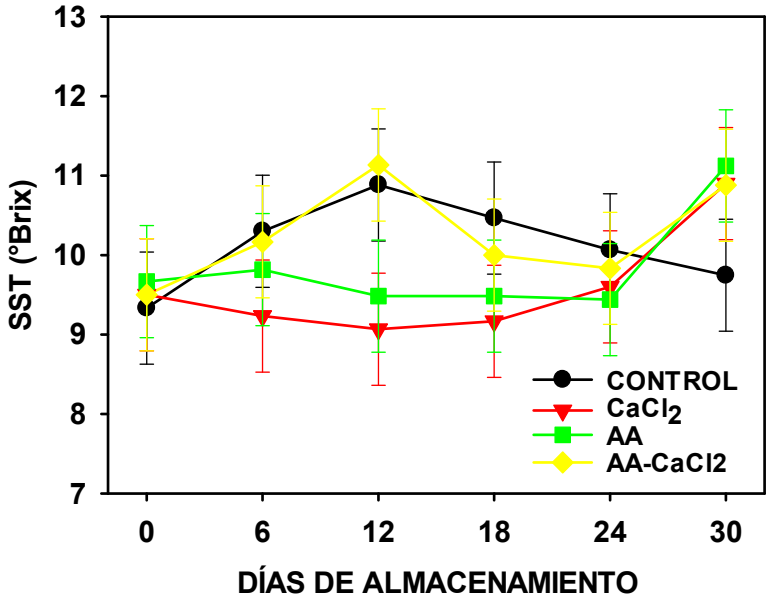


Figura 4. Sólidos solubles totales (SST) de frutos de tuna durante el almacenamiento a 6°C. Las barras verticales indican LSD=0.05.

Ácido ascórbico (vitamina C) y fenólicos totales

El contenido de ácido ascórbico se presenta en la figura 5A donde se puede observar que los cuatro tratamientos presentaron una reducción durante los primeros 6 días de almacenamiento. El tratamiento con AA presentó una retención del contenido de ácido ascórbico después del día 6, obteniendo valores de 7.68 mg de AA/100gff al día 36, mostrando diferencia estadística significativa con el resto de los tratamientos los cuales mostraron una reducción.

Con respecto a los fenólicos totales (figura 5B) los tratamientos Control y $CaCl_2$ presentaron el menor nivel al día inicial, posteriormente mostraron un incremento obteniendo valores de 43.31 y 47.72 mg de AG/100gff. Por otro lado, los tratamientos AA y la Combinación (AA-$CaCl_2$) presentaron valores iniciales de 62.35 y 59.68 mg de AG/100gff al día inicial lo que permitió presentar diferencia estadística significativa con el tratamiento Control y $CaCl_2$. Los frutos tratados con AA mostraron una reducción al día 6 para posteriormente mostrar un comportamiento similar al tratamiento con $CaCl_2$, mostrando

diferencia estadística con el tratamiento Control y la Combinación (AA-$CaCl_2$) a partir del día 14 de almacenamiento.

Actividad Antioxidante (Método de ORAC)

En la figura 6 se presenta el comportamiento de los frutos con respecto a la capacidad antioxidante. El tratamiento AA fue el que presentó la mayor actividad antioxidante durante los 36 días de almacenamiento. El tratamiento de la Combinación (AA-$CaCl_2$) fue el que presentó la mayor irregularidad en su comportamiento presentando al día 24 una caída permitiendo observar diferencia estadística significativa con los tratamientos $CaCl_2$ y AA. El tratamiento Control no presentó un cambio significativo durante los 36 días de almacenamiento, mostrando los valores más bajos de actividad antioxidante.

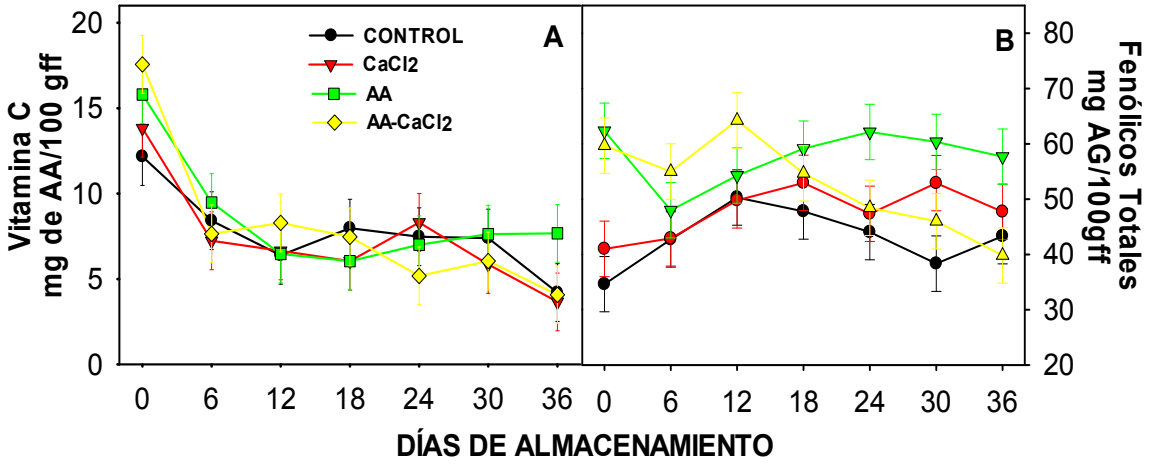


Figura 5. Cambios en la concentración de ácido ascórbico (A) y fenólicos totales (B) en frutos de tuna durante su almacenamiento a 6 °C. Las barras verticales indican LSD=0.05.

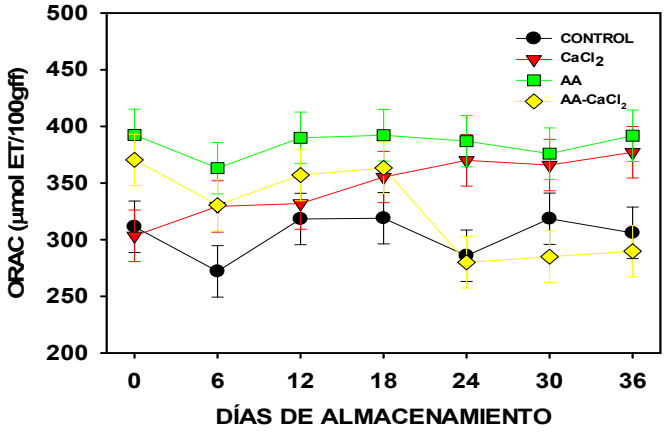


Figura 6. Cambios en Actividad Antioxidante en frutos de tuna durante su almacenamiento a 6 °C. Las barras verticales indican LSD=0.05.

DISCUSIONES

El porcentaje de pérdida de peso observado en los frutos de tuna fue bajo alcanzando en promedio al día 36 valores de 4.33%. Este comportamiento pudo ser consecuencia de la estructura de la cutícula y el tejido epidérmico del fruto que se caracterizan por la disposición de grandes cantidades de ceras, que contribuyen a aumentar los valores de resistencia estomática y cuticular a la pérdida de agua por ende en la pérdida de peso. Estos resultados difieren de lo reportado en frutos de tuna roja almacenada a 4°C, debido a que se observó una pérdida del 14.16% [13] y con 20 cultivares de tuna almacenados a temperatura ambiente (20°C) ya que reportaron 15% de pérdida de peso [15]. Por otro lado, si coincide con lo reportado para frutos de tuna almacenados a 20°C tratados con AA, $CaCl_2$ y una envoltura de papel. Estudios realizados en frutos como melón y piña [16], arándanos [17] y mangos [18] tratados con sales de calcio presentaron una menor pérdida de peso comparados con el control, no coincidiendo con lo reportado en este estudio.

El color de los alimentos es quizas el primer atributo que el consumidor valora cuando determina la apariencia y calidad de un producto condicionando su aceptabilidad [19]. La aplicación de los diferentes tratamientos no generó un cambio considerable en el color lo que permitió mantener la calidad de los mismos. Estos resultados difieren de lo reportado en frutos de tuna almacenados en atmósferas modificadas pasivas [20]. En frutos de plátano tratados con calcio se produjeron cambios de coloración durante el almanamiento [21]. En frutos de mango se observó un retraso en el cambio de color gracias a la combinación de calcio con goma arabiga que redujo la biosíntesis de antocianinas y logró la preservación del contenido de clorofila, la cual está relacionada con el proceso de maduración poscosecha y por ende al cambio de color y luminosidad [22].

La firmeza y la frescura son factores críticos de calidad requeridos para los frutos en la industria alimentaria. Los cambios en la firmeza son debidos a modificaciones químicas de los principales componentes de la pared celular como celulosa, pectinas y hemicelulosa, a medida que el fruto madura [23]. Los frutos de tuna presentaron una retención de la firmeza sobre todo para los que fueron tratados con calcio y la combinación de AA-$CaCl_2$. Estos resultados concuerdan con lo reportado por diversos estudios en frutos tratados con sales de calcio quienes argumentaron que los iones de calcio formaban puentes entrecruzados que unían a las pectinas de la pared celular, haciendo menos accesible la acción de enzimas pectolíticas [17,24,25].

El contenido de vitamina C se reflejó en una concentración de 15 mg/100 gff en promedio para los frutos de los cuatro tratamientos al inicio del almacenamiento, siendo el tratamiento con AA el que retuvo la vitamina C después del día 6 y hasta el final del almacenamiento, lo cual pudo deberse al excedente de ácido ascórbico que pudo ser utilizado en la oxidación y conversión de ácido dehidroascórbico [26]. Sin embargo, este comportamiento no concuerda con lo reportado en frutos de tuna debido a que se observaron concentraciones de 1.82mg/100gff después de 9 días de almacenamiento a 4°C [26]. Pero si coincide con lo reportado en 12 cultivares de *Opuntia spp* superando las concentraciones de 25 mg/100gff [27]. Así mismo, concuerda con los resultados obtenidos en pitaya y tuna roja [28,29].

La aplicación de AA permitió una acumulación de compuestos fenólicos lo cual pudo deberse a que estos compuestos actuaron como barrera protectora de la oxidación. Esto pudo ser debido a que el AA participa principalmente como un antioxidante inhibiendo la oxidación y activación de enzimas como la lipoxigenasa. Sin embargo, al interactuar con las sales de calcio se observó un efecto negativo, debido posiblemente a que son competitivos. No existen estudios previos que reporten este tipo de comportamiento en frutos de tuna, sin embargo se ha reportado que en pitaya se encuentran concentraciones de 37.6 mg/100g de base seca en frutos sin tratar [30]. Otro estudio reportó valores muy por debajo de lo observado en este estudio lo cual atribuyeron a que los frutos posiblemente ya se encontraban en la etapa de la senescencia [28].

La capacidad antioxidante está directamente relacionada con el contenido de pigmentos de la fruta, así como la actividad antioxidante de los diferentes compuestos, entre los que destacan los compuestos fenólicos, carotenos y ácido ascórbico. Encontrando que el tratamiento con AA logró una mayor acumulación de compuestos fenólicos y ácido ascórbico permitiendo que estos participen en la capacidad antioxidante de los frutos de tuna. Estos resultados no concuerdan con lo reportado para cuatro diferentes cultivares de tuna, los cuales presentaron una muy baja actividad antioxidante [29]. Pero si concuerda con el comportamiento observado en frutos de kiwi tratados con AA, los cuales presentaron una mayor actividad antioxidante con respecto al control lo cual atribuyeron al efecto del ácido ascórbico exógeno [30]. Así mismo coincide con lo observado en frutos Camu-camu, reportando que tanto el ácido ascórbico como los compuestos fenólicos presentan una alta correlación con la capacidad antioxidante del fruto debido a que actúan directamente en la reacción de inhibición de los radicales libres [31].

CONCLUSIONES

El uso de cloruro de calcio, ácido ascórbico y/o la combinación (AA-$CaCl_2$) resultaron ser viables para mantener las características de calidad tanto en color, firmeza y SST en frutos de tuna almacenada a 6 °C hasta por 36 días.

La aplicación exógena de ácido ascórbico mantuvo el contenido de ácido ascórbico en frutos de tuna hasta por 36 días, así mismo incrementó el contenido de fenólicos totales y su capacidad antioxidante.

Con base en los resultados obtenidos en este estudio se concluye que la aplicación de aditivos químicos como el cloruro de calcio y ácido ascórbico, favorecen las condiciones de almacenamiento de los frutos de tuna (*Opuntia ficus-indica*) retardando su maduración, favoreciendo su vida de anaquel, mejorando su contenido nutrimental y su capacidad antioxidante.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Dirección General de Investigación y Posgrado específicamente en la convocatoria PROFAPI 2014 por el apoyo económico proporcionado para la realización de este proyecto.

REFERENCIAS

[1] Rodríguez M., Tovar A., Del Prado M., Torres N. 2005. Mecanismos moleculares de acción de los ácidos grasos poliinsaturados y sus beneficios en la salud. Revista de Investigación Clínica. (3): 457-472.

[2] Benayad Z., Martínez C., Frías J., Gómez C., Es-Safi N. 2014. Phenolic composition, antioxidant and anti-inflammatory activities by different extraction methods. Industrial Crops and Products. (62): 412–420.

[3] Ochoa C. y Guerrero J. A. 2012. Efecto del almacenamiento a diferentes temperaturas sobre la calidad de tuna roja (*Opuntia Ficus-indica* (L) Miller). Información Tecnológica. 23(1).

[4] Wu l., Hsiu-Wen H., Yun-Chen C., Chih-Chung C., Yu-in I., Hja-An A. 2006, Antioxidant and antiproliferative activities of red pitaya. Food Chemestry. (95): 319-327.

[5] Allegra A., Sortino G., Micilettagtto M., Fasciana T., Inglese P. 2015. The influence of harvest period and fruit ripeness at harvest on minimally processed cactus pear (*Opuntia ficus-indica* L. Mill) stored under passive atmosphere. Postharvest Biology and Technology. (104): 57-62.

[6] Hichem A., Najla H., Zouhour B., Mohsen S., Khémais B. 2013. Ameliorative effect of *Opuntia ficus-indica* juice on ethanol-induced oxidative stress in rat erythrocytes. Experimental and Toxicology Pathology. (65): 391– 396.

[7] Contreras M., Perez E., Margarita l., Hernadez B., Hernandez G., Del real A., Rivera E., Rodrigez M. 2011. Evaluation of oxalates and calcium in nopal pads (*Opuntia ficus-indica* va. redonda) at different maturity stages. Journal of Food Composition and Analysis. (24): 38–43.

[8] López-López M., Vega-Espinoza A., Ayón-Reyna L., López-Valenzuela J., Vega-García M. 2013. Combined effect of hot water dipping treatment , N-acetylcysteine and calcium on quality retention and enzymatic activity of fresh-cut apple. Journal of Food Agricultural & Environment. 11(2), 243–248.

[9] AOAC. 2012. Official Methods of Analysis, 16th. Ed. Washintong, DC: Association of Official Analytical Chemists.

[10] Dürüst N, Sumengen D, Dürüst Y. 1997. Ascorbic acid and element contents of foods of Trabzon (Turkey). Journal of Agricultural and Food Chemistry 45:2085-2087.

[11] Singleton VL., Orthofer R,. Lamuela-Raventos R.M. 1999**.** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. Methods in Enzymology. (299): 152-178.

[12] Ou B., Hampsch-Wooddil M., Prior RI. 2001. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. Journal of Agricultural and Food Chemestry (49): 4619-4626.

[13] Ochoa C., Guerrero J., 2012. Efecto del almacenamiento a diferentes temperaturas sobre la calidad de tuna roja *(opuntia ficus-indica* (l.) Miller). (23): 117-128.

[14]Cassano A., Conidi C., Drioli E. 2010. Physico-chemical parameters of cactus pear (Opuntia ficus-indica) juice clarified by microfiltration and ultrafiltration processes. Desalination. 250. 1101-1104.

[15] Moreno F., Rodríguez J. 1997. Comportamiento fisiológico de diferentes variedades de tuna. Tesis Profesional. Depto. Ing. Agroindustrial, Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, México. 89 pp.

[16] Méndez A**.** 2008. Aplicación de la tecnología IV gama en frutos de melón (Cucumis melo) y piña (Ananas comosus). Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha. (1): 1665-0204.

[17] Manríquez T., Pinilla H., Lobos W. 2011. Efecto de aplicaciones de calcio en la calidad de la fruta de arándano alto (*Vaccinium corymbosum* L.) cv. Elliot. Idesia. (3): 0718-3429.

[18] Galvis J., Arjona H., Fischer G. 2003. Efectos de la aplicación de soluciones de cloruro de calcio ($CaCl_2$) sobre la vida de almacenamiento y la calidad del fruto de mango (Mangifera indica L.) variedad Van Dyke. Agronomía Colombiana. (21): 190-197.

[19] Ruiz S., Gardea A., González G. 2005. Uso de agentes antioxidantes y envasado en atmósferas modificadas para mantener la calidad de rodajas de piña fresca. Tesis de Maestría. Centro de Investigación de Desarrollo. A.C. Hermosillo, Sonora. P: 4-10.

[20] Guevara J., Yahia E., Brito de la Fuente E., Biserka S. 2003. Effects of elevated concentrations of CO_2 in modified atmosphere packaging on the quality of prickly pear cactus stems, Postharvest Biology and Technology. (2): 167-176.

[21]Bolaños E., Moctezuma Y., Chávez J., Guzmán R., Hernández E., Guzmán I. 2012. Caracterización fisicoquímica de siete variedades del pigmento de las dos variedades con mayor concentración. Investigación y Ciencia. (55): 3-10.

[22] Khaliq G., Muda M., Ali A., Ding P., Ghazali H. 2015. Effect of gum Arabic coating combined with calcium chloride onphysico-chemical and qualitative properties of mango (*Mangifera indic*a L.) fruit during low temperature storage. Scientia Horticulturae. (190): 187–194.

[23] Ochoa C., Guerrero J. 2014. Postharvest quality of peeled prickly pear fruit treated with acetic acid and chitosan. Postharvest Biology and Technology. (92): 139-145.

[24] Ramírez J., Galvis J., Fischer G. 2005. Maduración poscosecha de la feijoa (*Acca sellowiana* berg) tratada con $CaCl_2$ en tres temperaturas de almacenamiento. Agron. Colomb. 0120-9965.

[25] Figueroa I., Martínez M., Rodríguez E., Colinas M., Valle, S., Ramírez S., Gallegos, C. 2010. Pigments content, other compounds and antioxidant capacity in 12 cactus pear cultivars (*Opuntia spp*) de Mexíco. Agrocencia. (44): 1405-3195.

[26] Beltrán M., Oliva T., Gallardo T., Osorio G. 2009. Ácido ascórbico, contenido fenólico, y capacidad antioxidante de las variedades roja, cereza, amarilla y blanca del fruto del cactus de la pitaya (stenocereus stellatus riccobono). Agrociencia (43): 153-162.

[27] Carrasco R., Zelada C. 2008. Determinación de la capacidad antioxidante y compuestos bioactivos de frutas nativas peruanas, Rev. Soc. Quím. Perú. (74): 1810-634.

[28] Allegra M., Furtmüiler G., Jantschko W., Zederbauer M., Tesoriere l., Livrea A., Obinger E. 2005. Mechanism of interaction of betanin and indicaxantin with human myeloperoxidase and hypochlorous acid. Biochernical and Biophysical Research Communications, (332): 837-844.

[29] Cruz l., Salinas Y., Valle S. 2012. Betalaínas, compuestos fenólicos y actividad antioxidante en pitaya de mayo (*Stenocereus gris*eus h.). Rev. Fitotec. Mex. Vol. 35 (Núm. Especial 5): 1 – 5.

[30] Kuti J. 2004. Antioxidant compounds from four *Opuntia cactus* pear fruit varieties. Food Chemistry (85):527–533.

[31] Carvalho A., De Oliverira l. 2002. Qualidade de kiwi minimamente procesado a tratamento com ácido ascórbico, ácido cítrico e cloreto de calcio. Pesq. Agropec. Bras., Brasilia. (37): 679-685.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

PHENOLIC COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF MANGO (*Mangifera indica* L) WITH DIFFERENT SENSITIVITY TO LOW TEMPERATURES

(Compuestos Fenólicos y Capacidad Antioxidante de Mango (*Mangifera indica* L.) con diferente sensibilidad a las temperaturas bajas)

Martha Edith López-López[a*], Jordi Gerardo López-Velázquez[b], Lidia Elena Ayón-Reyna[a], María Fernanda Ramírez-Perales[c], Gabriela López-Angulo[a], José Ángel López-Valenzuela[a,c], Misael Odín Vega-García [a,c+].

[a] Doctorado Regional en Biotecnología, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa. Culiacán, Sinaloa, México.
[b] Licenciatura en Ingeniería Bioquímica, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa. Culiacán, Sinaloa, México.
[c]Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa. Culiacán, Sinaloa, México.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: mvega6@yahoo.com

Área del Conocimiento: Q. Alimentos.

ABSTRACT
Oxidative stress causes damage in different molecules such as lipids, proteins and nucleic acids which are responsible of many degenerative diseases such as cancer, cardiovascular and other chronic diseases. A diet rich in fruits is usually promoted in daily intake, in part because a correlation between the consumption of these foods and the reduction of the risk to develop degenerative diseases. Several authors have related low temperature storage abiotic stress with activation of antioxidant system as a response mechanism of the fruit, which can enhance its antioxidant capacity itself. However, this activation will depend of factors such as the specie, genetics, ripeness, among others. The aim of this study was to evaluate the phenolic compounds and antioxidant capacity of mango fruit with the highest and the lowest sensitivity to low temperatures. The hypothesis was that storage at low temperatures allows the accumulation of antioxidant compounds that reduce the deterioration of fruit and keep the quality for more time. Five varieties of mature-green stage mango (Ataulfo, Haden, Kent, Keitt and Tommy Atkins) with export quality were selected and stored at 5 and 13°C during 21 days plus 7 days of ripening (21°C). Chilling injury index was evaluated in the five varieties and those with the highest and the lowest sensitivity were selected to evaluate total phenolic compounds and antioxidant capacity (DPPH and ABTS) in skin and pulp samples. Results showed that Keitt variety presented the highest presence of symptoms corresponding with the highest chilling injury index values, while Ataulfo variety presented the lowest sensitivity and chilling injury index values during ripening (21°C). The Ataulfo variety showed a greater accumulation of phenolic compounds than Keitt during storage, and additionally a higher antioxidant capacity in both skin and pulp during storage at 5°C, assessed by the two methods described.

Keywords: Antioxidant compounds, total phenolic compounds, chilling injury, mango.

RESUMEN
El estrés oxidativo es causante del daño en diferentes moléculas como son lípidos, proteínas y ácidos nucleicos los cuales son responsables de muchas enfermedades degenerativas como cáncer, enfermedades cardiovasculares y otras enfermedades crónicas. Dietas ricas en frutas y vegetales han sido promovidas en la alimentación diaria debido a que un incremento en el consumo de este tipo de alimentos presenta un papel muy importante en la reducción del riesgo de contraer enfermedades degenerativas. Diversos autores han relacionado que el estrés abiótico es causante de la activación del sistema antioxidante en el fruto como mecanismo de respuesta lo que puede potenciar la capacidad antioxidante del fruto. Sin embargo, esta activación dependerá de factores como especie, genética, estado de madurez, entre otros. Por lo que el objetivo de este trabajo consistió en evaluar los compuestos bioactivos y capacidad antioxidante de los frutos de mango con mayor y menor sensibilidad a las temperaturas bajas. Planteando como hipótesis que el almacenamiento a temperaturas bajas permite la acumulación de compuestos antioxidantes que permiten reducir la deterioración del fruto y mantener la calidad por más tiempo. Se seleccionaron cinco variedades de mango con calidad de exportación (Ataulfo, Haden Kent, Keitt y Tommy Atkins) en estado de madurez verde-maduro, se almacenaron a 5 y 13°C durante 21 días más 7 días de maduración (21°C). Se evaluó el IDF a las 5 variedades. Se seleccionaron las 2 variedades de mayor y menor sensibilidad, se les evaluó los compuestos fenólicos totales y la capacidad antioxidante por dos métodos (DPPH and ABTS) en cáscara y pulpa. Encontrando que la variedad Keitt presentó la mayor incidencia de síntomas correspondiendo a los valores altos de índice de daño por frío presentados, mientras que la variedad Ataulfo presentó la menor sensibilidad y los valores más bajos de índice de daño por frío durante la maduración (tanto a 5 como a 21°C). La variedad Ataulfo mostró la mayor acumulación de compuestos fenólicos con respecto a la variedad Keitt durante el almacenamiento, así como una mayor capacidad antioxidante tanto en cáscara como en pulpa durante el almacenamiento a 5°C, evaluada por los dos métodos descritos.

Palabra Clave: Compuestos antioxidantes, compuestos fenólicos totales, daño por frío, mango.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, es cada vez más importante para el consumidor ingerir alimentos que además de los beneficios originales que le puedan aportar le ayuden en el mantenimiento de su salud y prevención de enfermedades. Por este motivo, un buen porcentaje de la producción mundial de las frutas está siendo utilizada en la producción de alimentos funcionales (cualquier alimento o ingrediente alimenticio modificado, que puede proporcionar un beneficio a la salud superior a los nutrimentos tradicionales que contiene) [1].

Las frutas tropicales son alimentos que se incluyen cada vez más en la dieta, ya que se les reconocen muchos beneficios en la salud humana; debido a que sus componentes proporcionan una extensa variedad de nutrimentos importantes para el consumidor. Las frutas se componen mayoritariamente de agua, fibra (en su mayoría soluble), son una de las fuentes naturales más importantes de vitaminas, sales minerales y elementos fitoquímicos (flavonoides, carotenoides) los cuales ofrecen una alta capacidad antioxidante que permiten combatir radicales libres en las células del cuerpo [2].

El mango, miembro de la familia Anacardiaceae, es uno de los frutos más importantes en el mundo y es cultivado en más de cien países tropicales y subtropicales y es conocido como "el rey de las frutas" [3–5]. Los frutos de mango se enlistan entre las súper frutas, debido a que son reconocidos por su atractivo color, exótico sabor y atractiva fragancia [4,6]. Además, son una fuente rica en ácido ascórbico, carotenoides y compuestos fenólicos tanto en cáscara como en pulpa [7]. La presencia de este tipo de compuestos en la dieta humana está asociada con el efecto protector sobre algunas enfermedades crónicas degenerativas relacionadas con el estrés oxidativo [3,8].

Estudios previos reportan que los frutos que son fuentes ricas de carotenos, ácido ascórbico y polifenoles presentan buenas propiedades barredoras de radicales como son superóxido (O_2^-) y 1-difenil 1-2-picrilhidrazil (DPPH). Carotenoides como son β-caroteno, licopeno y xantofilas son buenos para reducir el oxígeno singulete el cual es altamente reactivo [7]. Su actividad antioxidante está fuertemente ligada a la especie, cultivar, lugar de procedencia, las condiciones climáticas, prácticas de producción, así como el estado de madurez debido a que disminuye conforme el progreso de la senescencia [7,9].

El almacenamiento en refrigeración es una de las mejores alternativas para reducir su actividad metabólica y deterioración, sin embargo; las temperaturas bajas pueden generar en el fruto daño por frío (DF) [10]. El DF es un desorden fisiológico que se presenta cuando el fruto, en un estado de madurez verde o verde-maduro es almacenado por un tiempo prolongado a temperaturas por debajo de la crítica (10°C) [11] pudiéndose presentar síntomas como oscurecimiento de lenticelas, picaduras superficiales, escaldado, maduración irregular, áreas necróticas entre otros. Los cuales pueden intensificarse cuando los frutos son transferidos a temperatura ambiente (21-25°C) [12,13]. La resistencia que los frutos pueden presentar a este tipo de desórdenes fisiológicos puede estar relacionada con la capacidad de respuesta mediante la activación del sistema antioxidante enzimático (Superóxido Dismutasa, Catalasa, Ascorbato Peroxidasa) así como el no enzimático (ácido ascórbico, tocoferol, compuestos fenólicos, carotenoides) [14].

Sinaloa es uno de los mayores productores y exportadores de mango de las variedades Ataulfo, Haden, Kent, Keitt y Tommy Atkins; pero su comercio está limitado a Estados Unidos de y Canadá debido a su corta vida de anaquel, así que el almacenamiento a temperaturas por debajo de las críticas permitiría un mayor rango de comercialización, prolongando así su vida de anaquel debido a una reducción en su metabolismo. Existen muy pocos estudios sobre la sensibilidad a las temperaturas bajas de los frutos de mango producidos en Sinaloa y su relación con los cambios en los compuestos fenólicos y capacidad antioxidante. Por lo que el objetivo de este estudio consistió en evaluar los compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de frutos de mango y su relación con la mayor y menor sensibilidad a las temperaturas bajas.

MÉTODOS Y MÉTODOS

MATERIALES

Materia Prima

Se seleccionaron las cinco principales genotipos de frutos de mango (Ataulfo, Haden, Kent, Keitt y Tommy Atkins) producidas en Sinaloa con calidad de Exportación. Cada variedad fue procesada de acuerdo a la temporada de producción (Ataulfo, Haden y Tommy en Julio, Kent en Agosto y Keitt en Agosto-Septiembre). Por cada variedad se utilizaron 48 frutos (3 por replica). La fruta fue cosechada en estado verde-maduro en un huerto ubicado en Aguaruto, Culiacán (Sinaloa México) y procesada en el

Laboratorio de Fisiología y Tecnología Poscosecha del Posgrado en Ciencia y Tecnología de Alimentos de la UAS. Se seleccionó en uniformidad de color y tamaño además de libertad de golpes y crecimiento microbiano. Los mangos fueron lavados y sanitizados con hipoclorito de sodio (300ppm) para posteriormente ser almacenados a 5 y 13°C. Se realizaron retiros cada 7 días por 21 días más un periodo de maduración de 7 días a 21°C.

Obtención del Extracto Metanólico (EM) de pulpa de mango

Se pesó un gramo de tejido liofilizado de pulpa de mango y se homogenizó con 5 mL de metanol absoluto dejándose en agitación por 24 h en refrigeración; transcurrido este tiempo se recuperó el sobrenadante con una micro pipeta y se guardó en refrigeración en un vial ámbar, posteriormente se hicieron dos nuevas extracciones con 2.5 mL bajo las mismas condiciones obteniendo 10 mL de extracto metanólico aproximadamente. El sobrenadante obtenido fue filtrado con papel whatman No 1 y llevado al rota-vapor hasta concentrar a 4 mL. Los extractos metanólicos fueron almacenados a -70°C hasta su uso.

1. **Obtención del Extracto metanólico (EM) de cáscara de mango**

Se pesó 0.1g de tejido de cáscara liofilizada y se homogenizó con 5 mL de metanol absoluto, se llevó a agitación en refrigeración por 24 h, se recuperó el sobrenadante y al pellet obtenido se le adicionaron 2.5 mL más de metanol absoluto para nuevamente llevarse a agitación por 24 h. Los sobrenadantes obtenidos se mezclaron y llevaron a centrifugación (12000 g x 15min a 4°C) para la eliminación de todo residuo. El extracto metanólico fue llevado al rota-vapor a concentración y almacenado -70°C hasta su uso.

MÉTODOS

1. **Índice de Daño por Frío (IDF)**

Se evaluó de acuerdo a lo reportado por Zhao y col [15] con algunas modificaciones. Los frutos de mango se seleccionaron al azar para la determinación del daño por frío utilizando una escala hedónica. Fueron considerados los daños como A=Oscurecimiento de lenticelas, B=Picadura superficial, C=Escaldado, D= Maduración irregular y E=Áreas necróticas. El grado de daño se evaluó visualmente utilizando una escala donde 0=no daño, 1=1-25% de daño, 2=26-50%, 3=51-75% y 4=>76%.

$$IDF = \frac{\sum(Nivel\ de\ DF)x(número\ de\ frutas\ en\ ese\ nivel)}{total\ del\ número\ de\ síntomas}$$

2. **Evaluación de Fenoles Totales**

Los fenoles totales fueron cuantificados por el método de Folin-Ciocalteau (FC) [16]. Se prepararon diluciones con los EM. Se tomaron 20µL del EM diluido y se mezclaron con 180µL del reactivo FC (1N) y 50µL de carbonato de sodio saturado al 7%. La mezcla fue incubada por 60 min en completa oscuridad y leída en un lector de micro placas (Microplate Reader BIOTEC SYNERGY HT) a 725 nm. El metanol fue utilizado como blanco. La cuantificación fue llevada a cabo utilizando una curva de calibración con ácido gálico (50-500ppm). Los resultados fueron expresados como equivalentes de ácido gálico (EAG) (mg EAG/100 gff.).

3. Capacidad Antioxidante

Método DPPH

El análisis se basa en la medición de la capacidad de eliminación de antioxidantes haciendo el radical DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo) estable. El método DPPH fue aplicado de acuerdo a lo reportado por López Angulo [16] con algunas modificaciones. Los extractos metanólicos (EM) fueron disueltos en metanol de acuerdo al tipo de tejido. La solución de Trólox fue utilizada como estándar. Se tomaron 20µL del EM disuelto y se mezclaron con 180µL de la solución DPPH (150µM), se incubaron por 20 min (37°C/Oscuridad) y la absorbancia fue leída a 515nm en un lector de micro placas (Microplate Reader BIOTEC SYNERGY HT). Se utilizó un blanco que contenía 20µL de EM más 180µL de metanol para ajustar a cero el espectro. Se preparó una curva de calibración con una solución de Trólox (0-100µg/mL). Reportándose como Equivalentes de Trolox (µmol ET/100gff).

Método ABTS

El método $ABTS^{*+}$ (ácido 2,2 azinobis-3-etilbenzotiazoline-6-sulfonico) se realizó de acuerdo a los reportado por López Angulo [16] con algunas modificaciones. Se utilizó una solución patrón que incluía una solución de $ABTS^{*+}$ (7mM) más una solución de per sulfato de potasio (140nM). La mezcla fue mantenida en reposo por 12-14 h. en completa oscuridad. Se preparó una solución amortiguadora de PBS más la solución patrón hasta obtener una absorbancia de 0.750 (±0.02) a 734nm. En un tubo de vidrio se colocaron 0.1mLdel EM y 2mL de la solución amortiguadora, se mantuvo en reposo por 30 min a 27°C en completa oscuridad, posteriormente se leyó la absorbancia a 734nm. Se utilizó una curva de Trolox en un rango de 0 a 200µg/mL y se expresó como µmol TE/100gff. Se utilizó metanol como blanco [16].

RESULTADOS

Índice de Daño por Frío (IDF).

Durante el almacenamiento a 5°C por 21 días, el genotipo de mango Kent presentó el menor índice de DF tanto en cáscara como en pulpa (Figura 1). Los genotipos Ataulfo, Keitt y Tommy Atkins fueron los que presentaron un desarrollo constante de síntomas de DF durante los días de almacenamiento alcanzando al día 21 un 22.60, 30.6 y 20.12% de síntomas de daño respectivamente. Los frutos Haden presentaron hasta el día 21 un incremento considerable de síntomas alcanzando un 20% de tejido dañado.

Cuando los frutos fueron trasladados por 7 días a 21°C después de 21 días de almacenamiento a 5°C se pudo observar un incremento considerable en los síntomas siendo el genotipo Keitt el que presentó el mayor IDF, mostrando un 61.32% de tejido dañado. Por otro lado, el genotipo Ataulfo presentó el menor IDF (29.2%), manteniendo la calidad del fruto y alcanzando una madurez normal.

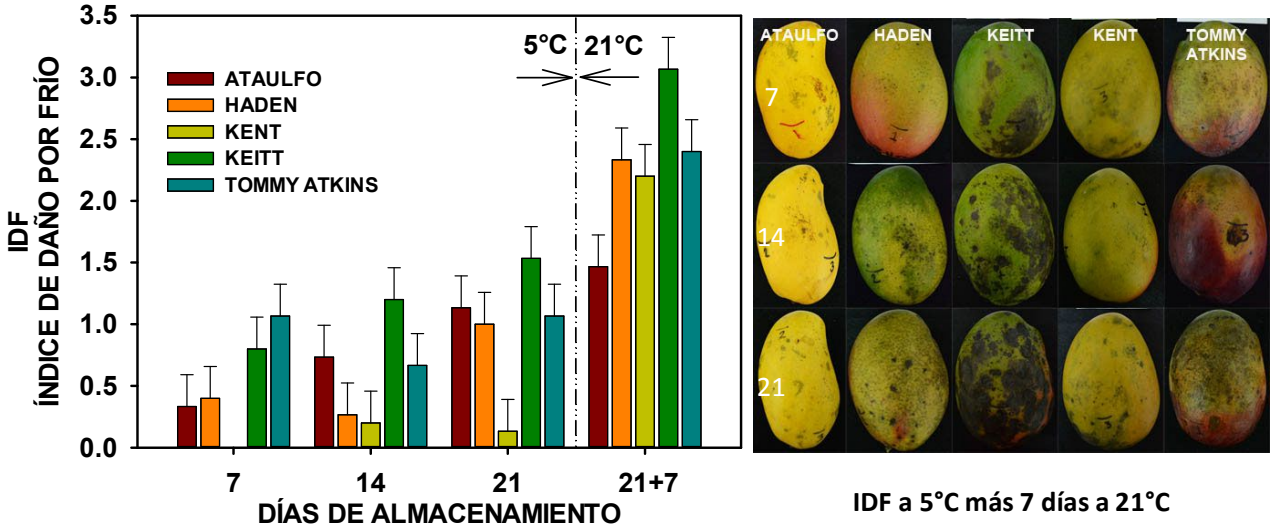


FIGURA 1. Índice de daño por frío de cinco genotipos de mango cultivados en Sinaloa. La fruta fue almacenada por 21 Días a 5 °C más un periodo de maduración de 7 Días a 21°C. Las barras verticales indican un LSD de 0.05.

Fenólicos Totales

El contenido de fenólicos totales fue similar durante el almacenamiento a 5 y 13°C para cada genotipo. Los frutos Ataulfo presentaron la mayor acumulación de fenólicos totales al día 21 de almacenamiento tanto en cáscara como en pulpa alcanzando valores de 105.29 y 103.25 mg AG/1gfs para cáscara y 104.33 y 105.53 mg AG/100gff para pulpa durante el almacenamiento a 5 y 13°C, mostrando diferencia estadística significativa en cáscara. El genotipo de mango Keitt por otro lado presentó un incremento en los fenoles totales sobre todo en cáscara pero sin presentar diferencia estadística entre las temperaturas de almacenamiento; mostrando el 44.38 y 42.3% de fenólicos totales con respecto a cáscara de Ataulfo. Durante el almacenamiento de 21 días a temperaturas bajas más 7 días en maduración, ambos genotipos presentaron una reducción de estos compuestos excepto para cáscara de Keitt 13°C la cual presentó un incremento.

Capacidad antioxidante

1. **DPPH, ABTS**

La capacidad antioxidante por el método DPPH y ABTS presentó resultados similares en cuanto a comportamiento. El genotipo Ataulfo presentó los valores más altos en cáscara almacenada a 5 °C y en pulpa almacenada a 13 °C, mostrando diferencia estadística entre ellos y con el genotipo Keitt a ambas temperaturas durante todo el almacenamiento. La pulpa de mango Keitt presentó muy baja capacidad antioxidante en ambos tejidos comparado con Ataulfo. Por el método ABTS se observaron valores más altos pero el mismo comportamiento descrito previamente, siendo el genotipo Ataulfo tanto en cáscara como en pulpa el de mayor actividad, presentando alrededor de 17 veces más capacidad antioxidante. Cuando los frutos fueron trasladados a 21°C después de 21 días a temperaturas bajas se observó una reducción en la actividad antioxidante de manera general, pero sobre todo en cáscara y pulpa de Ataulfo almacenada a 13°C por los diferentes métodos (ABTS y DPPH, respectivamente).

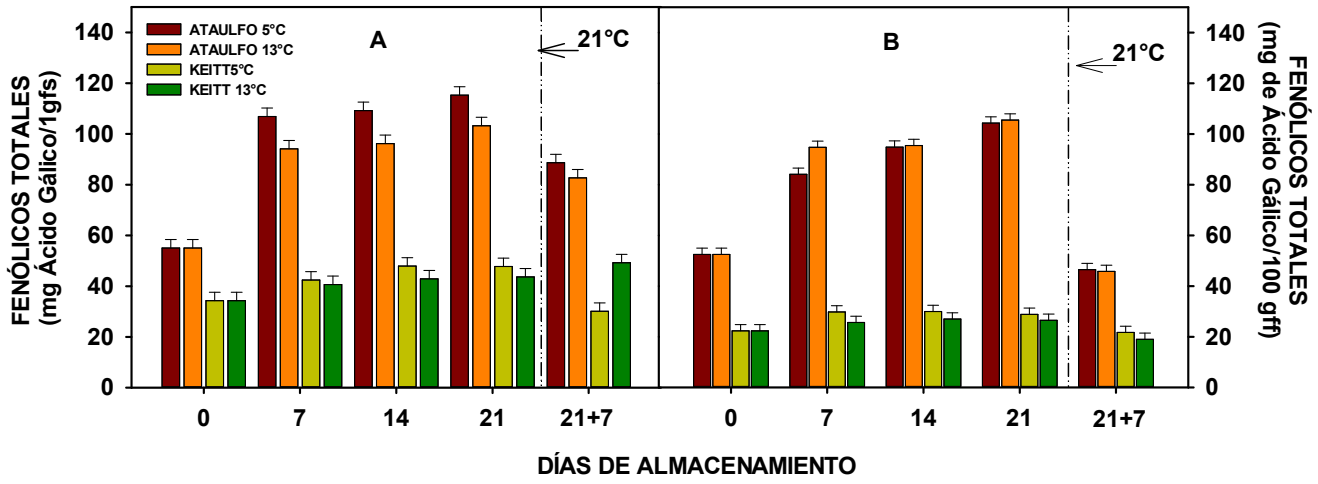


FIGURA 2. Fenólicos totales en cáscara (A) y pulpa (B) de frutos de mango durante el almacenamiento a 5 y 13°C más 7 días a 21°C. Las barras verticales indican un LSD de 0.05.

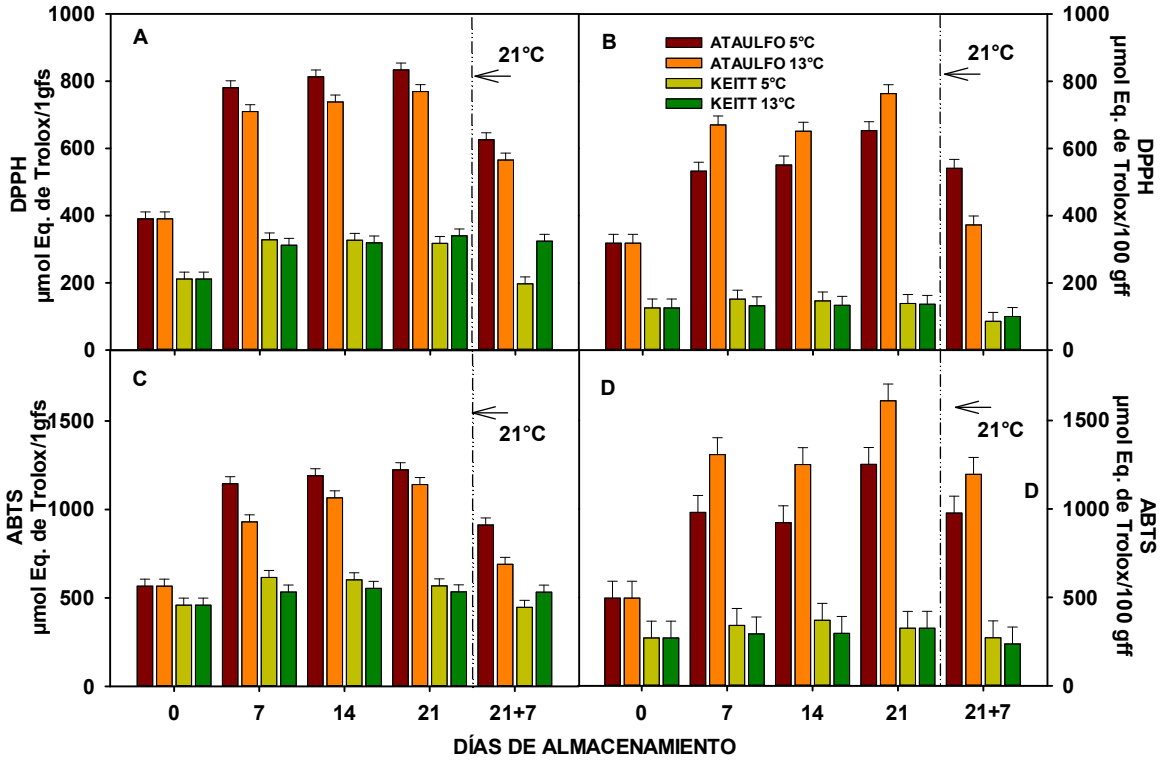


FIGURA 3. Capacidad Antioxidante por los métodos DPPH (Cáscara (A) y Pulpa (B) y ABTS (Cáscara (C) y pulpa (D) en frutos de mango durante el almacenamiento a 5 y 13°C más 7 días a 21°C. Las barras verticales indican un LSD de 0.05.

DISCUSIÓN

En este estudio se pudo observar que el genotipo Ataulfo presentó la mayor resistencia a las temperaturas bajas lo que pudo deberse al alto contenido de compuestos fenólicos y al contenido de sólidos solubles totales los cuales ayudan a darle estabilidad a las proteínas de la membrana celular, permitiéndole mantenerse flexible. Mientras que el genotipo Keitt resultó ser el de mayor sensibilidad a las temperaturas bajas. Se ha reportado que la principal causa de la aparición de síntomas de DF se debe a cambios en la membrana celular, debido al cambio de fase de líquido cristalino a sólido gel, lo que provoca la rigidez de la membrana celular [13]. Nuestros resultados son consistentes con reportes previos en diversas variedades de mango como Keitt almacenado a 12°C [15, 17], mango Choke Anan almacenado a 6 y 12°C [9], mango Zill (5 y 10°C)[18,19], mango Wacheng (0 y 4°C)[20], mango Tainong después de 7 días a 4°C [12], entre otros. Atribuyéndolo a los cambios fisiológicos en la membrana celular generados como consecuencia de la peroxidación y saturación de los ácidos grasos; así como de la inhibición de enzimas responsables de estabilizar la membrana [13,21,22].

Con respecto a los compuestos fenólicos se ha reportado que estos presentan un poder antioxidante significativo. En este trabajo se observó que los niveles de fenólicos totales fue mucho mayor en cáscara que en pulpa en cualquier estado de madurez (17 veces más aproximadamente) y sobre todo para el genotipo Ataulfo permitiéndole generar una menor sensibilidad a las temperaturas bajas, posiblemente debido a que los fenólicos totales exhiben actividad antioxidante gracias a la reactividad de la fracción del grupo fenol, el cual se encarga de barrer los radicales libres mediante la donación de hidrógeno o de electrones [23]. Nuestros resultados difieren de lo reportado por diversos autores los cuales señalan que los fenólicos totales en cáscara son altos solo al inicio de la maduración correlacionándolo con un incremento en la actividad de la enzima Fenilalanina Amonio Liasa, la presencia de daño oxidativo y la reducción de ácido gálico y galotaninos [2, 23,25].

La capacidad antioxidante de los alimentos está determinada por la mezcla de diferentes antioxidantes con diferentes mecanismos de acción, por lo que la capacidad antioxidante en los productos alimenticios puede ser evaluada por diferentes mecanismos. La cáscara de mango de los dos genotipos presenta buenas propiedades antioxidantes pero sobre todo para el genotipo Ataulfo, incrementándose cuando los frutos son sometidos a estrés por frío. Por lo que una mayor actividad antioxidante puede estar estrechamente relacionada con el contenido de fenólicos totales presentes, sobre todo de galotaninos de alto peso molecular que se reducen a galotaninos más pequeños mediante la activación de la galoiltransferasa ayudando a mejorar la capacidad antioxidante del fruto [25]. Resultados similares fueron reportados en frutos de mango Tommy Atkins, Haden, Kent y Keitt debido a que los genotipos presentaron baja actividad antioxidante comparada con el genotipo Ataulfo [24]. Pero no coinciden con lo observado en mango Raspuri y Badami ya que los frutos presentaron mayor capacidad antioxidante en estado inmaduro, lo cual atribuyeron a la integridad del tejido que le permite una mayor habilidad para la donación de protones de hidrógeno [24,25].

CONCLUSIONES

El genotipo de mango Ataulfo presentó la mayor resistencia a las temperaturas de DF mientras que el genotipo Keitt resultó ser el más sensible.

Los frutos de mango Ataulfo presentaron una mayor producción de compuestos fenólicos tanto en cáscara como en pulpa a 5 y 13°C durante todo el almacenamiento a temperaturas bajas.
La variedad Keitt presentó la menor actividad antioxidante por ambos métodos DPPH y ABTS, mientras que el genotipo Ataulfo presentó la mayor capacidad antioxidante tanto en cáscara como en pulpa.
Se encontró una alta correlación entre la acumulación de los compuestos fenólicos y la alta actividad antioxidante para la resistencia a las temperaturas de daño por frío.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a la Dra. Saraid Mora Rochín por las facilidades otorgadas para el uso de su equipo de laboratorio y a la MC. Gabriela López Angulo por el apoyo en la liofilización de todo el material utilizado en este trabajo.

REFERENCIAS

[1]Cortés-Rodríguez M, Guardiola LF, Pacheco R. 2007. Calcio aplication of matrix engineering in the fortification of mango (var. Tommy Atkins) with calcium. Red Rev Científicas América Lat y el Caribe, España y Port.;74:19-26.

[2]Robles-Sánchez RM, Islas-Osuna M A, Astiazarán-García H. 2009. Quality index, consumer acceptability, bioactive compounds, and antioxidant activity of fresh-cut “ataulfo” mangoes (Mangifera indica L.) as affected by low-temperature storage. J Food Sci. 74(3):S126-S134

[3]Hassan FA, Ismail A, Abdulhamid A, Azlan A. 2011. Identification and Quantification of Phenolic Compounds in Bambangan (Mangifera pajang Kort) Peels and Their Free Radical Scavenging Activity. 9102-9111

[4]Baloch MK, Bibi F, Jilani MS. 2011. Quality and shelf life of mango (Mangifera indica L.) fruit: As affected by cooling at harvest time. Sci Hortic (Amsterdam). 130(3):642-646

[5]Abdul Aziz NA, Wong LM, Bhat R, Cheng LH. 2012. Evaluation of processed green and ripe mango peel and pulp flours (Mangifera indica var. Chokanan) in terms of chemical composition, antioxidant compounds and functional properties. J Sci Food Agric. 92:557-563

[6]Cunningham JK, Liu L, Callaghan RC. 2013. Essential (“Precursor”) chemical control for heroin : Impact of acetic anhydride regulation on US heroin availability. Drug Alcohol Depend. 133(2):520-528

[7]Concellón A, Zaro MJ, Chaves AR, Vicente AR. 2012. Changes in quality and phenolic antioxidants in dark purple American eggplant (Solanum melongena L. cv. Lucía) as affected by storage at 0°C and 10°C. Postharvest Biol Technol. 66:35-41

[8]Ribeiro SMR, Barbosa LCA, Queiroz JH, Knödler M, Schieber A. 2008. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian mango (Mangifera indica L.) varieties. Food Chem. 110:620-626

[9]Kondo S, Kittikorn M, Kanlayanarat S. 2005. Preharvest antioxidant activities of tropical fruit and the effect of low temperature storage on antioxidants and jasmonates. Postharvest Biol Technol. 36(3):309-318

[10]Abd L, Taha E. 2005. Chilling injury in mangoes. Tesis Doctoral. Horticultural Production Chains Group, Department of Plant Sciences, Wageningen University, Marijkeweg 22 (527), 6709 PG Wageningen, The Netherlands

[11]Wang B, Wang J, Liang H. 2008. Reduced chilling injury in mango fruit by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and the antioxidant response. Postharvest Biol Technol. 48:172-181

[12]Junmatong C, Uthaibutra J, Boonyakiat D, Faiyue B, Saengnil K. 2012. Reduction of Chilling Injury of "Nam Dok Mai No. 4" Mango Fruit by Treatments with Salicylic Acid and Methyl Jasmonate. J Agric Sci. 4:126-136

[13]Ajila CM, Naidu KA, Bhat SG, Rao UJSP. 2007. Food Chemistry Bioactive compounds and antioxidant potential of mango peel extract. 105:982-988

[14]Zhao Z, Cao J, Jiang W, Gu Y, Zhao Y. 2008. Maturity-related chilling tolerance in mango fruit and the antioxidant capacity involved. J Sci Food Agric. 89:304-309

[15]López-Angulo G, Montes-Avila J, Díaz-Camacho SP, Vega-Aviña R, Ahumada-Santos YP, Delgado-Vargas F. 2014. Chemical composition and antioxidant, α-glucosidase inhibitory and antibacterial activities of three Echeveria DC. species from Mexico. Arab J Chem. doi:10.1016/j.arabjc.2014.11.050

[16]Pesis E, Aharoni D, Aharon Z, Ben-Arie R, Aharoni N, Fuchs Y. 2000. Modified atmosphere and modified humidity packaging alleviates chilling injury symptoms in mango fruit. Postharvest Biol Technol. 19:93-101

[17]Han J, Tian S-P, Meng X-H, Ding Z-S. 2006. Response of physiologic metabolism and cell structures in mango fruit to exogenous methyl salicylate under low-temperature stress. Physiol Plant. 128(1):125-133

[18]Li B, Zhang C, Cao B, Qin G, Wang W, Tian S. 2012. Brassinolide enhances cold stress tolerance of fruit by regulating plasma membrane proteins and lipids. Amino Acids. 43(6):2469-2480

[19]Zhao Z, Jiang W, Cao J, Zhao Y, Gu Y. 2006. Effect of cold-shock treatment on chilling injury in mango (Mangifera indica L. cv. "Wacheng") fruit. J Sci Food Agric. 86 :2458-2462

[20]Chongchatuporn U, Ketsa S, van Doorn WG. 2013. Chilling injury in mango (Mangifera indica) fruit peel: Relationship with ascorbic acid concentrations and antioxidant enzyme activities. Postharvest Biol Technol. 86:409-417

[21]Aghdam MS, Sevillano L, Flores FB, Bodbodak S. 2013. The contribution of biotechnology to improving post-harvest chilling tolerance in fruits and vegetables using heat-shock proteins. J Agric Sci. 1-18

[22]Kim H, Yong J, Kim H. 2010. Antioxidant and antiproliferative activities of mango (Mangifera indica L .) flesh and peel. Food Chem. 121(2):429-436

[23]Chidtragool S, Ketsa S, Bowen J, Ferguson IB, van Doorn WG. 2011. Chilling injury in mango fruit peel: Cultivar differences are related to the activity of phenylalanine ammonia lyase. Postharvest Biol Technol. 62(1):59-63

[24]Palafox-Carlos H, Yahia EM, González-Aguilar G A. 2012. Identification and quantification of major phenolic compounds from mango (Mangifera indica, cv. Ataulfo) fruit by HPLC-DAD-MS/MS-ESI and their individual contribution to the antioxidant activity during ripening. Food Chem. 135(1):105-111

[25]Manthey J a., Perkins Veazie P. 2009. Influences of harvest date and location on the levels of β-carotene, ascorbic acid, total phenols, the in vitro antioxidant capacity, and phenolic profiles of five commercial varieties of mango (Mangifera indica L.). J Agric Food Chem. 57:10825-10830.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

DETERMINATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY IN LARVAE AND ORGANIC WASTE OF THE PROTEIN HYDROLYSATE OF THE INSECT *Tenebrio molitor*

(Determinación de actividad antioxidante del hidrolizado proteico de larva y desecho orgánico del insecto *Tenebrio molitor*)

José de Jesús Luna Díaz[a], Ana Cristina Ramírez Anguiano[a*], José Luis Navarrete Heredia[b], María Judith Sánchez Peña[a], Luis Javier González Ortiz[a], Celso Cortes Romero[a], Gilberto Velázquez Juárez[a], Lizet Yadira Rosales Rivera[c], Sandra Fabiola Velasco Ramírez[a+]

[a]Departamento de Química; Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías; Universidad de Guadalajara; Blvd. Marcelino García Barragán 1421; CP 44430; Guadalajara; Jalisco; México.
[b]Departamento de Botánica y Zoología; Centro Universitario de Ciencias Biológicas Agropecuarias; Camino Ramón Padilla Sánchez 2100; Nextipac 44600; Zapopan; Jalisco; México.
[c]Instituto de Terapéutica Experimental y Clínica, Departamento de Fisiología, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara, Sierra Mojada 950, Colonia Independencia, CP 44340, Guadalajara, Jalisco, México.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: sfqfb30@gmail.com

Área del Conocimiento: Q. Alimentos.

ABSTRACT
In origin animal foods, we find the insects and their derivatives; consumption practice is known Entomophagy. Studies have shown that insects contain high nutritional values, highlighting its protein value. Currently, many researches focus on the role of food antioxidant, which has attracted much attention since they have the ability to protect cells against oxidative damage that causes aging and chronic degenerative diseases. The antioxidant function is provided by various compounds between found the peptides, which are partially digested proteins and which are obtainable by enzymatic hydrolysis. Since insects contain a high amount of proteins, may be a suitable source for obtaining antioxidant peptides. In this context, the antioxidant activity of the protein hydrolysate of the insect *Tenebrio molitor* in their larval stage and the product obtained by feeding (organic waste) was evaluated by determining the inhibitory potential of the 2,2-diphenyl-1-picrihidrazilo radical (DPPH*) and the 2'-azinobis-3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonate radical (ABTS). Antioxidant activity was found in the samples: the organic waste and larvae of *Tenebrio molitor*. This study provides information or bioactive antioxidant potential of insects and their derivatives.

Keywords: larvae, organic waste, *Tenebrio molitor*, hydrolysed.

RESUMEN
Dentro de los alimentos de origen animal, encontramos los insectos y sus derivados; la práctica de su consumo se conoce como Entomofagia. Estudios han demostrado que los insectos contienen valores nutricionales altos, destacando su valor proteico. Actualmente, muchas investigaciones se enfocan en la función antioxidante de los alimentos, la cual ha atraído mucha atención ya que poseen la capacidad de proteger a las células contra el daño oxidativo que provoca envejecimiento y enfermedades crónico-

degenerativas. La función antioxidante es aportada por diversos compuestos entre los que se encuentran los péptidos, que son proteínas parcialmente digeridas y que se pueden obtener por hidrólisis enzimática. Ya que los insectos contienen una alta cantidad de proteínas, podrían ser una fuente apta de obtención de péptidos antioxidantes. En este contexto, se evaluó la actividad antioxidante del hidrolizado proteico del insecto *Tenebrio molitor* en su forma larvaria y del producto obtenido de su alimentación (desecho orgánico), mediante la determinación de la capacidad inhibidora del radical 2,2-difenil-1-picrihidrazilo (DPPH*) y del radical 2'-azinobis-3-etil-benzotiazolina-6-sulfonato ($ABTS^{\bullet+}$). Se encontró actividad antioxidante tanto en el desecho como en la larva de *Tenebrio molitor*. Este estudio proporciona información del potencial antioxidante o bioactivo de los insectos y sus derivados.

Palabras Clave: Larva, desecho orgánico, *Tenebrio molitor*, hidrolizado.

INTRODUCCIÓN

La salud está estrechamente relacionada con la alimentación, el desarrollo en ciencias de alimentos busca implementar y conocer los fundamentos de esta relación [1]. Dentro de los alimentos de origen animal, una alternativa son los insectos y sus desechos; cuyo consumo se conoce como Entomofagia, la cual el hombre ha practicado desde hace cientos de años. En México esta costumbre se ha registrado desde antes de la llegada de los conquistadores, con los insectos se elaboraban muy variados, sabrosos y nutritivos platillos que constituían verdaderos banquetes. En la actualidad, se sabe que los insectos tienen gran capacidad de adaptación a todos los ambientes, se encuentran en todo sitio y son capaces de crear resistencia, se ha observado que poseen un valor nutricional alto y el cultivo para fines comestibles resulta muy sencillo, ya que la cantidad de alimento y agua que ingieren es mínima, además tienen un ciclo de vida corto y un potencial reproductivo sumamente alto. Estos factores hacen a los insectos y en algunos casos sus desechos una fuente de alimentación apta para el consumo humano [2 y 3]. En particular, las características que hacen al gusano de la harina (*Tenebrio molitor),* un insecto de interés científico, además de su potencial de ser utilizado a nivel industrial, es su facilidad de cultivo, crianza y de manipulación; su uso como alimento para incrementar la masa muscular de aves de corral, lleva a pensar que tiene una alta calidad proteica [4]. Las proteínas presentes en el gusano de la harina pudieran ser empleadas como ingredientes alimentarios ya que poseen importantes propiedades funcionales, nutricionales y biológicas; la implementación de la hidrólisis de las proteínas tanto del gusano de la harina como de su desecho podría producir agentes bioactivos. Un alimento funcional es aquel que además de cumplir con las características nutricionales cumple una función específica como puede ser el mejorar la salud y reducir el riesgo a enfermedades; uno de los ingredientes utilizados para elaborar alimentos funcionales son los hidrolizados de proteínas y los derivados de estos, péptidos bioactivos. Los péptidos bioactivos son secuencias de aminoácidos cortas, inactivas dentro de la proteína precursora, pero una vez liberadas tras la digestión o durante el procesado de los alimentos pueden ejercer funciones fisiológicas en el organismo, como por ejemplo, antioxidante, antihipertensiva, antimicrobiana, inmunomoduladora, entre otras [5 y 6]. Los péptidos antioxidantes contienen entre 5 y 16 aminoácidos y funcionan inactivando las especies reactivas de oxígeno (ROS) que son el resultado del metabolismo de organismos aerobios y al ser radicales libres reaccionan con componentes celulares provocando alguna enfermedad degenerativa. Un incremento en las especies oxidantes como superóxido (0_2), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radicales hidroxilo (-OH), promueve la muerte celular y alteraciones metabólicas. De tal forma que los derivados de los hidrolizados proteicos

reducen de los oxidantes y disminuyen su potencia. Considerando la relación que guarda la nutrición con el estado de salud, los péptidos con actividad biológica pueden ayudar a reducir la actual epidemia de enfermedades crónicas degenerativas e infecciosas [7]. Pese a que se ha logrado un progreso considerable en el aislamiento de los productos químicos y evaluación de los mismos, las primeras afirmaciones del potencial de las proteínas y los derivados de los hidrolizados proteicos provenientes de insectos y sus derivados es deficiente; aun es necesario evaluar aspectos fundamentales como la bioactividad, producción a gran escala, la estabilidad alimentaria, biodisponibilidad y efectos secundarios.

METODOLOGÍA

Sede del estudio:
Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías (CUCEI). Universidad de Guadalajara.

Crianza del *Tenebrio molitor (T. molitor*) y obtención del desecho orgánico.
La población de *T. molitor* se obtuvo de una especie taxonómicamente identificada del reservorio del Centro Universitario de Ciencias Biológicas Agropecuarias (CUCBA), Departamento de Botánica y Zoología. Las crías se depositaron en un envase de plástico y se criaron a una temperatura de 25-30°C, cada estadío del insecto se separó en diferentes depósitos. La alimentación consta de una mezcla de salvado, pan seco, harina integral y manzana. El desecho se obtuvo a partir de larvas en su último estadio de *T. molitor* de aproximadamente 9 semanas de edad. El desecho se recolectó y cernió para evitar presencia de residuos alimenticios, finalmente se secó por liofilización y se congeló a -20 °C.

Análisis bromatológico.
Para determinar el valor bromatológico se realizó un análisis proximal, conformado por los análisis de: cenizas, extracto etéreo (EE), proteínas, fibra cruda (FB), extracto libre de nitrógeno (ELN). Para todas las determinaciones se usó muestra secada previamente en una estufa a 85°C por 3 horas. La determinación de cenizas se realizó por calcinación e incineración a 550°C de la materia orgánica, la determinación de extracto etéreo se realizó por el método Soxhlet, la determinación de proteínas fue por el método Kjeldahl, la determinación de fibra fue por el método de Kennedy. El ELN y se obtuvo por diferencia, utilizando la ecuación 100 - (% de EE+ % proteína + % cenizas + % FB). Todos los análisis se realizaron siguiendo la metodología de la AOAC [8].

Obtención de los aislados protéicos del gusano *T. molitor* y su desecho:
A 20 gramos de muestradesengrasada con hexano se le añadió 200 mL de agua y se ajustó su pH a 11 con NaOH 1N, se mantuvo en agitación constante por 1 hora a 50-55 °C, se centrifugó a 3400 rpm por 30 minutos a 5°C, se recuperó el sobrenadante y se ajustó el pH de éste a 5 con HCl 1N, se mantuvo en agitación constante por 1 hora a 50-55 °C, se centrifugó a 3400 rpm por 30 minutos a 5 °C. El precipitado se recuperó y liofilizó obteniendo el residuo sólido de proteínas [9].

Hidrólisis de los aislados proteícos del gusano *T. molitor* y su desecho:
En dos tubos Eppendorf se adicionaron 320 µL de búffer de fosfatos 0.5 M pH 7.4, seguido de 600 µL de la fracción proteíca tanto del gusano como del desecho 15 mg/mL. Se incubó durante 5 min a 50°C. Posteriormente, se añadieron 80 µL de Alcalasa ® 2.4 mUA/mL en solución búffer de fosfatos 0.5 M con

pH 7.4 a 50°C, a la que le corresponde una relación enzima/sustrato (E/S) de 0.8 UA/g. Se realizó una hidrólisis a 50°C en los siguientes intervalos de tiempo: 0, 15, 30, 45, 60, 75 y 90 min utilizando como blanco una mezcla de todos los reactivos sin ser sometido a hidrólisis. La hidrólisis fue detenida por calentamiento a 85°C por 15 minutos [9].

Determinación del grado de hidrólisis (Adler-Nissen, 1979)
Se diluyó 1:5 del hidrolizado y se mezclaron 125 µL de este en un tubo de ensaye con 1 mL de búffer de fosfatos 0.5 M de pH 8.2 y 1 mL de ácido trinitrobenzen-sulfónico (TNBS) al 0.1% en agua. Se incubó en la obscuridad a 50°C por 1 h. Se le añadieron 2 mL de sulfito de sodio 0.1 N para detener la reacción. Se dejó enfriar 30 min a temperatura ambiente para finalmente leer a una longitud de onda de 340 nm [9].

Determinación de la capacidad antioxidante del gusano, del desecho orgánico y del aislado proteico del gusano y del desecho.
- Determinación actividad antioxidante por método del radical $ABTS^{\bullet+}$: el radical $ABTS^{\bullet+}$ es oxidado por peróxidos y agentes oxidantes en su forma catiónica la cual es de color verde intenso. La presencia de antioxidantes reacciona con el radical $ABTS^{\bullet+}$ impidiendo su oxidación y cambiando a coloración incolora. A una serie de concentraciones diferentes de extracto acuoso de cada una de las muestras se le añadió 1800 µL de radical $ABTS^{\bullet+}$ estandarizado a un valor de 1 de absorbancia y se midió la desaparición del color verde espectrofotométricamente a 414 nm [9].
- Determinación de actividad antioxidante por método del radical DPPH: el radical coloreado 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo es reducido por el antioxidante, este efecto se visualiza por el cambio del color púrpura del radical a color amarillo a 517 nm. A una serie de concentraciones diferentes de extracto alcohólico de cada una de las muestras se le añadió 1800 µL de DPPH estandarizado a un valor de 1 de absorbancia y se midió la formación de color amarillo espectrofotométricamente a 517 nm [9].

RESULTADOS
Los resultados de la investigación se presentan a continuación:

Proximal (base seca)	Cantidad (g/100 g)
Proteínas (Nx6.25)	47.70
Extracto etéreo	37.70
Cenizas	7.1
Fibra cruda	3
ELN	4.92

Tabla 1.- Analisis proximal del gusano *T. molitor*

Proximal (base seca)	Cantidad (g/100g)
Proteínas (Nx6.25)	40.65
Extracto etéreo	23.58
Cenizas	6.44
Fibra cruda	14.6
ELN	14.74

Tabla 2.- Analisis proximal del desecho orgánico

En la tabla 1 y 2 se muestran los resultados del análisis proximal del gusano *T. molitor* y su desecho orgánico; se puede observar que el componente mayoritario es la proteína bruta, con valores desde 40% hasta 47%.

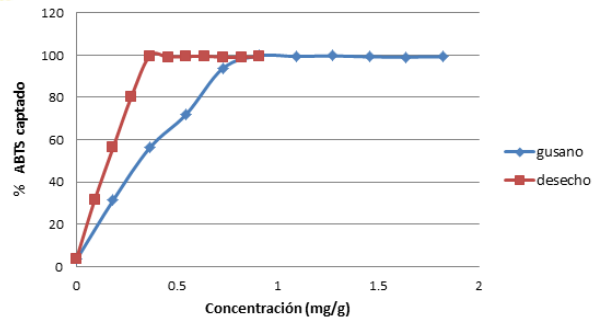


Figura 3.- Capacidad de captación del radical $ABTS^{\bullet+}$ de extracto acuoso de gusano y desecho del *T. molitor*

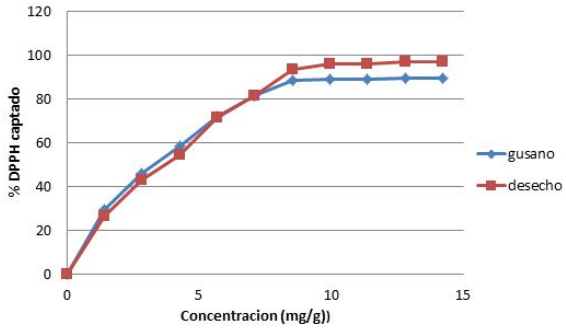


Figura 4.- Capacidad de captación del radical DPPH de extracto alcohólico del gusano y desecho.

En la figura 3, se observa que el extracto acuoso del desecho del *T. molitor* mostró una mayor actividad antioxidante, pues capta el 99% del radical $ABTS^{\bullet+}$ a una menor concentración (0.32 mg/g), a diferencia del gusano (0.81 mg/g). En la figura 4, se muestra se puede observar que el extracto alcohólico del desecho orgánico y del gusano mostraron una actividad antioxidante similar (8.5 mg/g); sin embargo, el desecho logró captar y estabilizar más radical DPPH (94%) que el gusano (88%). Con los extractos acuosos y alcohólicos obtenidos de la proteína del gusano y desecho orgánico se encontró lo siguiente: el extracto acuoso de la proteínas del gusano capta un 100% del radical $ABTS^{\bullet+}$ a una concentración de 0.33 mg/g, mientras que el extracto acuoso de la proteína del desecho orgánico capta 98.6% del radical ABTS a una concentración de 0.013 mg/g. El extracto alcohólico de la proteínas del gusano capta un 82.4% del radical DPPH a una concentración de 12.43 mg/g, mientras que el extracto alcohólico de la proteína del desecho orgánico capta 82% del radical DPPH a una concentración de 8.87 mg/g.

DISCUSIONES

En la Tabla 3, se comparan los resultados de la actividad antioxidante de las muestras con algunos alimentos comunes. [10]

ALIMENTO	ABTS mg/100g	DPPH (mg/100g)
Uva verde	85	137.1
Uva morada	214.4	183
Trigo	452.8	221.4
Té verde/negro	126.4	133.5
Vino tinto	223	196.4
Café	59.6	61.7
Gusano	81	852
Desecho orgánico	32	844
Proteína de gusano	33	1243
Proteína de desecho	1.3	887

Tabla 3.- Actividad antioxidante de variedad de alimentos

Se observa que la actividad antioxidante de los extractos acuosos de todas las muestras es mayor que la de los alimentos enlistados, mientras que la actividad antioxidantes de los extractos alcohólicos es

menor, ésto da una idea acerca de la naturaleza hidrofilia de los componentes antioxidantes presentes en la muestras

CONCLUSIONES

La actividad antioxidante fue mayor en el desecho orgánico y la proteína del desecho que en el gusano y la proteína del gusano, a su vez es mayor en el extracto acuoso que en el extracto alcohólico. Todas las muestras alcanzan a captar más de 80% de los radicales $ABTS^{\bullet+}$ y DPPH. Esto demuestra que el *Tenebrio molitor* y el desecho son alternativas a fuentes de antioxidantes y que es probable que sus proteínas a tener una alta actividad antioxidante en extracto acuoso sean componentes de naturaleza hidrofílica y una fuente apta de péptidos bioactivos

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Guadalajara y a CONACyT por su apoyo y patrocinio a la investigación.

REFERENCIAS

[1] Organización Mundial de la Salud (2003). Dieta, nutrición y prevención de enfermedades crónicas. OMS, Serie de Informes Técnicos; 916. Capítulo 3 pag. 24-37.

[2] Viesca-González, F. C. y Romero-Contreras, A. T. (2009). La Entomofagia en México. Algunos aspectos culturales. El Periplo Sustentable. UNAM. Número 16 pag 57 – 83.

[3] Ramos-Elorduy J., Viejo Montesinos J. L., (2007) "Los insectos como alimento humano: Breve ensayo sobre la entomofagia, con especial referencia a México" Bol. R. Soc. Esp. Hist. Nat. Sec. Biol., 102 (1-4), 61-84.

[4] Ramos-Elorduy J, Ávila González E, Rocha A. (2002). Use of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) to Recycle Organic Wastes and as Feed for Broiler Chickens. Journal of Economic Entomology, 95(1):214-220.

[5] Segura-Campos, M., Chel-Guerrero L., Betancur-Ancona, D., (2013). Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias. Facultad de Ingeniería Química, Universidad Autónoma de Yucatán, México. Omni Science pag 11-27.

[6] Mulero-Cánovas J., Zafrilla-Rentero P., Martínez-Cachá Martínez A., Leal Hernández M., Abellán-Alemán b J. (2011). "Péptidos bioactivos". Clínica e Investigación en Arteriosclerosis. Volume 23, Issue 5, September–October 2011, Pages 219–227.

[7] Quintanar-Escorza M. A., Calderón-Salinas J. V., (2009). "La capacidad antioxidante total. Bases y aplicaciones". Revista de Educación Bioquímica. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 28(3): 89-101.

[8] Gallegos Castillo S., López Martín del Campo M.E., Abascal Johnson M.M.S. (2009). Métodos de análisis para alimentos. México, Jalisco: Amate. p. 15 – 31.

[9] Adler-Nissen J. y Olsen H.S. (1979). The influence of peptide chain length on taste and functional properties of enzymatically modified soy protein. ACS Symp. Ser., 92:125-146.

[10] Floegel A, Kim DO, Chung SJ, Koo SI, Chun OK. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. Journal of Food Composition and Analysis. 24: 1043–1048.

APPLICATION OF FOURIER TRANSFORM INFRARED (FTIR) SPECTROSCOPY IN COMBINATION WITH ATTENUATED TOTAL REFLECTANCE (ATR) FOR THE DETERMINATION OF MATURATION INDEXES IN TEQUILAS.

(Aplicación de la técnica de espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) en combinación con reflexión total atenuada (ATR) para la determinación de índices de maduración en tequilas)

Pedro Martín Mondragón Cortez[a,*], Julisa López Ramírez[a], María Guadalupe Guatemala Morales[a], Enrique Arriola Guevara[b]

[a] Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A. C. (CIATEJ), Unidad de Tecnología Alimentaria, Av. Normalistas No. 800, Col. Colinas de la Normal, C. P. 44270, Guadalajara, Jalisco, México.
[b] Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingeniería (CUCEI), Universidad de Guadalajara, Departamento de Ingeniería Química, Blvd. Marcelino García Barragán No. 1412, Guadalajara, Jal., 44430, México.

*Pedro Martín Mondragón Cortez,
Autor para correspondencia: pmondragon@ciatej.mx

Área del Conocimiento: Q. Alimentos.

ABSTRACT
Tequila is a traditional beverage of Mexico and different types are available on the market, mainly, white, rested and aged, these last two are stored in oak or encino barrels for a specific time with the objective of change color and flavor. Currently, the tequila has the worldwide recognition for their sensory properties. However, one of its main problems has been its adulteration. In this work, by using Fourier transform infrared-attenuated total reflectance (FTIR-ATR) spectroscopy were obtained infrared spectra of different types of tequila (white, rested and aged) with the objective of to observe spectral changes that allow a rapid identification according to the type of tequila. The spectra were obtained carrying out an innovative method, which was based on the evaporation of a sample tequila onto the crystal surface of the ATR device and, immediately after, the spectrum of the sample adhered to the crystal was obtained in the interval between 1200 and 850 cm^{-1}. The results showed spectral differences between the tequilas. However, white tequila showed no spectral signal. Therefore, it can be concluded that spectral signals found were due to compounds generated during the interaction tequila-barrel in the rested and aging process. According to the results obtained, the FTIR-ATR method of obtaining spectra can be useful to discriminate types of tequila by using a small amounts of sample and can also be used to establish better control in the quality of tequila during barrel maturation.

Keywords: Tequila, FTIR, ATR, quality.

RESUMEN
El Tequila es una bebida tradicional de México y diferentes tipos se encuentran disponibles, principalmente blanco, reposado o añejado, estos dos últimos madurados en barricas de roble o encino

durante un tiempo dado con el objetivo de cambiar su color y aroma. Actualmente, el tequila tiene el reconocimiento alrededor del mundo debido a sus propiedades sensoriales. Sin embargo, su adulteración es uno de sus principales problemas. En este trabajo, aplicando la técnica de espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier-reflexión total atenuada (FTIR-ATR) se obtuvieron espectros de infrarrojo de diferentes tipos de tequila (blanco, reposado y añejado) con el propósito de investigar los cambios espectrales que permitan identificar rápido y en forma precisa al tequila de acuerdo con su tipo. Los espectros fueron obtenidos utilizando un método innovador, el cual estuvo basado en la eliminación por evaporación de la muestra de tequila sobre la superficie del cristal del accesorio de ATR, e inmediatamente se obtuvo el espectro del residuo adherido al cristal en el intervalo de 1200 a 850 cm^{-1}. Los resultados obtenidos mostraron diferencias espectrales entre los tequilas seleccionados. Sin embargo, el tequila blanco no mostró ningún tipo de señal. Por lo tanto, es posible inferir que las señales espectrales encontradas tuvieron su origen en los compuestos generados durante la interacción tequila-barrica en el proceso de reposado y añejado. De acuerdo a los resultados obtenidos, el método de FTIR-ATR utilizado puede ser útil para discriminar tipos de tequila usando una mínima cantidad de muestra y también puede ser utilizado para controlar la calidad del tequila durante el tiempo de maduración en barricas.

Palabras Clave: Tequila, FTIR, ATR, calidad.

INTRODUCCIÓN

El Tequila es una bebida alcohólica originaria de México, la cual ostenta una denominación de origen. Esta bebida se elabora a partir de la fermentación y destilado de los jugos extraídos del agave, en particular del llamado agave azul (*Agave tequilana* Weber var. azul) [1]. Comercialmente hablando los tequilas del tipo blanco, reposado y añejo son muy populares entre el público consumidor. El tequila blanco es un producto que se envasa enseguida del proceso de destilación. El tequila reposado es un producto madurado entre dos y doce meses en barricas de roble blanco o encino, mientras que el tequila añejo adquiere este nombre ya que es madurado por más de un año y hasta tres años [1]. El tequila goza de la preferencia de muchos consumidores tanto a nivel nacional como internacional. Sin embargo, el tequila ha sido objeto de adulteraciones, además de aparecer el mercado producto con un origen de elaboración incierto y con información falsa o incompleta en la etiqueta, por ejemplo, el declarar que es un tequila añejo cuando no lo es. Por lo tanto, varias técnicas de análisis han sido propuestas para detectar las adulteraciones y para el aseguramiento del origen y calidad del tequila [2-6]. En este trabajo se propone el uso de una nueva metodología basada en la técnica de FTIR-ATR para la detección del tipo de tequila, principalmente entre la distinción de tequilas reposados y añejos. Si bien, la técnica de FTIR-ATR presenta algunas dificultades en la medición de bebidas alcohólicas, ya que se obtienen en sus espectros prácticamente las señales del alcohol y el agua, lo cual hace difícil su diferenciación. Sin embargo, hoy en día es posible eliminar de los espectros de infrarrojo las señales del agua y etanol, además los equipos actuales poseen una mejor resolución espectral (incremento de la relación señal/ruido). La técnica de FTIR tiene la ventaja de ser rápida, utiliza poca cantidad de muestra y generalmente no utiliza solventes contaminantes [7].

METODOLOGÍA

Para realizar este trabajo se adquirieron en vinaterías de la ciudad muestras de diferentes marcas comerciales de tequila blanco, reposado y añejo. El espectrómetro de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) utilizado fue el modelo CARY 360 marca Agilent. El equipo se operó a una resolución de 4

cm^{-1} y se realizaron 8 barridos. Antes de la obtención de cada uno de los espectros, se determinó la señal de fondo (*background*) del aire, Además, se utilizó un accesorio de interacción de reflexión total atenuada (ATR) con un cristal de ZnSe/diamante con un diámetro de 1.8 mm. En este accesorio, se colocaron, directamente de la botella, cada una de las muestra de tequila a estudiar (~18 mg) y enseguida, para cada una de las muestra, se dejaron evaporar (el alcohol y el agua) a la temperatura del laboratorio (~20 °C) aproximadamente durante un tiempo de 15 minutos. Una vez transcurrido el tiempo de evaporación se comenzó con la adquisición del espectro de infrarrojo correspondiente.

RESULTADOS

En la Figura 1 se muestra un espectro de infrarrojo de un tequila reposado obtenido de una muestra tomada directamente de la botella.

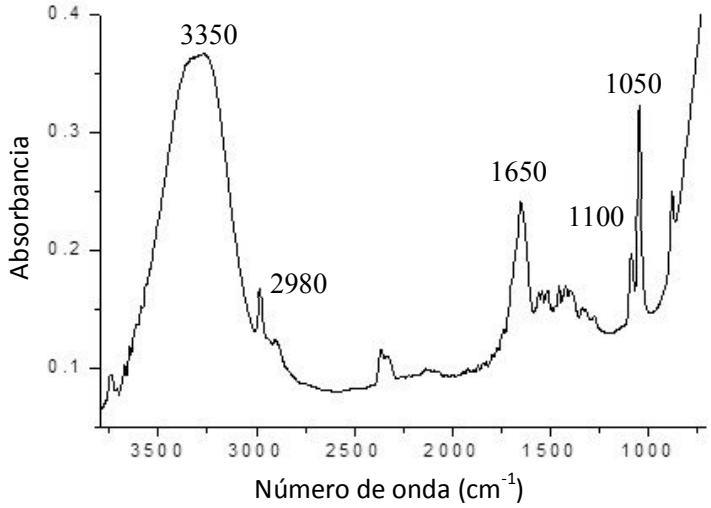


Figura 1. Espectro de infrarrojo de un Tequila reposado

Por otro lado, en la Figura 2 se puede observar una secuencia de espectros de infrarrojo (1250-700 cm^{-1}) en función del tiempo, esta secuencia representa la eliminación paulatina de señales espectrales provenientes del etanol y agua de una muestra de tequila, debido a la evaporación que sufrieron estos dos componentes durante el tiempo de permanencia sobre el cristal del accesorio de ATR. En las Figuras 3 y 4 se muestran, en el intervalo de 1250 a 900 cm^{-1}, los espectros de infrarrojo de la muestras de tequila (reposados y añejos), medidos posterior a su evaporación sobre la superficie del cristal del accesorio de ATR acoplado al espectrómetro de FTIR.

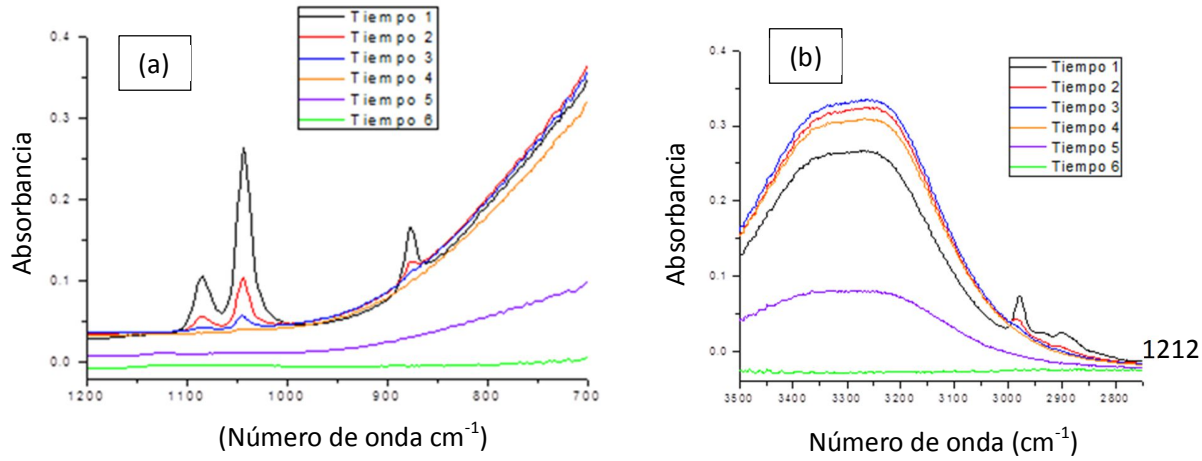


Figura 2 Secuencia de espectros de infrarrojo de una muestra de tequila donde se observa la evolución de la desaparición de picos durante su evaporación sobre la superficie del cristal de ATR: a) etanol y b) agua.

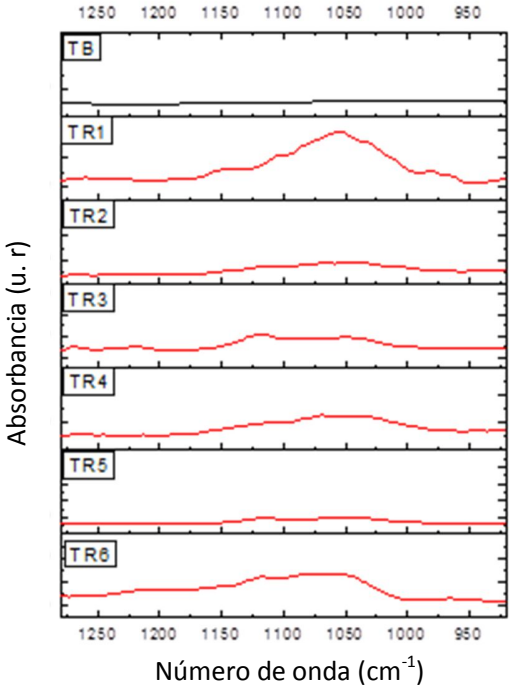


Figura 3. Espectros de infrarrojo de las muestras adheridas al cristal de ATR después de la evaporación de tequilas reposados

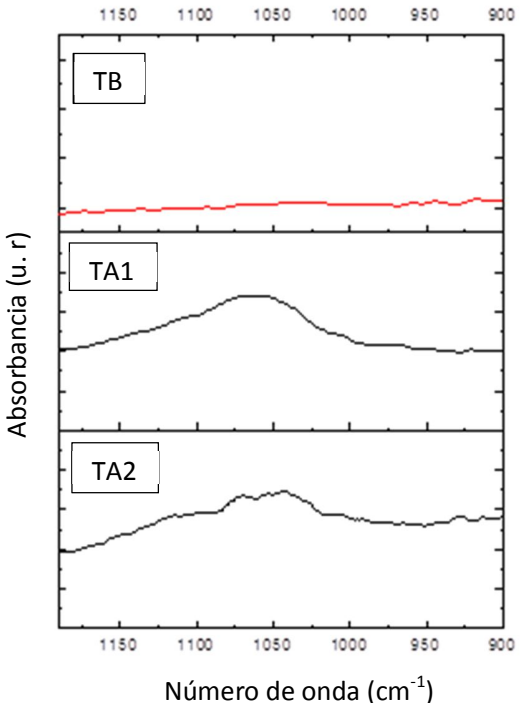


Figura 4. Espectros de infrarrojo de las muestras adheridas al cristal de ATR después de la evaporación de tequilas añejos.

DISCUSIONES

Composicionalmente hablando el tequila es una mezcla mayoritariamente de etanol y agua, además de contar con pequeñas cantidades (en el orden de ppm o ppb) de minerales y de cientos de compuestos volátiles y semi-volátiles que le confieren sus propiedades aromáticas y de sabor. Por lo tanto, en un espectro de infrarrojo de una muestra de tequila, de cualquier tipo, las bandas dominantes estarán asociadas a las moléculas de etanol y agua, tal y como se puede observar en la Figura 1, para el caso de un tequila reposado. En este espectro alrededor de los 3350 cm^{-1} se observó un pico que está asociado a una vibración de estiramiento de los enlaces O-H, pertenecientes tanto al agua como al etanol. Aproximadamente a 2980 cm^{-1} se encuentra un pico que está asignado a una vibración de estiramiento en el enlace C-H proveniente del etanol del tequila [7]. Alrededor de 1650 cm^{-1} se observa un pico que está atribuido a una vibración de bandeo del enlace H-O-H (agua) [7]. También, se observaron entre 1100 y 1050 cm^{-1} dos picos asociados con vibraciones de estiramiento de los enlaces C-O procedentes de la molécula del etanol [7]. Por último, de acuerdo a la Figura 1, en el espectro de infrarrojo del tequila no fue factible observar bandas de absorción asociadas con algún otro tipo de compuesto. Sin embargo, al dejar evaporar el tequila (etanol y agua) durante un intervalo aproximadamente entre 3 y 15 minutos sobre la superficie del cristal del accesorio de ATR, se observó, tal y como se muestra en la Figura 2, la desaparición paulatina de los picos del etanol (1100, 1050 y 875 cm^{-1}) y del agua, respectivamente. Una vez observada la desaparición por completo del tequila, se apreció que una tenue cantidad de muestra (en forma de mancha) se encontraba adherida al cristal del ATR. Este hecho fue solamente observado en las muestras de tequila reposado y añejo, mientras que en el tequila blanco no fue apreciada ninguna señal espectral, por lo tanto se infirió que la muestra adherida al cristal fue producto de sustancias originadas por la interacción química entre el tequila y la barrica de roble blanco o encino, donde se lleva a cabo tradicionalmente el reposado o añejamiento del tequila. En las Figuras 3 y 4 se muestra una serie de espectros de infrarrojo en el intervalo comprendido entre 1250 y 900 cm^{-1}, los cuales fueron obtenidos del residuo adherido al cristal de ATR producto de la evaporación de tequila reposado y añejo. Los espectros de infrarrojo de los residuos de tequila reposado son similares entre ellos (Figura 3), es decir mostraron un pico ancho y con relativamente poca altura (absorbancia), lo cual es lógico debido a la poca cantidad de muestra que interaccionó con el haz de infrarrojo durante la medición. La variabilidad mostrada por los espectros de los tequilas reposados comerciales podría considerarse como normal, ya que puede ser debido a los diferentes tiempos de almacenamiento en la barrica y/o al tipo barrica utilizada (roble o encino) a lo que fueron sometidos los tequilas e incluso al tipo de preparación de la barrica (grado de quemado en la pared de la barrica). El origen de estas señales espectrales, por la posición mostrada (región conocida como de huella digital), es probable que procedan de una serie de enlaces del tipo C-H, C-O, C-C, entre otros originados en moléculas orgánicas de las siguientes familias: ácidos, ésteres y aldehídos de cadena larga, furanos, terpenos, fenoles, etc. Además, también estas señales espectrales pueden tener su origen en sustancias como color caramelo, extracto de roble o

encino, glicerina o jarabe a base de azúcar, las cuales pueden ser añadidas al tequila para ajustar la coloración del producto y que son permitidas por la norma oficial [1].
Por otro lado, los espectros de infrarrojo de los tequilas añejos (Figura 4) mostraron un parecido en la señal, la cual mostró un pico de absorción bien definido alrededor de los 1060 cm^{-1}, el cual no fue observado en los espectros de los tequilas reposados. Por la posición del pico de absorción es presumible que haya sido originado por la vibración del enlace C-O, el cual podría provenir de alguno de los compuestos ya mencionados con relación al caso del tequila reposado.

CONCLUSIONES

En este trabajo se llevó a cabo un novedoso sistema de medición del tequila por FTIR-ATR, el cual se basó en la eliminación del etanol y agua de la muestra de tequila sobre el cristal del accesorio de ATR, con el propósito de observar otras señales espectrales, las cuales se observan mayoritariamente en un espectro. En el intervalo entre 1250 y 850 cm^{-1} se observó una señal espectral proveniente del residuo de tequilas reposados y añejos, la cual podría ser utilizada como un parámetro de diferenciación entre marcas y/o tiempos de maduración de los productos, así como detectar una potencial adulteración.

REFERENCIAS

[1] Norma Oficial Mexicana NOM -006-SCFI-2012, Bebidas alcohólicas-tequila- especificaciones.

[2] C. Bauer-Christoph, C., Christoph, N, Aguilar-Cisneros, B.O., López, M.G., Richling, E., Rossmann, A., Schreier, P. (2003). "Authentication of tequila by gas chromatography and stable isotope ratio analyses", European Food Research and Technology, 217(3): 438-443.

[3] Lachenmeier, W., Richling, E., López, M. G., Frank, W., Scheier, P. (2005). "Multivariate analysis of FTIR and ion chromatographic data for the quality control of tequila", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53: 2151–2157.

[4] Muñoz-Muñoz, A.C., Charles Grenier A., Gutiérrez-Pulido, H., Cervantes-Martínez, J. (2008). "Development and validation of a High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detection method for the determination of aging markers in tequila". Journal of Chromatography A, 1213 (2): 218-223.

[5] López-Ramírez, J. E., Martín-del-Campo, S.T., Escalona-Buendía, H., García-Fajardo, J.A., Estarrón-Espinosa, M. (2013). "Physicochemical quality of tequila during barrel maturation. A preliminary study". CyTA - Journal of Food, 11(3):223-233.

[6] Alcázar- Magaña A., Wrobel K.,Torres-Elguera J. C.,Corrales-Escobosa A. R., Wrobel K. (2015). "Determination of Small Phenolic Compounds in Tequila by Liquid Chromatography with Ion Trap Mass Spectrometry Detection". Food Analytical Methods, 8(4): 864-872.

[7] Stuart B. (2004). Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications. Chichester England, John Wiley and Sons Ltd,

EVALUATION OF THE NUTRITIONAL, SENSORY QUALITY AND STABILITY OF A SNACK CHIP TYPE AMARANTH AND OATS

(Evaluación de la calidad nutrimental, sensorial y la estabilidad de una botana tipo chip de amaranto y avena)

Ferretiz-Contreras Diana[a], Álvarez-Salas Claudia[b+], Alvarado-Galván Magdalena[b*]

[a] Programa de Maestría en Bioprocesos Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Manuel Nava No.6, Zona Universitaria, San Luis Potosí, S.L.P., México C.P. 78210
[b] Facultad de Ingeniería, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Manuel Nava No.8, Zona Universitaria, San Luis Potosí, S.L.P., México C.P. 78210

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: claudia.salas@uaslp.mx

Área del Conocimiento: Q. Alimentos.

ABSTRAC
One of the problems in the development of cardiovascular disease is not having healthy food choices, such as snack foods, products with high consumption and causing disruptions in the diet. The aim of this research was to evaluate the physicochemical composition, stability and a snack acceptability based on amaranth flour and oats, verifying the hypothesis that the snack developed provides greater nutritional value, stability and consumer acceptability than a commercial snack. The design of the snack was performed using the statistical method, coordinated simplex system, obtaining the proportion of 75% of amaranth flour and 25% oat flour. The mixture was subjected to a rolling process, a cast type "chip" and baked at 150 ° C for 4 min. Subsequently proposed physicochemical analysis was performed by the AOAC, as is the content of protein, lipids, carbohydrates, moisture, fiber and ash. To analyze the stability of the product adsorption isotherms were performed. Sensory analysis of the snack preference test was applied with affective judges between the ages of 17-26 years with a sample of 125 consumer judges, for statistical analysis, system analysis ranges used. The protein content (12.25%), moisture (3.12%) and fiber (10.49%), 75-25% of the snack was significantly higher ($p < 0.05$) than the control, also presented a low lipid content (6.78 %) compared to the control present (22.28%). The formulation 75-25% and control, showed a good fit to the model ($r2 > 0.95$) for both isotherms. Water higher gain was observed in equilibrium, in the formulation 75-25% relative to control, $m = 2610 > 1.20$. Regarding the snack preference 75-25% had higher acceptability ($p < 0.05$) with respect to commercial snack. Making it possible to develop a snack with a high content of amaranth, characteristics nutritive and consumer acceptable sensory.

Keywords: Snack, amaranth isotherms sensory analysis.

RESUMEN
Uno de los factores asociados al desarrollo de enfermedades cardiovascular es la falta de alimentos saludables, del tipo de botanas las cuales son de consumo frecuente y causan problemas de desorden en la alimentación. El objetivo de esta investigación fue evaluar la composición fisicoquímica, la estabilidad y la aceptabilidad de una botana elaborada a base de harina de amaranto y avena. La

hipótesis planteada para este trabajo fue que la botana desarrollada proporciona un mayor valor nutricional, buena estabilidad y aceptabilidad de los consumidores en comparación con una botana comercial. El desarrollo de la botana se realizó utilizando el método estadístico de sistema coordinado simplex, obteniendo como formulación a evaluar una botana con proporciones de 75% de harina de amaranto y 25% de harina de avena. La pasta obtenida se sometió a un proceso de laminación, para obtener una botana tipo "chip" y se horneó a 150 ° C durante 4 min. Posteriormente se realizó un análisis fisicoquímico utilizando los métodos propuesto por la AOAC. La estabilidad del producto y control se evaluó mediante las isoterma adsorción a 30 ° C. Se realizó un análisis sensorial a través de una prueba preferencia con 125 jueces consumidores entre las edades de 17-26 años y se empleó el análisis estadístico por rangos. El contenido de proteína (12,25%), humedad (3,12%) y fibra (10,49%), de la botana amaranto-avena (75%-25%) fue significativamente mayor ($p < 0,05$) que en el de control, también presentó un bajo contenido de lípidos (6,78%) en comparación al control (22,28%). La fórmula de 75-25% y control, mostraron un buen ajuste al modelo ($R^2 > 0,95$) para ambas isotermas. La ganancia en el contenido de agua fue mayor en la botana con relación al control, al igual que el agua de monocapa ($m = 2,610 > 1,20$). En cuanto a la preferencia de la botana, esta tuvo aceptabilidad ($p < 0,05$) con respecto al control. Por lo que se puede concluir que es posible el desarrollo de una botana con un alto contenido de amaranto, que mejore las características nutritivas y sensoriales que sean aceptables para el consumidor.

Palabras Claves: Botana; amaranto; isoterma; análisis sensorial.

INTRODUCCIÓN

En México la obesidad y el sobrepeso son el principal problema de salud pública en niños y el segundo en adultos, destacando como factores determinantes el sedentarismo y la mala alimentación asociada a hábitos alimenticos poco saludables, sobre todo la preferencia a consumir alimentos ricos en grasas saturadas con pocos nutrientes, llamados comida chatarra, botanas o “snacks” [1]. Este tipo de alimentos se caracterizan por ser de fácil consumo y manipulación, además que no requieren de preparación previa para ingerirlos y están destinados a satisfacer el hambre entre las comidas formales, sin embargo una ingesta de forma continua de estos productos origina un desequilibrio en la dieta alimentaria. Como consecuencia de los problemas de salud asociados al consumo de dichos productos, en la actualidad existe un enorme interés por el desarrollo de botanas saludables elaboradas a base de cereales, ricas en proteínas y que mezclen texturas diferentes, entre las que destacan la textura crujiente y crocante [2]. Entre los diversos cereales que se producen en México, es el amaranto un género con un potencial que puede ser utilizado en la elaboración de botanas nutritivas. Entre las características nutrimentales que se destacan del amaranto se puede mencionar su alto contenido de proteína que va del 12 al 18%, y su composición de aminoácidos se acerca al óptimo balance del requerido en la dieta humana [3]. También contiene ácidos grasos esenciales como son el oleico, linoleico y α-linolenico, que ayudan a reducir los niveles de lípidos de baja densidad (LDL) en la sangre, disminuyendo las enfermedades cardiovasculares [4]. Otro cereal con un gran potencial en el desarrollo de botanas es la avena, debido al que contiene fibra soluble conocida como β–glucanos. Los efectos saludables que se asocian a los β–glucanos están bien documentados, entre los que podemos mencionar que decrece el riesgo a padecer enfermedades crónicas como la diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares, ya que reduce la glucosa en sangre postprandial, los niveles de colesterol en sangre y la actividad antiaterogenica [5] y brinda un soporte estructural a la matriz del alimento, ya que con una

mínima cantidad de β–glucanos es suficiente para formar un gel fuerte [6,7]. En este contexto uno de los desafíos en el diseño de productos alimentarios es el buscar el equilibrio entre la calidad nutrimental del producto y su aceptabilidad al consumidor evaluando propiedades sensoriales como son la textura el color y la apariencia.

METODOLOGÍA

Para formulación propuesta de la botana, la harina representó el 30% del peso total y consistió de una mezcla de harinas amaranto-avena 75%-25% respectivamente. Los ingredientes se mezclaron hasta formar una pasta homogénea y tersa para posteriormente laminarla. Luego se cortaron las botanas y se colocaron en charolas especiales con canalillas (para dar la forma a la botana tipo chip) y finalmente se hornearon a 150°C por 4 minutos. La composición de la botana obtenida y el control se determinó utilizando los métodos propuestos por AOAC. Para elaborar las isotermas de adsorción a 30°C, se utilizó el método gravimétrico estático de soluciones de sales saturadas descrito por [8]. Los datos experimentales fueron ajustados al modelo matemáticos de GAB (Guggenheim-Andersson-DeBoer). Se realizó una prueba de preferencia entre la botana elaborada y una botana comercial (control), valorando la aceptabilidad general del producto. Se uso una muestra de 125 jueces consumidores entre 18 y 24 años. Los datos fueron analizados estadísticamente mediante el análisis de ordenamiento por rangos.

RESULTADOS

En La Tabla 1 se muestra el resultado del análisis fisicoquímico realizado a la botana elaborada y a una botana comercial utilizada como control. Se observó un incremento significativo ($p<0.05$) en la cantidad de proteína en la botana comparada con el control. En lo referente al contenido de lípidos existe una reducción considerada en contraste con el control. La humedad de la botana incremento significativamente, así como la fibra, sin embargo los carbohidratos no presentaron diferencias significativas.

Tabla 1. Análisis fisicoquímico del producto terminado y control

Formulación	**Proteína (g)**	**Lípidos (g)**	**Humedad (g)**	**Carbohidratos (g)**	**Cenizas (g)**	**Fibra (g)**	**Contenido Energético (kcal)**
Botana 75/25	12.25±0.1	6.78±0.2	3.12±0.2	61.89±0.1	2.14±0.3	10.49±0.4	335.7
Control	7.69±0.2	22.28±0.3	1.15±0.4	57.69±0.4	3.14±0.1	7.48±0.5	462.04

Cada valor representan el promedio de tres repeticiones y desviación estándar.
µN x 6.25 para harina de amaranto y avena.

ᶜɘ Carbohidratos por diferencia de los demás ingredientes.
Las formulaciones con una $p< 0.05$, determinada por la prueba de t de student.

La Figura 1 presenta las isoterma de adsorción de la botana desarrollada y el control a 30°C y se observa que a todas las actividades de agua evaluadas la botana desarrollada presentó un contenido de humedad en el equilibrio mayor que el control. Los datos experimentales fueron ajustados al modelo de

GAB y se estimaron los valores de agua de monocapa (M) y de las constantes del modelo C y k (Tabla 2). Los datos experimentales presentaron un buen ajuste al modelo ya que para ambas botanas se obtuvieron valores de $R^2 > 0.94$

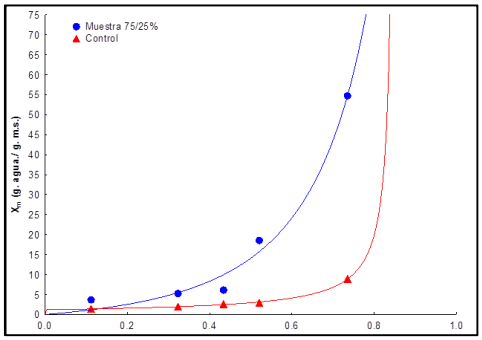


Figura 1. Isoterma de adsorción de la botana 75-25% y el control a 30°C.

Tabla 2. Constantes ajustadas al modelo de GAB para la formulación 75-25% amaranto-avena y control.

Muestra	C	K	M	R
Botana 75-25%	10.199	1.134	2.610	0.976
Control	10.554	1.156689	1.207298	0.999

En lo referente al análisis sensorial la botana elaborada tuvo mayor aceptación con respecto al control, en un panel de consumidores conformado por un 79% de Hombres y 21% de mujeres, con una edad promedio de 20 años.

DISCUSIÓN

Comparando botanas elaboradas a base de maíz y papas fritas que contienen en promedio un 4% de proteínas, la botana desarrollada para este estudio presentó un incremento considerable el cual fue 12.25 g/ 100 g de masa seca. Mientras que para los el contenido de carbohidratos es similar a otros snacks [9]. En la botana elaborada se presentó un incremento en la capacidad de hidratación de agua asociado a los componentes hidrófilos de los aminoácidos (serina, treonina, tirosina, aspargina, glutamina y cisteina) contenidos en la proteína del amaranto [9] y los carbohidratos contenidos en las harinas de amaranto y avena, los cuales ayudan a tener una mayor capacidad de retención de agua. Este efecto se hace evidente al evaluar las isotermas de adsorción, donde se puede apreciar que la botana desarrollada presentó mayores contenidos de humedad en el equilibrio en comparación con el control. Además el contenido de agua de monocapa también fue mayor en la botana, esto se asocia con la presencia de un mayor número de sitios hidrofílicos. De acuerdo a la clasificación realizada por Van der Waals, las isotermas obtenidas corresponden al tipo III, que se caracterizan por contener compuestos altamente solubles como los azucares. En lo que respecta al análisis sensorial realizado, se obtuvo que en la percepción general de los jueces consumidores entre los atributos más apreciados fueron el sabor y la textura evaluada como la fracturabilidad la cual consiste en la sensación que se genera al momento

de dar el primer masticado al producto. Bajo este contexto los consumidores tuvieron una preferencia significativa por la botana desarrollada en comparación con el control.

CONCLUSIÓN

En lo general se puede concluir que la botana desarrollada con harinas de amaranto-avena, incremento su valor nutritivo debido principalmente a la harina de amaranto, ya que aumento el contenido de proteína hasta 59.29% con respecto al control, y disminuyó el contenido de lípidos significativamente ($p<0.05$), por consiguiente se logró una disminución en el valor del aporte calórico, logrando con esto una opción más nutritiva y aceptable para la población mexicana que gusta de este tipo de alimentos en su dieta.

REFERENCIAS

[1] Fernández-Michel, S.G1, 2., Alanís-Guzmán, M. G. 1, Ramos-Clamont, M. G3.,García-Diaz C.L. (2012). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición México.

[2] Boothroyd A. 2014, Innova Market Insights, top ten food trends for 2015.

[3] Simone Mendonca, Paulo H. Saldiva, Robison J. Cruz, Jose A.G. Areas (2009) Amaranth protein presents colesterol-lowering effect. Food Chemistry. 116 738-742.

[4] Palombini, V.S.; Claus, T.; Maruyama, A. S.; Gohara, K.A.; Pereira, S. H.A.; Souza, E. N.; Visentainer, V.J.; Marques, G. T.S.; Matsushita, M.; 2013. Evaluation of nutritional Brasil new amaranth and quinoa cultivars. Food Science and Technology. Campinas, Brasil. 33(2): 339-344.

[5] Wood, P.J. (2007). Cereal β-glucans in diet and health. Journal of Cereal Science, 46, 230-238.

[8]De Moura, A.F.; Mascarenhas, P.J.; Oliveira, D.S.D.; Da Rosa, Z.E.; Da Silveira, M.A.; Helbig, E.; Guerra, D.A.R.; 2011 Effects of oxidative treatment on the physicochemical, rheological and funtional properties of oat β-glucan. Food Chemistry 128, 982-987.

[6] Chiung-Huei, P.; Hong-Chou, C.; Mon-Yuan, Y.; Chien-Ning, H.; Shing-Jung, Wang.; Chau-Jong, Wang. 2012. Oat attenuate non-alcoholic fatty liver and obesity via inhibiting lipogenesis in high fat-fed rat. Journal of functional foods5, 53-61. Taiwan.

[7]Labuza, T.P. Kaanane A., y Chen J.Y. (1985). Effect of temperatura on the moisture sorption isotherm and wáter activity shift of two dehydrated foods. J. Food Sci. 50: 385-391.

[8] Romero, M.M.I.; Coello, O. K. Formulación y desarrollo de un producto para niños en edad escolar a partir de los subproductos industriales de soya y maíz. Facultad de Ingeniería en ciencias de la Producción. Ecuador.

[9] Palombini, V.S.; Claus, T.; Maruyama, A. S.; Gohara, K.A.; Pereira, S. H.A.; Souza, E. N.; Visentainer, V.J.; Marques, G. T.S.; Matsushita, M.; 2013. Evaluation of nutritional Brasil. New amaranth and quinoa cultivars. Food Science and Technology. Campinas, 33(2): 339-344, Brasil.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

MEASUREMENT OF THE LIPASE ACTIVITY AND TOTAL ANTIOXIDANT CAPACITY IN THE SHELF LIFE OF A FUNCTIONAL EMERGENT FOOD

(Medición de la actividad de la lipasa y capacidad antioxidante total en la vida de anaquel de un alimento funcional emergente)

Javier Villanueva Sánchez[a*+], Guillermina González Rosendo[a], Rubén Puga Díaz[a], Jesús Gutiérrez Trujillo[a], Adrian Guillermo Quintero Gutiérrez[a]

[a] Instituto Politécnico Nacional. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Departamento de Nutrición y Alimentos Funcionales. Carr. Yautepec-Jojutla, Km 6. Calle CEPROBI, No. 8. Colonia San Isidro C.P. 62731. Apartado Postal 24. Yautepec, Morelos.Tel. 735-3942020 Ext. 82525. Tel/Fax: (735)394-1896.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: jvillanuevas@ipn.mx, javier.villanuevas@gmail.com

Área del Conocimiento: Q. Alimentos.

ABSTRACT
Lipase activity is utilized as food quality indicator in the industrial process of cereals. Assays such as trolox-equivalent antioxidant capacity, are utilized as surrogate markers for food quality and for monitoring food-related changes in human plasma in dietary intervention studies. Photochemiluminiscence is a combination of the photochemical generation of free radicals with detection of the light emission during the reaction. This study was realized to determinate the lipase activity by spectrophotometry, and total antioxidant capacity by photochemiluminescence, during the shelf life of stabilized bran rice from Morelos. Samples of rice bran were stabilized by moist heat and stored during 15, 30 and 45 days. Hidrophilic and lipofilic extracts were obtained, and then lipase activity and total antioxidant capacity were measured. Lipase activity was determinate using spectrophotometer at 715 nm (SHIMADZU^R, UV-160A, Japan). The measurements of total antioxidant capacity were performed using Kit reagents and PHOTOCHEM^R equipment (Analytik-Jena, Germany). No significant changes were observed in lipase activity across the study (Control 520.8 ± 58.1 ug; day 15 530.6 ± 113.8 ug; day 30 542.4 ± 90.6 ug, and day 45 553.6 ± 67.4 ug, test ANOVA F=2.859, p=0.168), in total, Lipase activity was raised to 6% after 45 days. In other hand, total antioxidant capacity of rice bran diminished significantly from 19.6 ± 0.62 µmol/g E-Trolox to 13.6 ± 0.13 µmol/g E-Trolox along 45 days in shelf (40%), test ANOVA F=7.026, p=0.028. Spectrophotometric and photochemiluminiscence methods demonstrated were efficacy to evaluate the shelf life of rice bran. Photochemiluminescence can be extended to probe changes of the interventions with functional foods.

Keywords: Lipase Activity; Stabilization; Photochemiluminescence; Total Antioxidant Capacity; Functional Food; Rice Bran.

RESUMEN
La actividad de lipasa se utiliza como indicador de la calidad de los alimentos en el proceso industrial de cereales. Los ensayos tales como la capacidad antioxidante en equivalentes de Trolox, se utilizan como marcadores de calidad de los alimentos y para el seguimiento de los cambios relacionados con los

alimentos en el plasma humano en estudios de intervención dietética. La fotoquimioluminiscencia es una combinación de la generación fotoquímica de radicales libres con la detección de emisión de luz durante la reacción. Este estudio se realizó para determinar la actividad de lipasa por espectrofotometría, y la capacidad antioxidante total por fotoquimioluminiscencia, durante la vida de anaquel de salvado de arroz estabilizado de Morelos. Las muestras de salvado de arroz fueron estabilizados por calor húmedo y se almacenaron durante 15, 30 y 45 días. Se obtuvieron extractos hidrófilicos y lipofílicos, enseguida se midieron la actividad de la lipasa y la capacidad antioxidante total. La actividad de la lipasa fue determinada utilizando espectrofotómetro a 715 nm (SHIMADZU^{R}, UV-160A, Japón). Las mediciones de la capacidad antioxidante total se realizaron utilizando los reactivos del kit y equipo PHOTOCHEM^{R} (Analytik-Jena, Alemania). No se observaron cambios significativos en la actividad de la lipasa en todo el estudio (Control de 520,8 ± 58,1 Ug; día 15 530,6 ± 113,8 Ug; día 30 542,4 ± 90,6 Ug, y el día 45 553,6 ± 67,4 Ug, prueba de ANOVA F = 2,859, p = 0,168), en total, la actividad de la lipasa aumentó a 6% después de 45 días. Por otro lado, la capacidad antioxidante total del salvado de arroz disminuyó significativamente de 19,6 ± 0,62 mmol/g E-Trolox a 13,6 ± 0,13 mmol/g E-Trolox a lo largo de 45 días de almacenamiento (40%), ANOVA, F = 7,026, p = 0.028. Los métodos espectrofotométrico y fotoquimioluminiscencia mostraron eficacia para evaluar la vida útil de salvado de arroz. La fotoquimioluminiscencia se puede extender para probar los cambios de las intervenciones con alimentos funcionales.

Palabras Clave: Actividad lipasa; Estabilización; Fotoquimioluminiscencia; Capacidad antioxidante total; Alimento funcional; Salvado de arroz.

INTRODUCCIÓN

El salvado de arroz (SA) es un subproducto obtenido del proceso de pulido o blanqueado del arroz, se constituye principalmente por la almendra harinosa, la capa de aleurona y el germen. Representa alrededor del 8% del peso del grano y tiene una composición que le confiere propiedades funcionales que pueden ser aprovechadas: Proteínas 11.5 a 17.2%, grasa 12.8 a 29.6%, fibra 6.2 a 31.5% (1.9 a 2.4% de fibra dietética soluble) y cenizas 8.0 a 17.7%; dependiendo de la variedad y las condiciones de procesamiento (limpieza, descascarillado, pulido, etc.). El SA es una valiosa fuente potencial de antioxidantes naturales tales como tocoferoles, tocotrienoles y orizanoles, los cuales son capaces de reducir el colesterol plasmático [1].

Históricamente el SA se ha utilizado de forma no estabilizada como un ingrediente de alimentación animal. Su uso para el consumo humano se limitó debido a la rápida evolución de la oxidación, y a la actividad microbiana, generalmente asociada con SA crudo [2]. Cuando las capas del SA son removidas del endospermo durante el pulimento del grano, los lípidos en el SA entran en contacto con enzimas reactivas como las lipasas, las cuales están presentes endógenamente en el SA, causando hidrólisis, y la liberación de ácidos grasos y glicerol, provocando la rancidez hidrolítica que contribuye a una baja calidad sensorial, especialmente el sabor y el aroma, y al incremento de su acidez [3].

Existen diferentes métodos para evitar la oxidación, principalmente la aplicación de calor húmedo y calor seco, que son técnicas que han reportado una eficiencia considerable en la estabilización, logrando así inactivar la enzima lipasa [4]. De este modo, la valoración de la actividad de la lipasa (AL) se utiliza como indicador de la calidad en el proceso industrial del arroz.

Por otro lado, los métodos que evalúan la capacidad antioxidante total (CAT) tienen como principio el poder comprobar un daño oxidativo a causa de un agente oxidante, que se demuestra inhibiendo o reduciendo el sustrato oxidable en presencia de un antioxidante; se utiliza como marcador de calidad de los alimentos y para el seguimiento de los cambios relacionados con los alimentos en el plasma humano, en estudios de intervención dietética [5]. La foto quimioluminiscencia (PCL) es una combinación de la generación fotoquímica de los radicales libres con la detección de la emisión de luz durante la reacción [6].

El estudio se realizó para determinar la actividad de la lipasa por espectrofotometría, y la capacidad antioxidante total por fotoquimioluminescencia, durante la vida útil de salvado de arroz estabilizado..

METODOLOGÍA

Se utilizó salvado de arroz café claro (SA), obtenido inmediatamente del primer pulido del grano de arroz integral (Oryza sativa índica) variedad Morelos A-2010, que fue procesado en el Molino San José, ubicado en el municipio de Jojutla, Morelos. Las muestras de salvado de arroz fueron estabilizadas por calor húmedo y se almacenaron durante 15, 30 y 45 días. Se empleó un estabilizador prototipo que combina calor seco con la inmersión en vapor de agua a temperatura constante (80-90^{o}C). En cada tiempo programado, se obtuvieron extractos hidrófilos y lipófilos, y luego se les midió la actividad de la lipasa y la capacidad antioxidante total.

La actividad de la lipasa fue determinada por el método sugerido por Rose (2006) utilizando espectrofotómetro a 715 nm (SHIMADZU^{R}, UV-160A, Japón). Las mediciones de la capacidad antioxidante total se realizaron siguiendo el protocolo del fabricante y utilizando los reactivos del kit y equipo PHOTOCHEM^{R} (Analytik-Jena, Alemania). Se emplearon t de Student y ANOVA para comparar los tratamientos a un nivel de significancia del 5%.

RESULTADOS

En proporción, la actividad de la lipasa aumentó en un 6% después de 45 días.

Tabla 1. Actividad de lipasa (U/g) en muestras de salvado de arroz almacenado durante 45 días.

(U/g)	Almacenamiento (días)				
	0	15	30	45	ANOVA
Promedio	520.794	530.643	542.366*	553.643	F=2.859
Desviación estándar	58.096	113.844	2.323	67.377	p=0.168
Coeficiente de variación%	11.15	21.45	0.42	12.16	

[1]U se define como los micromoles de ácidos grasos liberados por hora, *Valor estimado por interpolación. ANOVA Análisis de Varianza, F valor de la razón de varianzas en los tiempos de almacenamiento, *p* valor de significancia estadística.

La capacidad antioxidante total de salvado de arroz disminuyó significativamente a lo largo de 45 días de estantería (40%).

Tabla 2. CAT en muestras de salvado de arroz almacenado a 4°C durante 45 días.

µmol/g E-Trolox	Almacenamiento (días)					ANOVA
	0	15	30	45	60	
Promedio	19.5831	14.1139	13.8287	13.6123	12.6585	F=7.0258
Desviación estándar	0.6323	0.7279	3.1179	0.1306	0.3272	P=0.0277

ANOVA Análisis de Varianza, F Valor de la razón de varianzas en los tiempos de almacenamiento, *p* valor de significancia estadística.

DISCUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio en el que la AL se incrementó en 6% después de 45 días de almacenamiento son comparables con los resultados de la aplicación de otros métodos de estabilización en el que aplicaron un tratamiento de estabilización por calor óhmico, con el que obtuvieron un aumento de actividad de lipasa de 4.77% después de 75 días de almacenamiento de SA [7]. En salvados extraídos en la avena se reportaron cifras de lipasa residual de hasta 2 % empleando un tratamiento por calor húmedo [8]. Estudios con salvado de trigo sometido a tratamiento con calor húmedo y tratamiento con calor seco, demostraron que la AL se reducía en un 50% [9]. Estos resultados sugieren que el tratamiento que se utilice para el estabilizado de cereales como el SA afecta tanto en su vida útil como en la conservación de propiedades funcionales y la liberación de componentes bioactivos. Tal que, aunque el SA tiene cantidades significativas de ácidos grasos mono insaturadas como oleico, linoleico y palmítico, las cuales son menos susceptibles a la oxidación [10], el proceso enzimático puede afectar a otros compuestos orgánicos presentes que interactúan como componentes bioactivos y antioxidantes [11].

Lozano (2010) menciona que el tiempo de vida útil del SA sin estabilizar es de aproximadamente 6 horas después del proceso de pulido, esto justifica la aplicación de un método de estabilización lo más pronto posible para que el SA tenga mayor calidad [12]. Algunas de las ventajas del método por calor húmedo son; que los tratamientos no significan grandes costos al tiempo que se logra mantener la mayor parte de sus cualidades funcionales durante un tiempo considerable.

Los resultados obtenidos en la valoración de la CAT, contrastaron con lo reportado por Vargas y Aguirre (2013), el cual menciona que es posible conservar mayor CAT con métodos de estabilización por calor húmedo con un tiempo de exposición de 2-3 min, ya que al prolongar el tiempo, la CAT se ve afectada [13]. Dado que la CAT disminuyó durante todo el experimento, la reducción inicial del 30% en los primeros 16 días, sugiere investigación oportuna y control de posibles factores concomitantes al proceso oxidativo.

CONCLUSIONES

Los métodos de espectrofotometría para medir la actividad de lipasa y la foto quimioluminiscencia para determinar la capacidad antioxidante total, demostraron ser eficaces para evaluar la vida útil de salvado de arroz. Los resultados sugieren mayor conservación de las propiedades nutritivas del SA y su

elegibilidad para estudiar su efecto en la salud y promoverlo en el futuro como alimento funcional, metas que requieren estudios de mayor especificidad. La foto quimioluminiscencia puede extenderse para probar los cambios derivados de las intervenciones con alimentos funcionales.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Secretaría de Investigación y Posgrado del Instituto Politécnico Nacional las facilidades para su realización.

REFERENCIAS

[1] Pacheco-Delahaye E., Peña J. (2006). "Efecto del salvado de arroz sobre parámetros químicos, físicos y sensoriales de arepas precocidas y congeladas". Revista de la Facultad de Agronomía. 23, 2:234-245.

[2] Ramezanzadeh, M. F., Rao, M. R., Windhauser, M., Prinyawiwatkul, W., Tulley, R., & Marshall, E. W. (1999). "Prevention of Hydrolytic Rancidity in Rice Bran during Storage". Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47,8:2997–3000.

[3] Kim S. M., Chung H. J. y Lim S. T. (2014). "Effect of various heat treatments on rancidity and some bioactive compounds of rice bran". Journal of Cereal Science. 60: 243-248.

[4] Silva M. E., Vidal S.M. (2012). Influencia del método de estabilización en el grado de deterioro del salvado de arroz ecuatoriano bajo dos condiciones de almacenamiento, cosecha invierno. (Tesis de grado, Escuela Superior Politécnica, Ecuador): 56-70.

[5] Fernández-Pachón M. S., Villaño D., Troncoso A.M., García-Parrilla M.C. (2006). "Revisión de los métodos de evaluación de la actividad antioxidante in vitro del vino y valoración de sus efectos in vivo". ALAN [revista en la Internet]. 56,2: 110-122.

[6] Zielińska D., Turemko M., Kwiatkowski J., Zieliński H. (2012). "Evaluation of Flavonoid Contents and Antioxidant Capacity of the Aerial Parts of Common and Tartary Buckwheat Plants". Molecules, 17, 9668-9682.

[7] Dhingra, D., Chopra, S., & Rai, D. R. (2012). "Stabilization of Raw Rice Bran using Ohmic Heating". Agric Res. 1, 4:392–398.

[8] Ekstrand, B., Gangby, I., & Akesson, G. (1992). "Lipase activity in oats – distribution, pH dependence, and heat inactivation. Cereal Chemistry". 69, 4:379–381.

[9] Sudha , M. L., Ramasarma, P. R., & Venkateswara, R. G. (2011). "Wheat bran stabilization and its use in the preparation of high-fiber pasta". Food science and technology. doi:10.1177/1082013210368463.

[10] Mazza, G. (1998). Funtional Foods: Biochemical and Processing Aspects. Technomic Publishing Company. CRC Press. 480 Pages ISBN 9781566764872.

[11] Loypimai, P., Moonggarm , A., & Chottanom, P. (2009). "Effects of Ohmic Heating on Lipase Activity, Bioactive Compounds and Antioxidant Activity of Rice Bran". Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 3, 4: 3642-3652.

[12] Lozano. J.T. (2010). Estabilización y usos potenciales del salvado de arroz colombiano para su aprovechamiento industrial sin afectar su calidad nutricional y funcional. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, ANDI-INDUARROZ, Universidad de Bogotá. Disponible en Biblioteca Digital MADR: http://207.239.251.110:8080/jspui/.

[13] Vargas, M. E., & Aguirre, M. (2013). "Salvado de arroz: procesos de estabilización y usos potenciales industriales". Mutis, 3, 2: 13-20.

EVALUATION OF THERMAL STABILITY OF NECTARS ADDED WITH MODIFIED EXTRACTS OBTAINED FROM THE ADDITION OF ORGANIC ACIDS TO ANTHOCYANINS OF THE CAPULIN

(Evaluación de la estabilidad térmica de néctares adicionados con extractos modificados obtenidos de la adición de ácidos orgánicos a antocianinas del capulín)

Elías Martínez-Torres[a]*, Araceli Castañeda-Ovando[a], Elizabeth Contreras-López[a], Javier Añorve-Morga[a], Luis Guillermo González-Olivares[a], Judith Jaimez-Ordaz[a].

[a] Área Académica de Química, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Carr. Pachuca-Tulancingo, km 4.5, C.P. 42184, Mineral de la Reforma, Hgo., México.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: eliux_20@hotmail.com

Área de conocimiento: Q. Alimentos.

ABSTRACT
Capulin is a fruit that has little technological application, in spite of contains bioactive compounds, as anthocyanins (natural pigments), associated with beneficial effects on health, by their antioxidant activity (AA); however, they are unstable, and their use in the food industry is limited. For this reason, the aim of this study was to obtain modified extracts from the interaction of anthocyanins with different organic acids (*p*-coumaric, caffeic and ferulic) to assess their stability in food products. The modified anthocyanic extracts (MAE) were obtained by change the organic acid (ferulic, caffeic, and *p*-coumaric), taking 10 MAE. In each MAE was measured the degradation and browning index (DBI) and AA by spectrophotometric methods. The more stable MAE was added 5% to pomegranate nectars. Prepared nectars were stored at 20, 40, 60 and 80°C; to which were measured DBI, AA, and L, a, and b parameters of color (by digital images processing). The monomeric anthocyanins content of capulin was 298.34 mg/100 g of freeze-dried capulin skin; this value let us calculate the quantity of organic acid added in the obtaining of MAE. The MAE showed better values of DBI and AA than anthocyanin extract of capulin; and one of them was selected to de added to pomegranate nectar. According with the results, the pomegranate nectar with MAE (5%) had higher thermal stability than control nectar (pomegranate nectar); because exhibited best values of DBI, AA and color parameters (L, a, b). Control nectar had a considerable loss of sensory (color) and functional attributes. In conclusion, the interaction between organic acids and anthocyanins allows obtaining modified extracts that can be used as food additive, because they have greater stability.

Keywords: Capulin; anthocyanins; modified extracts; organic acids, color.

RESUMEN
El capulín es una fruta que tiene poca aplicación tecnológica, a pesar de que contiene compuestos bioactivos, como las antocianinas (pigmentos naturales), asociados con los efectos beneficiosos sobre la salud por su actividad antioxidante (AA); sin embargo, ellos son inestables y su uso en la industria alimentaria es limitada. Por esta razón, el objetivo de este estudio fue obtener extractos modificados de la interacción de las antocianinas con diferentes ácidos orgánicos (p-cumárico, cafeico y ferúlico) para evaluar su estabilidad en productos alimenticios. Los extractos modificados de antocianinas (EMA) se

obtuvieron por el cambio del ácido orgánico (ferúlico, cafeico, y p-cumárico), teniendo 10 EMA. En cada EMA se midieron los índices de degradación y oscurecimiento (IDO) y AA por métodos espectrofotométricos. El EMA más estable se añadió al 5% a néctares de granada. Los néctares preparados se almacenaron a 20, 40, 60 y 80 ° C; a los cuales se midieron IDO, AA, y L, a, b parámetros de color (mediante el procesamiento de imágenes digitales). El contenido de antocianinas monoméricas del capulín fue de 298,34 mg / 100 g de piel de capulín liofilizado; este valor nos permitió calcular la cantidad de ácido orgánico añadido en la obtención del EMA. El EMA mostró mejores valores de IDO y AA que el extracto de antocianinas de capulín; y uno de ellos se seleccionó para ser añadido al néctar de granada. De acuerdo con los resultados, el néctar de granada con EMA (5%) tuvo mayor estabilidad térmica que el néctar de control (el néctar de granada); debido a mejores valores exhibidos de IDO, AA y los parámetros de color (L, a, b). El néctar control tuvo una pérdida sensorial (color) considerable y de atributos funcionales. En conclusión, la interacción entre ácidos orgánicos y antocianinas permite obtener extractos modificados que se pueden utilizar como aditivo alimentario, debido a que presentan una mayor estabilidad.

Palabras Clave: Capulín; antocianinas; extractos modificados; ácidos orgánicos, color.

INTRODUCCIÓN

Las frutas y hortalizas contienen compuestos orgánicos; algunos de ellos fungen como nutrientes y otros aportan algunas propiedades funcionales. Entre estos últimos están las antocianinas, que imparten una gama de colores (incluyendo el rojo brillante) y a su vez actúan como antioxidantes [1]. El capulín o cereza negra americana (*Prunus serotina*) es un fruto que está ampliamente distribuido en México y se utiliza en la medicina tradicional mexicana, se consume fresco, seco o preparado en mermeladas artesanales [2]. Por otro lado, el uso de extractos de antocianinas en el procesamiento de alimentos está condicionado por la inestabilidad de las moléculas cuando se someten a estrés; entre los factores que las afectan destacan el pH, temperatura, presencia de oxígeno, especies químicas inorgánicas (NO_2^-, SO_3^{2-}, H_2O_2 y O_2), entre otros [3,4]. Por ello, algunos productos alimenticios (jugos y néctares), al ser procesados, incluyen la adición de colorantes sintéticos para mantener sus propiedades organolépticas; sin embargo, estos compuestos pueden afectar la salud de los infantes y ocasionar hiperactividad [5,6]. En la búsqueda de alternativas para estabilizar las antocianinas, se ha encontrado que en el añejamiento del vino tinto, la presencia de ácidos orgánicos puede mantener el color, aun cuando las moléculas se sometan a algún estrés [7]. Sin embargo, no se han reportado estudios acerca de reacciones aceleradas entre extractos antociánicos y ácidos orgánicos. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue obtener extractos modificados a partir de la interacción de antocianinas con diferentes ácidos orgánicos (*p*-cumárico, cafeico y ferúlico) para evaluar su estabilidad en productos alimenticios. Los resultados obtenidos sirvieron de base para dar alternativas de aprovechamiento del extracto modificado de capulín como aditivo en néctares.

METODOLOGÍA

Extracción de antocianinas. 50 g de piel de capulín liofilizado (en un Freeze dry system/ freezone 4.5) se colocaron en 500 mL de solución etanólica de HCl al 0.2% (v/v) y se maceraron por 24 h en oscuridad; después se filtró y aforó a 500 mL [8]. **Determinación de antocianinas monoméricas.** Método de pH diferencial [3]. Se tomó el extracto de antocianinas (1:10), se tomaron dos réplicas de 1mL, una con solución amortiguadora de acetatos y otra con solución a pH=1 de HCl 0.1M, aforando a 10mL; se midieron las absorbancias a 515 y 700 nm.

Reacciones de condensación. Los experimentos se realizaron bajo las condiciones detalladas en la Tabla 1. Determinación de índices de degradación y oscurecimiento (IDO). Se utilizó una solución de sulfito ácido (HSO3-) 0.6M [9]; se midieron las absorbancias a 420, 515 y 700 nm a los experimentos de las reacciones de condensación (extractos modificados de antocianinas de capulín).

Tabla 1. Condiciones de trabajo para las reacciones de condensación.

Exp.	Ácido	[Ácido]/[Ant]	T (°C)	t_{Rx} (h)	pH	P° O_2	[Ácido ascórbico] mg/L
1	*p*-cumárico	150	60	5	1	---	---
2	Cafeico	250	60	5	1	0	---
3	Ferúlico	150	40	1	3	---	125
4	*p*-cumárico	150	60	5	1	0	---
5	*p*-cumárico	150	60	5	1	0	125
6	Cafeico	250	60	5	1	0	125
7	Ferúlico	150	40	1	3	0	125
8	Cafeico	150	60	5	1	0	125
9	Ferúlico	150	40	5	1	0	125
10	Ferúlico	150	60	5	1	0	125

Determinación de la actividad antioxidante (AA) [10]. Se utilizó DPPH 0.1 mM y una solución estándar de Trolox 1mM [11]. Se tomó una alícuota (1:10) de extracto antociánico y de cada experimento por separado, posteriormente 100 µL se adicionaron 2.9 mL del reactivo de DPPH, reacción por 50 min en oscuridad, se midieron las absorbancias a 515 nm. Se midió la AA a los extractos modificados de antocianinas de capulín.

Efecto de extractos modificados adicionados a néctar de granada. Preparación de néctar de granada. Se realizó tomando un nivel mínimo de 12°Brix [12]. Efecto de la temperatura. A los EMA de capulín con mayor % de color polimérico y AA (7 y 10) se adicionaron a 75 mL de néctar de granada en una concentración de 5% (v/v), se realizaron mediciones aleatorias (días 1, 4, 8, 11, 15, 18 y 21), determinando IDO, AA y color de cada una de las muestras.

Determinación de color. Se realizó mediante el procesamiento de imágenes digitales con el software Photoshop® CS3 Extended [13] para obtener los valores CIE-L*a*b*, condiciones de trabajo temperatura de color 6500°K (D65), perfil sRGB iec61966-2.1, captación de imágenes (cámara digital marca Canon (Rebel), modelo T2i/ EOS 550D), iluminación/observación fue de 45º/0º.

RESULTADOS

Contenido de antocianinas monoméricas. Se obtuvo un contenido de 149.17 ±0.96 mg/L (298.34 mg/100 g de piel de capulín liofilizado). Reacciones de condensación. En la Figura 1 se muestran el extracto antociánico y los EMA de capulín obtenidos.



Figura 1. Extracto antociánico y extractos modificados de antocianinas de capulín.

Determinación de índices de degradación y oscurecimiento de los extractos modificados (IDO). En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos en la determinación IDO. Actividad antioxidante de extractos modificados. Los resultados de AA se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Índices de degradación y oscurecimiento y actividad antioxidante de extracto antociánico (control y modificado) de capulín.

Extracto	Índices de degradación y oscurecimiento				Actividad antioxidante mg Trolox/100 mL de extracto
	DC	CP	% CP	IO	
Antocianinas	56.40±0.00	12.50±0.50	22.10±0.0	11.40±0.52	231.32±0.77
1	45.20±0.56	17.63±0.42	39.02±1.40	15.93±0.37	232.35±0.35
2	40.50±0.14	15.15±0.77	37.41±0.13	13.18±0.73	236.65±0.06
3	30.80±0.84	9.11±0.11	29.59±1.10	8.36±0.51	248.42±1.38
4	42.90±1.27	15.70±0.32	36.60±1.90	13.90±0.14	238.36±1.90
5	41.80±1.13	14.33±0.47	34.30±0.20	12.96±0.32	232.54±0.62
6	51.60±0.0	15.06±0.28	29.20±0.55	13.23±0.23	238.30±6.70
7	26.10±0.70	12.50±0.40	47.93±2.90	11.06±0.32	252.13±0.14
8	45.10±2.12	15.53±0.75	34.44±0.05	14.06±0.56	245.39±5.50
9	52.10±0.70	13.23±0.32	25.40±0.30	12.10±0.32	219.45±0.34
10	37.20±2.20	14.73±0.37	39.61±1.01	12.50±0.30	243.53±0.70

DC: densidad de color, CP: color polimérico; %CP: porcentaje de color polimérico; IO: índice de oscurecimiento, AA: actividad antioxidante

Índices de degradación y oscurecimiento y color. En la Tabla 3 se presentan los resultados obtenidos a 20°C del IO y color de los néctares de granada adicionados con los extractos modificados (7 y 10). En la Tabla 4 se muestran las imágenes digitalizadas de los néctares de granada sometidos a diferentes temperaturas (20, 40, 60 y 80°C).

Actividad antioxidante. En la Figura 2 se muestran los cambios en la AA de los néctares analizados.

DISCUSIONES

En la determinación de antocianinas monoméricas se utilizó la piel de capulín liofilizada, debido a que las antocianinas en muestras secas pueden exhibir mayor estabilidad [3]. El resultado en este estudio (298.34 mg/100 g de piel de capulín liofilizado) difiere con el reportado por Ordaz [14] de 272 mg/100 g de la piel de capulín, la diferencia puede atribuirse a que utilizó acetona como solución extractante.

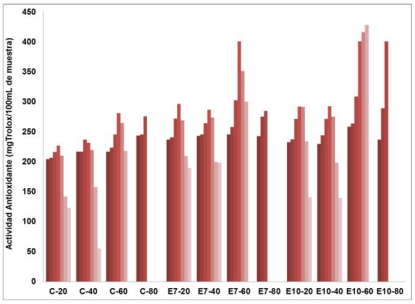


Figura 2. Cambios en la AA de los néctares analizados. Codificación: C, control; E7, néctar adicionado con el extracto modificado 7; E10, néctar adicionado con extracto modificado 10. La numeración 20,40, 60 y 80 se refiere a la temperatura (°C) de exposición de los néctares. 1 día; 4 días; 8 días; 11 días; 15 días; 18 días y 21 días.

Para la selección de los EMA de capulín (Figura 1) se consideró el índice de oscurecimiento (IO) y % de color polimérico (%CP). El %CP es el parámetro que está ligado con la estabilidad del color de los extractos, ya que valores mayores de éste, indican que el extracto es más resistente a la presencia de especies nucleofílicas (como el sulfito ácido), y otros componentes nucleófilos que contienen los alimentos, tales como el propio sulfito, nitrito, peróxidos, entre otros [15].

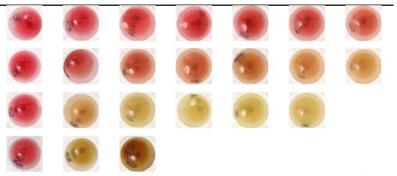
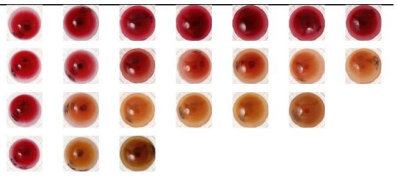
Tabla 3. Parámetros de color en néctar de granada adicionado con extractos modificados de capulín a 20°C.

Parámetro		Muestras	Dia						
			1	4	8	11	15	18	21
Índice de oscurecimiento		C-20	1.2±0.0	0.9±0.0	0.6±0.0	0.5±0.0	0.6±0.0	0.6±0.0	0.8±0.0
		E7-20	1.0±0.0	0.8±0.0	0.9±0.0	0.8±0.0	0.8±0.0	0.8±0.0	1.1±0.0
		E10-20	0.8±0.0	0.6±0.0	0.9±0.0	0.8±0.0	0.9±0.0	1.0±0.0	1.3±0.0
Coordenadas rectangulares	L*	C-20	48	46	45	45	40	45	51
		E7-20	33	30	29	28	23	27	28
		E10-20	31	28	28	24	18	19	25
	a*	C-20	59	53	52	52	50	48	43
		E7-20	55	52	49	48	44	48	47
		E10-20	52	49	48	42	37	40	45
	b*	C-20	33	29	30	34	35	44	33
		E7-20	42	39	37	36	32	34	35
		E10-20	39	37	33	29	25	28	30
Color promedio		C-20							
		E7-20							
		E10-20							
$Croma_{ab}$		C-20	67.60	60.42	60	62.13	61	65.12	54.20
		E7-20	69.20	65	61.40	60	54.41	58.80	58.60
		E10-20	65	61.40	58.25	51	44.65	48.83	54.10
$Tono_{ab}$ (h°)		C-20	29.22	28.67	29.99	33.18	35	42.51	37.50
		E7-20	37.36	36.87	37.10	36.90	36.03	35.31	36.70
		E10-20	36.87	37.10	34.51	34.62	34	35	33.70

Tomando dichos parámetros, se seleccionaron los experimentos 7 y 10 por presentar mayor %CP que el extracto antociánico, lo que indica que pueden llegar a ser más estables, por lo menos a cambios de color. El IO es un parámetro de degradación relacionado con la formación de especies poliméricas derivadas de los azúcares, lo que conlleva a una coloración ámbar. Por lo tanto, a mayores valores, indica que el extracto es más propenso a reacciones de oscurecimiento [9]. Los experimentos

seleccionados (7 y 10) presentan mayores IO, muy cercanos al extracto antociánico, pero tienen mayor %CP que los hace más viables para estabilizar el color. Por otro lado la AA de los compuestos fenólicos se debe a su capacidad de eliminar los radicales libres, átomos de hidrógeno o donar electrones, o cationes de metales de quelatos [16], por lo que los extractos modificados pueden eliminar el radical DPPH en mayor proporción que las antocianinas monoméricas del capulín. Se puede apreciar que en los resultados hay un incremento en la AA (Figura 2), así como sucedió con %CP (Tabla 2), por lo que pueden relacionarse estos dos valores, los experimentos que muestran mayor %CP (7 y 10) a su vez se incrementó la AA en comparación con el extracto antociánico. También se observó que los experimentos 3 y 8 tienen mayor actividad antioxidante, sin embargo, presentan valores más bajos de %CP.

Tabla 4. Imágenes digitalizadas de los néctares de granada sometidos a diferentes temperaturas (20, 40, 60 y 80°C).

Muestra	T (°C)	Días 1	4	8	11	15	18	21
Control	20							
	40							
	60							
	80							
Adicionada con E7	20							
	40							
	60							
	80							
Adicionada con E10	20							
	40							
	60							
	80							

Se evaluó la estabilidad del color, IDO y AA del néctar de granada (control (C) y adicionado con EMA de capulín (E7 y E10) al 5% v/v) a diferentes temperaturas (20, 40, 60 y 80°C) por un tiempo máximo de 21 días. En el día 21, el E10-20 presentó mayor IO que el E7-20 (Tabla 3); este efecto fue más notable conforme aumentó la temperatura, posiblemente por la formación de compuestos polifenólicos insolubles de color marrón [4]. Por lo que se midieron los valores de color mediante el procesamiento de imágenes digitales (Tabla 3), donde se presentan los valores de color CIE- L*a*b* (L*= luminosidad de 0 negro a 100 blanco, +a*= rojo, -a*=verde, +b*=amarillo, -b*=azul) CIE- L*C*h° (C=croma pureza o saturación del color y h°= tono de 0 a 360º; 0° indica el tono rojo, 90° corresponde al amarillo, 180° verde y 270° azul) [3], del néctar adicionado con extracto modificado de antocianinas a 20°C.

Las muestras control tuvieron una degradación mayor de color que los néctares adicionados con los extractos modificados de antocianinas de capulín. Las muestras que presentaban una disminución de L*

había un aumento en el IO. En la muestra control se observó una disminución del color rojo, aumento de L* y perdiendo su tonalidad roja.

A 40°C el color de los néctares mostró cambios visuales; estos se pueden observar en las imágenes digitalizadas de los néctares en la Tabla 4. Es notable la disminución de la tonalidad roja característica, formándose colores marrones al igual en las muestras a 60°C que se mantuvieron los extractos sólo hasta los 18 días debido a que el cambio de color fue muy pronunciado, lo cual indica que ya hubo degradación de antocianinas; este comportamiento fue mayor en el néctar control. Las muestras tratadas a 80°C se midieron hasta el día 8, porque presentaron una coloración café-marrón, degradándose los pigmentos de las muestras, esto pudo deberse a una reacción de oscurecimiento no enzimático debido al tratamiento térmico [17]. Las mediciones de los parámetros de color predicen que tan estables son los extractos modificados de antocianinas de capulín en el néctar a diferentes temperaturas, presentando mayor propiedad en color el E7 por presentar mayor valor de a* (rojo) y pureza (Cromaab) en comparación del E10 y el control.

Las muestras adicionadas con extracto modificado de capulín (E7 y E10) presentaron menos pérdida de la AA, comparadas con los controles (néctar de granada) (Figura 2), esto puede ser debido al efecto que tiene el ácido ferúlico en esta propiedad. Los néctares adicionados tienen desde el inicio (día 1) mayor AA que los controles. Los néctares adicionados con EMA de capulín (E7 y E10), a 60 y 80°C, aparentemente presentaron mayor AA; sin embargo, mostraban una coloración marrón, que se puede deber a las reacciones de oscurecimiento. Las muestras adicionadas con E7 mostraron mayor AA, sobre todo a 20 y 40°C; además tuvieron menor pérdida de color durante el tiempo de experimentación. Con los resultados obtenidos del análisis de IDO, color y AA, los EMA de capulín pueden ser una alternativa para utilizarse como aditivos alimentarios, aportando estabilidad de color y a la vez un incremento en la actividad antioxidante a un alimento (néctar de granada).

CONCLUSIONES

Los extractos modificados de antocianinas de capulín que presentaron mayor porcentaje de color polimérico y actividad antioxidante se obtuvieron al adicionar el ácido ferúlico. Se evaluaron dos extractos modificados de antocianinas de capulín (E7 y E10) en néctar de granada a diferentes temperaturas. El E7 presentó mejores resultados en las determinaciones de índices de degradación y oscurecimiento, actividad antioxidante y parámetros de color. Los extractos modificados de antocianinas de capulín presentan ventajas para su utilización como aditivo alimentario, por aportar el color rojo característico de jugos o néctares de frutos rojos.

REFERENCIAS

[1] Muñoz, O., Schwartz, M., Loyola, E. (2003), "Antocianos, colorantes naturales de aplicación industrial", Revista de fitoterapia, 3 (2):147-154.

[2] Aguerrebere, I., Molina, R., Omah, B., Drover, J. (2011), "Characteristics of Prunus serotina seed oil", Food Chemistry, 124 (3):983–990.

[3] Wrolstad, R., Durst, R., Lee, J. (2005), "Tracking color and pigment changes in anthocyanin products", Trends in Food Science & Technology, 16 (9):423–428.

[4] Tseng, CH., Chang, M., James, S. (2006), "Degradation kinetics of anthocyanin in ethanolic solutions", Journal of Food Processing and Preservation, 30 (5):503–514.

[5] Breakey, J., Reilly, C., Connell, H. (2002). "The Role of Food Additives and Chemicals in Behavioral, Learning, Activity, and Sleep Problems in Children", in Astrid, G. (2008), "Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: Revisión", Acta Biológica Colombiana, 13 (3):27-36.

[6] McCann, D., Barrett, A., Cooper, A., Crumpler, D., Dalen, L., & Grimshaw, K. (2007), "Food Additives and Hyperactive Behaviour in 3-Year-old and 8/9-Year-old Children in the Community: A Randomised, Double-Blinded, Placebo-controlled Trial", The Lancet, 370 (9598):1560-1567.

[7] Freitas, V., Mateus, N., (2011), "Formation of pyranoanthocyanins in red wines: a new and diverse class of anthocyanin derivatives", Analytical and Bioanalytical Chemistry, 401 (5):1463–1473.

[8] Castañeda, O., Ondra, S., Havel, J., Pacheco, L., Galán, V., Contreras, L. (2012), "Identification of Anthocyanins in Red Grape, Plum and Capulin by MALDI-ToF MS", Journal of the Mexican Chemical Society, 56 (4):378-383.

[9] Giusti, M., Wrolstad, R. (2001), "Anthocyanins. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UVVisible Spectroscopy", in Current Protocols in Food Analytical Chemistry (Wrolstad, R., Ed.). New York: John Wiley & Sons, Inc., F1.2.1-F1.2.13.

[10] Williams, B., Cuvelier, M., Berset, C. (1995) "Use of a free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity", Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie, 28 (1):25-30.

[11] Ozgen, M., Scheerens, J., Reese, R., Miller, R. (2010), "Total phenolic, anthocyanin contents and antioxidant capacity of selected elderberry (Sambucus canadensis L.) accessions", in Jiménez, P., Girbés, T. (2012), "Método del radical DPPH. 2,2-difenil –1-picrylhydrazyl. Determinación de la capacidad antioxidante en extractos de manzana, brócoli y alcachofa", recuperado el 12 de marzo de 2013 de: https://alojamientos.uva.es/guia_docente/uploads/2012/470/45808/1/Documento14.pdf

[12] CODEX STAN 247 2005. Norma General del CODEX para zumos (jugos) y néctares de frutas. Recuperado el 20 de noviembre de 2014 de: http://www.codexalimentarius. org/standards/es/

[13] Padrón, P. (2010), "Procesamiento digital de imágenes de frutos de semeruco (Malpighia glabra L.) durante el crecimiento y maduración", Revista Científica Electrónica de Agronomía, 17 (2):1-17.

[14] Ordaz, G., Wesche, E., Wrolstad, R., Rodríguez, S., Argaiz, J. (1999), "Purification and identification of Capulin (Prunus serotina Ehrh) anthocyanins", Food Chemistry, 65 (2):201-206.

[15] Castañeda, O., Zúñiga, A., Contreras, E., Castillo, A., Jaimez, J. (2011), "Aumento de la estabilidad del color de extractos de zarzamora mediante reacciones de condensación", recuperado el 12 de Abril de 2013 de: http://www.uaeh.edu.mx/investigacion/icbi/LI_FisicAlim/Araceli _Ovan/1.pdf

[16] Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2006), "Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses", Food Chemistry, 99 (1):191–203.

[17] Kara, S., Alben, E. (2013), "Thermal degradation kinetics of anthocyanins and visual colourof Urmu mulberry (Morus nigra L.)", Journal of Food Engineering, 116 (2):541–547.

TOTAL PHENOLS CONTENT IN SEEDS AND VEGETATIVE TISSUE OF COMMON BEAN

(Contenido de fenoles totales en semillas y tejidos vegetativos de la planta de frijol)

Marysol Rubio Landa[a*], Sarahi López Mendoza[a], Víctor Meza Carmen[a], Rafael Ortiz Alvarado[b], Josué Altamirano Hernández[a+]

[a] Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Ave. Francisco J. Mujica s/n. Ave Fco. J. Mujica Morelia Michoacán, Edificio B1. Ciudad Universirtaria. C.P. 58030. Morelia, Michoacán.
[b] Facultad de Químico Farmacología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Av. Lázaro Cárdenas # 2707, Col. Chapultepec Norte. C.P. 58260. ;Morelia, Michoacán.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: josueah@hotmail.com

Área del Conocimiento: Q. Alimentos.

ABSTRACT
Several studies have shown that the consumption of beans can prevent chronic degenerative diseases such as diabetes and cancer. However, a high variability on the therapeutic effect can be seen among the reports in the literature, predominating the idea that seeds of darker coat have a better protective effect relative to seeds of clear coat. On the other hand, there are reports on the use of some parts of the plant such as roots and leaves in traditional medicine for the treatment of different diseases. Among the various metabolites that are reported in both seed and plant, it seems that phenolic compounds are the primarily responsible for disease prevention and/or health promotion. Furthermore it has been reported that the content of phenols is higher in geminated seeds compared to ungerminated ones, and found in different concentration depending on the tissue and phenological stage of the plant. Therefore, given the differences in phenolics content both in seeds and different parts of the plant, we propose a comparative study to determine which seeds have the best protective effect and if vegetative tissues may represent an alternative source of metabolites for the treatment of degeneritve diseases. Seed of different color coat were obtained, and from Flor the Junio bean cultivar, samples of root, stem, leaf, flower, pod and germinated seeds were collected in the V0, V3, R6, R8 and R9 phenological stages. A methanolic extraction was performed to obtain the total phenols which were quantified by the Folin-Ciocalteu method. The antioxidant activity was evaluated by the technique of DPPH and antimicrobial activity by susceptibility testing method. The results so far indicate that seeds of pinto and black coat have a higher phenol content. In the plant, the leaves of R8 phenological stage are the tissue with the higher phenol content.

Keywords: Functional food; Phenolics; Chronic degenerative diseases.

THE EFFECT OF THE FEEDING IN THE NUTRITIONAL QUALITY OF THE RAINBOW TROUT RAISED IN CAPTIVITY

(Efecto de la alimentación en la calidad nutricional de la trucha arcoíris criada en cautiverio)

Gómez-Zamora Oscar[a]*, Castañeda-Ovando Araceli[a], Contreras López Elizabeth[a], Añorve-Morga Javier[a], González Olivares Luis Guillermo [a], Jaimez Ordaz Judith[a].

[a] Área Académica de Química, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Carr. Pachuca-Tulancingo, km 4.5, C.P. 42184, Mineral de la Reforma, Hgo., México.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: oscar_gomez_zamora@hotmail.com

Área del Conocimiento: Q. Alimentos.

ABSTRACT
In recent years, in the state of Hidalgo, trout farming activity has presented an important growth due to various factors such as natural resources, utilization of water bodies, and captive breeding in tourist places (such as Huasca de Ocampo). This activity will create jobs, increase production volumes of food in the region and improve the nutritional quality of diets. The rainbow trout is a fish with a high content of protein and fatty acids, it is known that when they are fed with high protein and fat percentages are affected in muscle, increasing the nutritional value of it. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of feeding in rainbow trout by physicochemical characterization and fatty acid composition to know their nutritional quality. To know the percentages of the moisture, ash, fat, protein and fiber for food supplied and meat trout they were determined according to official AOAC techniques. The fatty acid profile was determined by gas chromatography; and finally, through analysis by ICP content of iron, calcium and phosphorus were determined. We found that owing to the food provided to the rainbow trout, its meat contains a high percentage of protein and fatty acids from omega 3, 6 and 9 family, making a food high in protein and rich in fatty acids unsaturated like EPA, DHA and ARA, which are highly beneficial to health.

RESUMEN
En los últimos años, en el estado de Hidalgo, la actividad de la truchicultura ha presentado un importante crecimiento derivado de factores como: recursos naturales, aprovechamiento de cuerpos de agua, y crianza en cautiverio en lugares turísticos (tales como Huasca de Ocampo). Esta actividad permite generar empleos, aumentar los volúmenes de producción de alimentos en la región así como elevar la calidad nutricional de las dietas. La trucha arcoíris es un pez con un alto contenido de proteínas y ácidos grasos, se sabe que cuando son alimentadas con altos porcentajes de proteína y lípidos se ven afectadas en el músculo, incrementando el valor nutricional de éste. Por ello, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la alimentación en trucha arcoíris mediante la caracterización fisicoquímica y composición de ácidos grasos para conocer su calidad nutricional. Para conocer el porcentaje de humedad, cenizas, lípidos, proteínas y fibra para el alimento suministrado y la carne de trucha, se determinaron siguiendo las técnicas oficiales de la AOAC. El perfil de ácidos grasos se determinó por cromatografía de gases; y por último, mediante el análisis por ICP se determinó el

contenido de hierro, calcio y fósforo. Se encontró que gracias al alimento que se les suministra a las truchas arcoíris, su carne contiene un alto porcentaje de proteína y ácidos grasos de la familia omega 3, 6 y 9, haciéndolo un alimento con un alto contenido de proteína y rico en ácidos grasos insaturados como el EPA, ARA y DHA, que son altamente benéficos para la salud.

Palabras Clave: Trucha arcoíris; ácidos grasos; caracterización fisicoquímica; truchicultura.

INTRODUCCIÓN

El pescado es uno de los alimentos más completos por su calidad y cantidad de nutrientes; sin embargo, poco se sabe sobre la calidad nutritiva de los criados en cautiverio [1].

Una de las variedades de peces criadas en cautiverio son las truchas, que debido a su fácil adaptación al cautiverio, su crianza ha sido ampliamente difundida en casi todo el mundo [2]. Aunque se pueden encontrar normalmente en aguas frías y limpias de ríos y lagos, estando distribuidas a lo largo de Norteamérica.

La trucha es uno de los peces que siempre ha estado presente para su crianza en el estado de Hidalgo, esto se debe a que es un pez de crecimiento rápido, de carne suave y de una gran versatilidad [3], hoy en día su explotación comercial es cada vez más importante, por la gran demanda que éste tiene.
En los últimos años se ha observado que en el estado de Hidalgo existe un incremento en el consumo de carne de trucha, ya que su crianza en cautiverio es en lugares turísticos, tales como Huasca de Ocampo; aunado a esto, los consumidores incrementan la ingesta de proteína animal y ácidos grasos esenciales, y así mejoran su calidad nutricional.

Debido a la gran demanda que tiene la trucha arcoíris criada en cautiverio, es necesario saber su calidad nutricional; por ello, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la alimentación en trucha arcoíris mediante la caracterización fisicoquímica y composición de ácidos grasos para conocer su calidad nutricional. Además, se analizó el esqueleto, con el propósito de determinar su posible incorporación en alimento destinado para animales.

METODOLOGÍA

Para el análisis fisicoquímico de la carne se analizaron 21 truchas de tamaño y peso similar. Las muestras fueron obtenidas de un criadero en el municipio Huasca de Ocampo (Se realizaron 2 muestreos).
A las muestras se les realizó un eviscerado en el mismo sitio donde fueron adquiridas para posteriormente trasladarlas al laboratorio en una hielera acondicionada para mantener la temperatura a 4°C.
Ya en el laboratorio fue retirado el esqueleto y la carne fue molida para reducir el tamaño de partícula y así poder realizar el análisis proximal utilizando los métodos descritos por la AOAC [4].

Determinación de humedad

En charolas de aluminio a peso constante se pesaron, por separado, de 4 a 5 g de muestra y se llevaron a peso constante en una estufa de vacío a 70±1ºC y 100 mmHg de presión.

Determinación de cenizas

En crisoles, a peso constante, se colocaron por separado, de 4 a 5 g de muestra y se incineraron en una parrilla de calentamiento, hasta que la muestra ya no desprendiera humo.

Posteriormente, los crisoles se colocaron en una mufla (Fisher Scientific) a 550ºC hasta obtener un color homogéneo de las cenizas y un peso constante del crisol.

Determinación de grasa cruda

Se tomaron las muestras libres de humedad (se utilizaron las obtenidas del análisis de humedad) y cada una de ellas se colocó en cartuchos de celulosa, después se introdujeron en el compartimiento de extracción de un equipo Soxhlet.

Por otro lado, se colocaron matraces balón (uno por cada muestra), previamente puestos a peso constante, se les adicionaron a cada uno 150 mL de éter petróleo y se dispusieron en la parrilla de calentamiento. Después, se procedió a un calentamiento moderado, hasta la extracción total de la grasa (aproximadamente 5 horas), regulando que el reflujo fuera gota a gota y constante.

Una vez completa la extracción, la mayor parte del solvente se recuperó por evaporación a presión reducida y el resto se eliminó colocando el matraz en una estufa a 65 ºC hasta peso constante.

Determinación de proteína cruda

Se utilizó el método Kjeldahl, que consiste en someter la muestra a tres procedimientos: digestión, destilación y valoración (N: 6.25).

Determinación de ácidos grasos

La determinación de la composición de ácidos grasos se realizó mediante cromatografía de gases utilizando la metodología descrita por Añorve y colaboradores [5].

Determinación de minerales

El procedimiento se basó en el método EPA 3052 [6], con modificaciones para el tipo de muestra (alimento).

Determinación de la composición fisicoquímica del alimento suministrado

Se tomaron muestras del alimento que se les suministra a las truchas en sus tres diferentes etapas de crecimiento y se realizó el análisis proximal mediante técnicas de la AOAC [4], se le determino el perfil de ácidos grasos [5] y el contenido de minerales [6].

RESULTADOS

Caracterización fisicoquímica

La caracterización fisicoquímica es un aspecto importante, ya que gracias a esta conocemos la composición de un alimento, además de que nos da un parámetro de la calidad nutricional de esta.

En la tabla 1 se muestra los resultados obtenidos de la composición proximal del alimento suministrado como de la carne de trucha arcoíris.

Tabla 1. Caracterización proximal del alimento suministrado y la carne de trucha arcoíris.

Componente (%)	Humedad	Cenizas	Lípidos	Proteína	Fibra	ENN	Aporte energético (Kcal/100g)
Alimento (primera etapa)	8.74^{c}±0.02	12.97^{b}±0.01	28.03^{c}±0.30	31.22^{b}±0.42	1.54^{a}±0.13	17.50	447.15
Alimento (segunda etapa)	7.73^{b}±0.01	11.51^{a}±0.06	22.75^{a}±0.23	41.14^{c}±0.78	10.38^{b}±0.35	6.49	395.27
Alimento (tercera etapa)	6.22^{a}±0.06	12.55^{b}±0.12	24.72^{b}±0.23	27.06^{a}±0.23	6.71^{c}±0.34	22.74	421.68
Carne de trucha (primer muestreo)	74.76^{a}±0.43	1.27^{a}±0.03	10.61^{b}±0.14	12.50^{a}±0.19	NA	0.86	148.93
Carne de trucha (segundo muestreo)	74.60^{a}±0.66	1.23^{a}±0.01	11.79^{c}±0.57	12.01^{a}±0.69	NA	0.37	155.63

Superíndices diferentes dentro de la misma fila, denotan diferencia significativa a un nivel de significación del 95 %.Media ± SD: desviación estándar de 3 réplicas. NA: No analizado.

Contenido de calcio, hierro y fósforo

De igual manera se determinó el contenido de minerales como el calcio, hierro y magnesio, como observa en la tabla 2.

Tabla 2. Cuantificación de Fe, P y Ca presentes en el alimento en sus distintas etapas de crecimiento en mg por cada 100g de muestra

Elemento	Alimento			Carne de trucha
	Primera etapa	Segunda etapa	Tercera etapa	
Fe	87.62^{c}± 1.37	71.80^{b}± 1.05	64.76^{a}± 2.11	16.16±0.13
P	244.90^{c}± 0.10	151.20^{a}± 0.09	162.09^{b}± 3.96	108.42±1.58
Ca	2866.06^{c}± 5.55	2148.88^{a}± 12.78	2618.16^{b}± 13.30	216.38±0.27

Media ± SD: desviación estándar de 3 réplicas

Perfil de ácidos grasos

En la tabla 3 se muestra el contenido de ácidos grasos presentes tanto en el alimento que se les suministra a las truchas, tanto como los presentes en la carne del pez.

Tabla **3**. Cuantificación de ácidos grasos del alimento y carne de trucha en mg por cada 100 g de muestra

FA, mg/100g	Carne de trucha		Alimento		
	Primer muestreo	Segundo muestreo	Primera etapa	Segunda etapa	Tercera etapa
C14:0	651.22^{c}±23.84	321.71^{b}±11.56	756.10^{a}±17.05	990.08^{b}±56.48	1011.77^{c}±17.41
C15:0	11.95^{b}±1.76	18.56^{a}±2.25	10.43^{a}±2.24	10.47^{a}±0.27	15.69^{b}± 2.31
C16:0	5200.76^{c}±29.31	5853.79^{b}±112.44	8120.90^{a}±50.53	10788.25^{b}±104.01	12634.53^{a}±251.53
C16:1	235.96^{c}±18.04	193.86^{b}±17.12	146.36^{a}±2.68	212.64^{b}±15.01	308.42^{c}±21.45
C17:0	14.54^{c}±1.18	17.37^{b}±1.35	22.92^{a}±1.29	37.64^{b}±1.92	39.59^{b}±8.41
C17:1	108.58^{b}±9.90	124.00^{c}±25.75	127.42^{a}±10.54	177.48^{b}±31.13	314.45^{c}±0.71
C18:0	2698.52^{b}±76.54	3462.71^{c}±65.31	4091.27^{a}±44.21	5190.35^{b}±125.06	5897.69^{c}±29.77
C18:1n9	995.56^{a}±59.69	1362.04^{c}±26.40	742.35^{a}±22.31	2677.65^{b}±81.87	3700.07^{c}±71.82
C18:2n6	10.59^{b}±1.67	16.79^{a}±1.30	19.84^{b}±2.46	44.28^{c}±7.78	16.15^{a}±0.15
C18:3n3	19.67^{a}±5.16	28.49^{c}±2.02	26.74^{c}±6.80	19.86^{b}±3.47	15.86^{a}±2.07
C20:2	20.56^{c}±6.86	29.97^{b}±15.04	21.70^{a}±1.12	46.32^{c}±2.80	11.93^{a}±3.46
C20:3n6	10.42^{b}±1.50	5.44^{a}±0.30	ND	ND	ND
C20:4n6 ARA	200.78^{b}±7.12	224.61^{c}±21.47	129.0^{a}±4.61	271.65^{b}±1.87	423.91^{c}±13.71
C24:0	34.31^{a}±4.11	44.82^{c}±2.37	352.71^{b}±38.41	310.20^{a}±10.07	431.96^{c}±61.00
C20:5n3 EPA	36.73^{b}±10.78	40.51^{c}±2.54	8.33^{a}±1.97	10.51^{b}±0.47	82.74^{c}±16.31
C24:1	140.16^{c}±27.70	173.58^{a}±3.45	72.22^{c}±2.85	10.81^{a}±2.06	66.77^{b}±2.72
C22:6n3 DHA	63.11^{a}±2.91	82.51^{b}±1.19	ND	58.78^{a}±4.34	58.61^{a}±5.70

Superíndices diferentes dentro de la misma fila, denotan diferencia significativa a un nivel de significación del 95 %. Media ± SD: desviación estándar de 3 réplicas. ND: No detectado

DISCUSIONES

Con relación a los valores de humedad de las muestras analizadas de carne de trucha arcoíris, no mostró diferencias significativas entre ellas, teniendo un contenido entre 76 y 77%, estos resultados coinciden con trabajos antes reportados [1,7]. Además de que nos permite ver que existe una relación inversa entre el contenido de humedad y grasa, ya que, cuando aumenta el contenido de agua, los valores de grasa disminuyen, como se puede observar en la tabla 1. Coincidiendo con lo reportado en la literatura [1].

Con respecto al porcentaje de proteína obtenido en el análisis proximal de la carne de trucha muestra que no existen diferencias significativas entre ambas muestras, cabe señalar que el contenido de proteína en las truchas arcoíris de Huasca de Ocampo (12-13%) no coincide con los porcentajes reportados en la literatura [1, 7,8] ya que muestran valores promedio entre el 18 y el 20%. Esto puede

atribuirse a que el contenido de lípidos encontrado en la trucha es muy alto (10-12%) en comparación a la investigación por otros autores (3-6%) [1, 7,8] ya que existe una estrecha relación entre lípidos y proteína, ya que, a valores altos de grasa, disminuye el porcentaje de proteína [1] como se puede observar en la tabla 1.

Estos valores encontrados en la carne pueden explicarse debido a que el alimento que es suministrado a las truchas es rico en lípidos y proteína, cumpliendo con los requerimientos necesarios de estas 2 macromoléculas, ya que estudios similares [1, 9] mencionan que para la trucha arcoíris es necesario suministrar un 36% de proteína y un 24% de lípidos en la dieta.

Además de que estos lípidos deben contener ácidos grasos insaturados de la familia omega 3,6 y 9. Como se puede observar en la tabla 2, el perfil de ácidos grasos encontrado tanto en la carne de trucha como en el alimento es muy similar, esto quiere decir que el alimento es uno de los factores más importantes para que el pez presente este perfil de ácidos grasos.

Con lo que respecta al contenido de fosforo es menor el encontrado en la carne de trucha de huasca que el reportado por otros autores, caso contrario con el calcio, que el encontrado es mayor al reportado en la literatura [10], esto debe ser atribuido a que el alimento contiene altos niveles de calcio, ya que en las publicaciones anteriores no mencionan el contenido de estos minerales que se encuentran en el alimento utilizado en esos criaderos.

En la tabla 2 se observa también que la trucha arcoíris se caracteriza por tener ácidos grasos de cadena larga (más de 18 carbonos) ricos en dobles enlaces y polinsaturados.
Estos ácidos grasos son de suma importancia en la salud humana, ya que estos son los responsables de la disminución de infartos ya que disminuye el contenido de triglicéridos y colesterol, mejoramiento de la visión y ayudan a la formación del sistema nervioso central [11, 12].

CONCLUSIONES

El alimento suministrado a las truchas arcoíris en el municipio de Huasca de Ocampo, en sus tres diferentes etapas de crecimiento, es de alta calidad nutricional, debido a la presencia de ácidos grasos de la familia omega 3 y 6, su alto contenido en proteína y la presencia de minerales que son importantes para un adecuado crecimiento (Ca y P).

La trucha arcoíris es un alimento que tiene un gran aporte nutricional, debido al alto contenido de proteína, la presencia de minerales que son esenciales en la alimentación humana, además de un alto contenido de ácidos grasos de la familia omega 3 y 6.

La presencia de ácidos grasos esenciales en la carne de la trucha arcoíris se debe en gran medida al tipo de alimentación que recibe en sus distintas etapas de crecimiento.

REFERENCIAS

[1] Izquierdo, P., Torres, G., González, E., Barbosa, Y., & Márquez, E. (1999), "Características Fisicoquímicas de la carne de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*)", *Revista científica, 6* (1): 27-32.

[2] Barros, S.P. & Gámez, R.E. (2008). Determinación de la concentración letal media (cl50-96) del glifosato roundupr 747sg, por medio de bioensayos utilizando alevinos de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). (Tesis de licenciatura, Universidad de la Salle, Facultad de Ingeniería Ambiental y Sanitaria): 14-15

[3] Porras, G.G. (1995). Aprovechamiento de la trucha arcoíris *(Oncorhynchus mykiss*) ahumada tipo salmón. (Tesis de licenciatura,Universidad de San Carlos. San Carlos): 5.

[4] AOAC. (2005). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist. (18th ed). Washington:USA .

[5] Añorve, M.J., Castañeda, O.A., Cepeda, S.A., Durant, A.A., Jaimez, O.J., Contreras, L.E., González, O.L. & Rodríguez, R.J. (2015). "Microextraction method of medium and long chain fatty acids from milk", *Food Chemistry 172*, 456–461.

[6] Environmental Protection Agency (EPA). (1996). Method 3052. Microwave assisted acid digestion of siliceous and organically based matrices.

[7] Perea, A., Gómez E., Mayorma Y. & Triana Y. (2008). "Caracterización nutricional de pescados de producción y consumo regional en Bucaramanga, Colombia", *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 58(1): 91-97.

[8] García, M.J., Núñez, G.F., Chacón, P.A., Alfaro, R.A. & Espinosa, H.M. (2004). "Carcass and meat quality of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* Richardson, produced in the northwest of Chihuahua State", *Hidrobiológica 14*(1): 19-26.

[9] Noel, G.W. (2003). Formulación y elaboración de dietas para peces y crustáceos (Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, Facultad de Ingeniería Pesquera): 13-14.

[10] Izquierdo, P., Torres, G., Allara, M., Sánchez, E., & Márquez E. (2001). "Análisis proximal, contenido de aminoácidos esenciales y relación calcio/fosforo en algunas especies de pescado", *Revista científica 6* (2): 95-100.

[11] Valenzuela, B.A. & Sanhueza, C.J. (2009). "Aceites de origen marino; Su importancia en la nutrición y en la ciencia de alimentos", *Revista Chilena de Nutrición 36*: 246-249.

[12] Grau, M.C., Marval, H., & Zerpa, M.A. (2007)." Utilización de harina de pescado en la formulación de alimentos para crecimiento y engorde animal", *INIA Divulga 10*(1): 93-95.

DETERMINATION OF THE ANTIOXIDANT ACTIVITY AND PHYSICOCHEMICAL CHARACTERISTICS IN JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa*, L.) WINE

[Determinación de la actividad antioxidante y características fisicoquímicas en vino de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*, L.)]

Julia Verónica Hernández-Madrigal[a*+], Laura Virginia Madrigal-Ambriz[a], Joel Vázquez-Galindo[a], Oscar Alejandro Figueroa-Barreto[a]

[a] Universidad de Colima, Facultad de Ciencias Químicas, Carretera Colima-Coquimatlán, km 9, C.P. 28400, Coquimatlán, Col. México.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: juliehdez@ucol.mx

Área del Conocimiento: Q. Alimentos.

ABSTRACT
Nowadays there is a concern about the consumption of foods and beverages that provide health benefits. Among the alcoholic beverages, it has been demonstrated that red wine presents antioxidants, which have cardioprotective properties. Because of Roselle contains an important amount of antioxidants like anthocyanins, polyphenols and ascorbic acid, beverages can be elaborated from its calyces, which is available in the state of Colima, México. Therefore, the objective of this investigation was to elaborate an alcoholic beverage from the calyces of Roselle, and determine monomeric anthocyanins, antioxidant activity and polyphenols (Folin-Ciocalteau). The dried calyces of Roselle "Jamaica Colima" were harvested in Puerta Anzar, Colima, México. The extract was prepared with 100 g of Roselle calyces and 1000 mL of potable water at 90°C for 30 min to obtain Roselle calyces extract, °Brix was adjusted to 24 with sucrose and 1% diammonium phosphate and 1% of ammonium sulfate was added; finally 1% yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) was added. It was fermented at 25° C for 30 days. The results showed that the wine elaborated from the Roselle calyces maintained 26% of the total polyphenols and 8.2% of the monomeric anthocyanins contained in the raw material. The pH of the wine (2.86) is adequate for the existence of the flavylium cation from the present anthocyanins. In the color analysis, the a* parameter, that indicates the tendency towards red, showed a decrease of 32%, still having a reddish coloring, characteristic of this kind of wines. In the attributes evaluation the Roselle wine showed a sweet taste, red color similar to red wine, alcohol content (9 °GL), no significant astringency or acidity, emphasizing that it retains the original Roselle flavor, which was pleasant for the panelists, with the benefit that it provides natural antioxidants.

Keywords: *Hibiscus sabdariffa*; antioxidant capacity; wine; polyphenols.

RESUMEN
En la actualidad, hay una gran preocupación por el consumo de frutas y vegetales que puede proporcionarnos beneficios a la salud. Entre las bebidas alcohólicas, se ha demostrado que el vino tinto contiene antioxidantes, el cual tiene propiedades cardioprotectoras. Debido a que la jamaica contiene

cantidades importantes de antioxidantes como son antocianinas, polifenoles y ácido ascórbico, se han elaborado bebidas provenientes de sus cálices, los cuales se encuentran disponibles en el estado de Colima, México. Por lo tanto, el objetivo de la investigación fue elaborar una bebida alcohólica de los cálices de jamaica y determinar antocianinas monoméricas, actividad antioxidante y polifenoles (Folin-Ciocalteau). Los cálices secos de "Jamaica Colima" fueron cosechados en Puerta de Anzar, Colima, México. Los extractos fueron preparados con 100 g de cálices de jamaica y 1000 mL de agua potable a 90°C por 30 minutos para obtener el extracto de cálices de jamaica, posteriormente se ajustaron los grados Brix a 24 con sacarosa y fueron añadidos fosfato de diamonio al 1% y sulfato de amonio al 1%, finalmente se adicionó 1% de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*). Se fermentó a 25°C por 30 días. Los resultados muestran que el vino elaborado de los cálices de jamaica mantienen el 26% del total de polifenoles y 8.2% de las antocianinas monoméricas contenidas en la materia prima. El pH del vino (2.86) es adecuado para la existencia del catión flavilium de las antocianinas presentes. En el análisis del color, el parámetro a*, que indica la tendencia hacia el color rojizo, mostró una disminución del 32%, quedando aún una coloración rojiza característica de este tipo de vinos. En la evaluación por atributos, el vino de jamaica presentó un sabor dulce, color rojo similar al vino tinto, con un contenido de alcohol de 9°GL, no hubo una astringencia ó acidez significativa, cabe resaltar que conserva el sabor original a jamaica, el cual fue agradable para los panelistas, con los beneficios de los antioxidantes naturales.

Palabras Clave: *Hibiscus sabdariffa*; capacidad antioxidante; vino; polifenoles.

INTRODUCCIÓN

El consumo de alimentos y bebidas además de proporcionar energía y nutrientes; puede constituir un medio para aportar compuestos benéficos para la salud como son los antioxidantes. Entre las bebidas que se consumen en México están los refrescos, té, café, jugos, bebidas tradicionales y vino entre otros [1]. Investigadores han relacionado el consumo de bajas a moderadas cantidades de vino tinto con la reducción de los factores de riesgo cardiovascular [2]. El vino tinto tiene una coloración rojiza debido a las antocianinas presentes, las cuales también se pueden encontrar en las bebidas o infusiones elaboradas a partir de la Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) [3]. A las antocianinas se les ha relacionado en la prevención de enfermedades cardiovasculares, como la aterosclerosis [4], también se ha encontrado que tienen actividad anticancerígena y antiinflamatoria [5]. En varias partes del mundo la Jamaica es conocida con nombres como roselle, sorrel y karkadé, existiendo una gran producción en África y Asia; en México en el año de 2013, se obtuvo una producción anual de 6,037.72 toneladas [6]. Entre los estados productores de Jamaica en el país, Colima ocupó el sexto lugar, produciendo 36 toneladas, con una superficie sembrada de 60 hectáreas, por lo que el objetivo de este trabajo es determinar los antioxidantes y polifenoles en una bebida alcohólica elaborada a partir de los cálices de Jamaica Colima variedad Puerta de Ánzar.

METODOLOGÍA

Se utilizaron cálices deshidratados de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) variedad Colima, cultivada en Puerta de Ánzar, Colima, México.

Los cálices de jamaica (CJ), se molieron en licuadora Osterizer y en un molino tipo ciclón (Cyclone Sample Mill, marca Fort Collins), con una malla de 0.5 mm.

Para la obtención del extracto acuoso (EJ), se pesaron 100 g de cálices, se añadió un litro de agua potable, se aplicó tratamiento térmico a 90°C por 30 minutos. Posteriormente se separó el líquido de los

cálices con un tamiz malla 20, los cálices se lavaron con 3 volúmenes de agua para extraer el máximo de los componentes hidrosolubles.

Elaboración del vino de jamaica.

Se utilizaron 3 litros del extracto líquido de Jamaica (EJ), se adicionó 150 mg de metabisulfito de sodio y se dejó reposar durante 24 horas, se ajustaron los grados Brix a 24 con sacarosa comercial y se adicionó 1% de fosfato de diamonio y 1% de sulfato de amonio; finalmente se agregó 1% de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*). Se fermentó a 25 °C durante 36 días.

Análisis realizados en los cálices deshidratados.

Se determinó humedad, ceniza, proteína, grasa y fibra dietaria (AOAC, 2006) [7]. El color se determinó con un Colorímetro HunterLab LabScan XE; los parámetros L*, a* y b*; y vitamina C (kit Megazyme K-ASCO 06/10).

Extracción y determinación de polifenoles totales.

Se pesó 1 g de de los cálices deshidratados y molidos, se adicionó 50 ml de una solución de metanol-agua 50:50 (v/v) se mantuvo 60 min en agitador orbital (Big Bill Digital, Thermolyne); a 250 rpm; la mezcla se pasó a tubos y se centrifugó 20 min a 4000 rpm. Se decantó el sobrenadante en un vaso de precipitado, al residuo se le adicionó 50 ml de solución de acetona-agua al 70:30 (v/v) y se repitió el proceso de agitación y centrifugación, el sobrenadante se separó, se mezcló con el sobrenadante anterior y se aforó a 100 mL con agua destilada [8].

Para cuantificar los polifenoles totales se tomó 1 mL del extracto, se le adicionó 5 ml de solución de Folin-Ciocalteu 1:10, se dejó reposar durante 5 min, se adicionó 4 ml de solución de carbonato de sodio al 7.5% (p/v), se agitaron los tubos y se dejaron reposar durante 60 minutos en un lugar oscuro, finalizado el tiempo se procedió a leer en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 740 nm [9]. El contenido de polifenoles totales se calculó usando una curva de calibración con soluciones estándar de ácido gálico de 10, 25, 50 y 100 mg/L y los resultados se expresaron en mg/l de equivalentes de ácido gálico (EAG) en la muestra original.

Extracción y determinación de Actividad antioxidante

La actividad antioxidante se determinó usando el método DPPH (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácidocarboxilico) según Szydłowska-Czerniak, A., et al.,[10] con algunas modificaciones. El extracto se diluyó 1:50 (v/v), para el seguimiento de la reacción se tomó una alícuota de 0.5 mL, se adicionaron 1.5 mL de etanol y 0.5 mL de solución metanólica de DPPH 0.06mM. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 517 nm, al minuto cero y 5, 10 y 15 minutos hasta que la reacción llega al equilibrio. También se prepararon diferentes disoluciones de Trolox 0.0125; 0.0250; 0.0500; 0.1000 y 0.1250 mM a partir de una disolución estándar de concentración 2.5 mM de Trolox en metanol. Para elaborar la curva de calibración, se tomaron alícuotas de 200 µl de cada una de las disoluciones estándar sustituyéndolas por el extracto, utilizando el mismo procedimiento mencionado anteriormente.

Extracción y determinación de Antocianinas monoméricas.

La extracción se realizó con 3 g de muestra, utilizando solución de metanol acidificado, se agitó 1 hora a 250 rpm, en agitador orbital Big Bill Digital, Thermolyne; se centrifugó 20 minutos a 4000 rpm y se decantó el sobrenadante del residuo [11]. El procedimiento se repitió dos veces más, colectando el sobrenadante y aforando a 100 mL con metanol acidificado. Se realizó la determinación de acuerdo al método 2005.02 (AOAC, 2006).

Análisis en el extracto líquido de la Jamaica (EJ)
En el extracto líquido de jamaica se determinaron pH y acidez titulable (AOAC, 2006), grados Brix (Refractómetro Abbe) y color (Colorímetro HunterLab LabScan XE).

Análisis Fisicoquímicos en el vino (VJ).
Acidez total, pH y grado alcohólico (AOAC, 2006), °Brix (Refractómetro Abbe), el color, parámetros L, a* y b* (Colorímetro HunterLab LabScan XE); y vitamina C (kit Megazyme K-ASCO 06/10).

Evaluación Sensorial de Vino.
La evaluación sensorial se realizó con 12 jueces no entrenados de edades entre 20 y 52 años, mediante una prueba por atributos [12].

Análisis Estadístico.
Las determinaciones se realizaron por triplicado y los datos se analizaron con t de Student con nivel de confiabilidad de 95%.

RESULTADOS
Para los cálices enteros se presenta el valor de humedad de 13.64 ±0.13. Los valores del color para los parámetros L*, a* y b* fueron 38.6 ± 0.03, 22.7 ± 0.01 y 8.5 ± 0.02 respectivamente. La composición química de los cálices fue: proteína (N*6.25) 7.30 ± 1.07, cenizas 8.80 ± 0.38, extracto etéreo 0.29 ± 0.004, fibra dietaria total 34.48 ± 1.10 y extracto libre de nitrógeno 27.73. Los valores se presentan como las medias por triplicado ± desviación estándar.

La tabla 1 presenta los valores de las medias por triplicado ± desviación estándar para las características químicas del cáliz de Jamaica (CJ) y vino de Jamaica (VJ).

Tabla 1. Características químicas de CJ y VJ.

Parámetro	**CJ**	**VJ**
Polifenoles (mg EAG/g)	26.34±1.75	6.15±0.9**
Vitamina C (mg/g)	7.49±0.3	4.46±1.62
TEAC (mMequiv Trolox/100 g)	4.44	8.69±0.02
%AAT	89.78±0.2	96.67±0.02
Antocianinas monoméricas	301.10±13.42*	22.32±0.31***

*equivalentes de cianidina-3-glucósido (mg/100g).
** g EAG/100 mL
*** equivalentes de cianidina-3-glucósido (mg/mL).

En la tabla 2, se exponen las características físicas más importantes del EJ y VJ para posteriormente realizar su comparación, resalta el contenido de azúcares en 1.9 °Brix, el cual después del ajuste y la fermentación se obtuvo un valor de 13.2 °Brix. El grado alcohólico obtenido fue de 9 °GL.
Respecto a la evaluación sensorial del vino, en la prueba de evaluación por atributos se observó que para el primer atributo el color rojo se obtuvo un valor de 76, para el sabor 60, el grado alcohólico de 40, brillo 73, dulzura 65, acidez 33, astringencia 41 y amargura 13.

Tabla 2. Características físicas del EJ y VJ

Parámetro	EJ	VJ
pH	2.51 ±0.02	2.86 ±0.02
Acidez titulable (% ácido cítrico)	0.55 ±0.03	0.63 ±0.02
Sólidos soluble totales (º Brix)	1.90 ±0.02	13.20±0.02
Color		
L	24.29 ±1.31	5.89 ±0.32
a*	38.47 ±0.2	25.92 ±0.14
b*	27.41 ±0.56	7.96 ±0.31

DISCUSIONES

Para los cálices enteros presentan valores de humedad y color L* de 10.3 ±0.17 y 38.6; los cuales están de acuerdo con los resultados obtenidos por Salinas-Moreno *et al.* [13], quienes reportan análisis de variedades de Jamaica Colima, pero no especifican su lugar de cultivo. Se reporta un alto contenido en fibra dietaria (34.48) cercano al valor de 37-45 g/100 g reportado por Sáyago-Ayerdi *et al.* [14].

El contenido de polifenoles en el cáliz (26.34 mg EAG/g) fue menor al valor de 28.4 mg/g, reportados por Borrás-Linares *et al.* [15] para cálices rojos de Jamaica variedad Colima, cultivados también en Puerta de Anzar, la variación pudiera deberse a las condiciones de cultivo, medio ambiente y ecología. El contenido de antocianinas monoméricas de 301.10 mg/100 g es cercano al valor de 318.9 mg/100 g reportado por Cid-Ortega *et al.* [16], el cual reporta la mayor cantidad de antocianinas extraídas de cáliz molido con un tamaño de partícula de 0.5 mm, siendo diferentes las condiciones de extracción con este trabajo, así como la variedad de Jamaica. El vino elaborado a partir de los cálices de jamaica contiene 6.15 g EAG/100 mL de polifenoles totales y 22.32 equivalentes de cianidina-3-glucósido en mg/mL, siendo estos dos parámetros importantes, ya que le confieren beneficios a la salud. El pH del vino se mantuvo bajo después de la fermentación, con lo cual se mantendrá el color rojo debido a la presencia de cation flavilium de las antocianinas presentes. En la determinación del color del extracto y vino se encontró un valor L* de la luminosidad menor en el vino, lo cual nos indica que se oscureció; se observó una disminución del 32 % en el parámetro a* que nos indica la tendencia a una coloración rojiza.

Otro resultado importante es la actividad antioxidante, ya que proporciona información respecto a la captación de radicales que puede atrapar el vino, el valor más alto se encontró en el vino siendo de 8.69 mMequivalentes de Trolox/100 g, y en el cáliz de 4.44 mMequivalentes de Trolox/100 g existiendo diferencia significativa. Estos valores no han sido reportados con anterioridad para este tipo de vino, por lo que podría ser el primer reporte que se tenga de actividad antioxidante. Los grados alcohólicos obtenidos cumplen con la norma NOM-142-SSA1/SCFI-2014.

La evaluación por atributos mostró un sabor dulce, color rojo similar al de un vino tinto, bajo contenido alcohólico, sin astringencia, ni acidez significativas, resaltando que se conserva el sabor original de la Jamaica.

CONCLUSIONES

Se obtuvo un vino suave, con coloración rojiza brillante el cual fue agradable a los panelistas, este conserva polifenoles y vitamina C del extracto dándole un valor agregado al vino por contener antioxidantes naturales benéficos para la salud, los cuales han demostrado funcionar como anticancerígenos y antiinflamatorios, así como proveer efectos cardioprotectivos.

REFERENCIAS

[1] Hervert-Hernandez, D., Goni, I. (2012). "Contribution of beverages to the intake of polyphenols and antioxidant capacity in obese women from rural mexico", Public health nutrition, 15 (1): 6-12.

[2] Ronksley, P.E., Brien, S.E., Turner, B.J., Mukamal, K.J., Ghali, W.A. (2011). Association of alcohol consumption with selected cardiovascular disease outcomes: A systematic review and meta-analysis. Vol. 342.

[3] Gonzalez-Palomares, S., Estarron-Espinosa, M., Gomez-Leyva, J.F., Andrade-Gonzalez, I. (2009). "Effect of the temperature on the spray drying of roselle extracts (hibiscus sabdariffa l.)", Plant foods for human nutrition (Dordrecht, Netherlands), 64 (1): 62-67.

[4] Chen, C.-C., Chou, F.-P., Ho, Y.-C., Lin, W.-L., Wang, C.-P., Kao, E.-S., Huang, A.-C., Wang, C.-J. (2004). "Inhibitory effects of hibiscus sabdariffa l extract on low-density lipoprotein oxidation and anti-hyperlipidemia in fructose-fed and cholesterol-fed rats", Journal of the Science of Food and Agriculture, 84 (15): 1989-1996.

[5] Ali, B.H., Wabel, N.A., Blunden, G. (2005). "Phytochemical, pharmacological and toxicological aspects of hibiscus sabdariffa l.: A review", Phytotherapy Research, 19 (5): 369-375.

[6] Sistema de información agroalimentaria de consulta http://www.siap.gob.mx/?option=com_content&view=article&id=181&Itemid=426

[7] (2006). AOAC, official methods of analysis. Association of official analytical chemists. 18th ed.

[8] Larrauri, J.A., Rupérez, P., Saura-Calixto, F. (1997). "Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45 (4): 1390-1393.

[9] Singleton, V.L., Rossi Jr., J.A. (1965). "Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents", Amer. J. Enol. Vitic, 16 (3): 144-158.

[10] Szydłowska-Czerniak, A., Trokowski, K., Karlovits, G., Szłyk, E. (2010). "Determination of antioxidant capacity, phenolic acids, and fatty acid composition of rapeseed varieties", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58 (13): 7502-7509.

[11] Abou-Arab, A.A., Abu-Salem, F.M., Abou-Arab, E.A. (2011). "Physico-chemical properties of natural pigments (anthocyanin) extracted from roselle calyces (hibiscus subdariffa)", Journal of American Science, 7 (7): 445-456.

[12] Pedrero-F., D.L., Pangborn, R.M. (1997). Evaluación sensorial de los alimentos. Métodos analíticos.

[13] Salinas-Moreno, Y., Zúñiga-Hernández, A.R.E., Jiménez-De la Torre, L.B., Serrano-Altamirano, V., Sánchez-Feria, C. (2012). "Color en cálices de jamaica (hibiscus sabdariffa l.) y su relación con características fisioquímicas de sus extractos acuosos", Revista Chapingo. Serie horticultura, 18 395-407.

[14] Sáyago-Ayerdi, S.G., Velázquez-López, C., Montalvo-González, E., Goñi, I. (2014). "By-product from decoction process of hibiscus sabdariffa l. Calyces as a source of polyphenols and dietary fiber", Journal of the Science Food Agriculture, 94 (5): 898-904.

[15] Borrás-Linares, I., Fernández-Arroyo, S., Arráez-Roman, D., Palmeros-Suárez, P.A., Del Val-Díaz, R., Andrade-Gonzáles, I., Fernández-Gutiérrez, A., Gómez-Leyva, J.F., Segura-Carretero, A. (2015). "Characterization of phenolic compounds, anthocyanidin, antioxidant and antimicrobial activity of 25 varieties of mexican roselle (hibiscus sabdariffa)", Industrial Crops and Products, 69 (0): 385-394.

[16] Cid-Ortega, S., Guerrero-Beltrán, J. (2015). "Roselle calyces (hibiscus sabdariffa), an alternative to the food and beverages industries: A review", Journal of Food Science and Technology, 1-11.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

EVOLUTION OF CAPSAICINOIDS AND VOLATILE COMPOUNDS IN FERMENTED PASTES FROM JALAPEÑO AND SERRANO CHILI PEPPERS

(Evolución de los capsaicinoides y compuestos volátiles, presentes en pastas fermentadas de chile jalapeño y serrano)

Julisa Edith López Ramírez[a*+], Estefany Hernandez Aguilera[a], Karina de la Rosa Silerio[a], Pedro Martín Mondragón Cortez[a].

[a]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 que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: jelopez@ciatej.mx

Área del Conocimiento: Q. Alimentos.

ABSTRACT
The chili pepper (*Capsicum*) is a basic ingredient in Mexican food, their flavor and aroma are influenced by volatile compounds responsible for odor; and the capsaicinoids, responsible for the pungency. In this work, was analyzed the fermentation effect in evolution of major capsaicinoids and in the volatile compounds. The capsaicinoids (capsaicin and dihydrocapsaicin) by using high performance liquid chromatography (HPLC) using two fermented pastes from jalapeño and serrano chili peppers. On the other way, gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) was used to evaluate volatile compounds. The results showed that capsaicinoids increased in fermented pastes from two varieties. Capsaicin was observed in the interval from 188.98 to 311.53 ppm and 107.39 to 195.80 ppm in jalapeño and serrano fermented pastes, respectively. While that dihydrocapsaicin was observed in the interval from 29.78 to 37.81 ppm and 15.11 to 28.86 ppm in jalapeño and serrano fermented pastes, respectively. By using GC-MS were identified 68 volatiles compounds in both fermented pastes. The compounds were classified in chemical family, and for example was observed that sulfuric compounds decreased while that the acids compounds increased in jalapeño and serrano peppers pastes. The results obtained in this work, could be used to select specific type of fermented paste to elaborate typical salsa with originals sensory and nutrimental properties.

Keywords: Capsaicinoids; volatile; cromatography; chili.

RESUMEN
El chile (*Capsicum*) es un ingrediente básico en la comida mexicana, su sabor y aroma están fuertemente influenciadas por los compuestos volátiles responsables del olor; y los capsaicinoides, responsables de la pungencia o picor. En este trabajo, se evaluó el efecto de la fermentación en la evolución de los principales capsaicinoides y en los compuestos volátiles. Los capsaicinoides (capsaicina y dihidrocapsaicina) se evaluaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) utilizando dos pastas fermentadas de chile jalapeño y chile serrano. Por otro lado, se utilizó la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) para evaluar los compuestos volátiles. Los resultados mostraron que capsaicinoides aumentaron en las dos pastas fermentadas. La capsaicina se incrementó

de 188,98 a 311,53 ppm y 107,39 a 195,80 ppm en las pastas de jalapeño y serrano respectivamente. Mientras que la dihidrocapsaicina se observó en el intervalo de 29.78 a 37,81 ppm y 15.11 a 28,86 ppm en las pastas jalapeño y serrano, respectivamente. Mediante el uso de GC-MS se identificaron 68 compuestos volátiles en ambas pastas fermentadas. Los compuestos fueron clasificados en familia química, en general, se observó que los compuestos azufrados disminuyeron, mientras que los compuestos ácidos se incrementaron en las pastas de jalapeño y serrano. Los resultados obtenidos en este trabajo, se podrían utilizar para seleccionar el tipo específico de pasta fermentada para elaborar la salsa típica con originales sensoriales y las propiedades nutrimentales.

Palabras Clave: Capsaicinoides; chile; volátiles; cromatografía.

INTRODUCCIÓN

El chile (*Capsicum*), originario de América, es un condimento básico en los platillos típicos mexicanos, moles, salsas, adobos y dulces, también se utiliza como materia prima para elaborar shampoos, cremas y atomizadores para defensa personal, además, es usado como estimulante del apetito, cardiotónico, rubefaciente para artritis, carminativo y anti-hipertensivo. Estas propiedades son atribuidas a que son fuente de compuestos bioactivos, los cuales, tienen la capacidad de contrarrestar los efectos dañinos para la salud, es rico en polifenoles, provitamina A, vitamina C, carotenoides, antocianinas y capsaicinoides (Guadarrama L. y col., 2010 [1]).

Los polifenoles tienen actividad antioxidante, mientras que los flavonoides actividad anticancerigena. Los ácidos grasos de cadena corta, ayudan al metabolismo de los carbohidratos (Matsufuji H. 2008 [2]). Por otro lado los capsaicinoides, tienen actividad antimicrobiológica, antioxidante y efectos anticancerígenos (Cleeg M. *et al*., 2011[3], Loeser J. *et al*.,2012[4]). Los capsaicinoides, además de bioactivos, son los responsables de la pungencia y son de gran importancia para el sabor típico del chile, que junto con los compuestos volátiles juegan un papel muy importante en la percepción sensorial del mismo, su presencia y concentración da una identidad propia a cada variedad de chile.

Por otro lado, para conservar el chile se recurre diferentes procesos como el deshidratado (entero, en hojuelas o molido), elaboración de encurtidos o salmueras, la elaboración de pastas (que pueden ser fermentadas o no). Los alimentos fermentados son definidos como todos aquellos alimentos que han sido modificados, en una vía deseada por la actividad microbiana o enzimática. Estos alimentos son productos apetitosos que se preparan a partir de materia cruda o tratada térmicamente y que, mediante un proceso en el cual se incluyen microorganismos específicos, adquieren propiedades sensoriales características en cuanto a sabor, aroma, apariencia visual, textura y consistencia, además de una mayor vida de anaquel e inocuidad higiénica [5, 6].Los cambios que ocurren son causados por los metabolitos liberados por tales microorganismos, mismos que juegan un papel primario en la fermentación [7, 8, 9].En este estudio se pretende contribuir al conocimiento del efecto del proceso de fermentación en los dos principales capsaicinoides(capsaicina y la dihidrocapsaicina), así como su efecto en el perfil volátil., utilizando pastas fermentadas con *Lactobacillus plantarum* obtenidas de dos variedades de chile: Serrano y jalapeño.

METODOLOGÍA

Obtención de Muestras: Se obtuvo la pasta a partir del chile fresco, la cual se llevó a choque térmico (de 90°C /15 minutos a 4°C/5 minutos), se inoculó con *L. plantarum*, se incubó a 32±3 C durante 24 h. Los

muestreos se realizaron cada 4 h. Las muestras se almacenaron a -18°C hasta la medición cromatográfica.

Determinación de capsaicinoides. 5 g de muestra con 25 mL de etanol al 95% se agitaron durante 2 minutos, se llevaron a ultrasonido por 30 minutos y se centrifugaron durante 15 minutos a 7500 rpm. Se recuperó el sobrenadante para al análisis cromatográfico. Para la identificación de capsaicina y dihidrocapsaicina, la inyección de muestras fue de 100 µl (AutomuestreadorVarian Al ProStar 430-2) a un sistema de HPLC (Varian As ProStar 420-1) equipado con bombas (Varian Prostar 230), un detector UV-Vis (Varian Prostar 325) a 284 nm de longitud de onda y una columna C18 que se mantuvo a 25ºC. Como fase móvil se manejó agua de grado HPLC (que contiene 1% de ácido acético) y acetonitrilo (Sigma-Aldrich) (50:50, v/v) a una velocidad de flujo de 1.0 ml/min siguiendo un gradiente de elusión acetonitrilo/agua 50:50; al minuto 2, 80:20; al minuto 8, 50:50 durante 7 minutos, con un tiempo de corrida total de 15 minutos.

Determinación de compuestos volátiles. 5 g de muestra con 10 mL de solvente (Metanol/isococtano 3:2) se agitó durante 3 minutos, se centrifugó a 5500 rpm durante 5 minutos, se recuperó el sobre nadante para el análisis cromatográfico. Condiciones cromatográficas: cromatógrafo de gases, HP 6890 series II, acoplado a un espectrómetro de masas HP 5973N, con una columna polar de 60 m x 0.25 mm x 0.25 µm. El horno fue programado a una temperatura inicial de 50 °C, mantenida durante 5 minutos, después se incrementó a razón de 5 °C/min, hasta 220 °C y se mantuvo por 20 minutos. La temperatura del inyector fue 220 °C y del detector 240 °C. El volumen de muestra inyectado fue de 0.5 µL utilizando un flujo de helio de 0.7 mL/min. Los compuestos fueron identificados utilizando la librería de espectros Nist 6.L.

RESULTADOS

Una vez obtenidas las muestras de las pastas fermentadas, se procedió a realizar el análisis instrumental, por un lado se evaluó la variación en las concentraciones de la capsaicina y dihidrocapsaicina, resultados obtenidos por medio de cromatografía líquida de alta resolución; y por otro lado, los resultados obtenidos debido a la fermentación, reflejado en los compuestos volátiles, evaluados mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

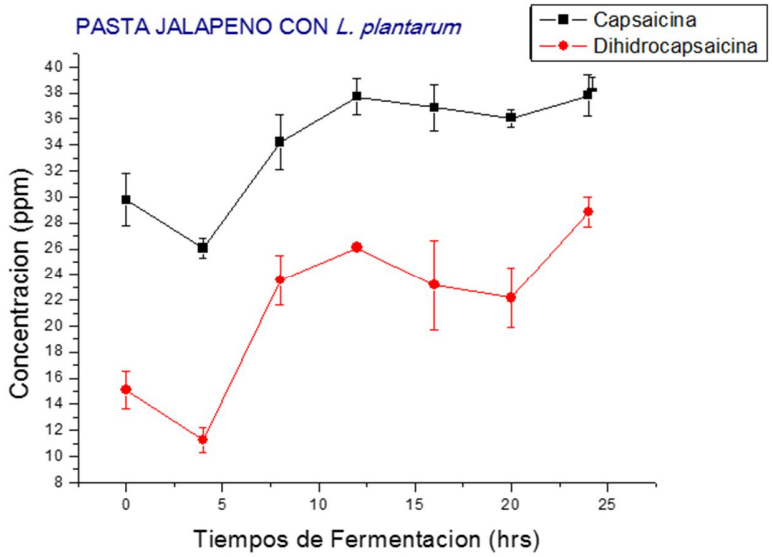


Figura 1.- Evolución de la capsaicina y dihidrocapsaicina, durante la fermentación de la pasta de chile jalapeño.

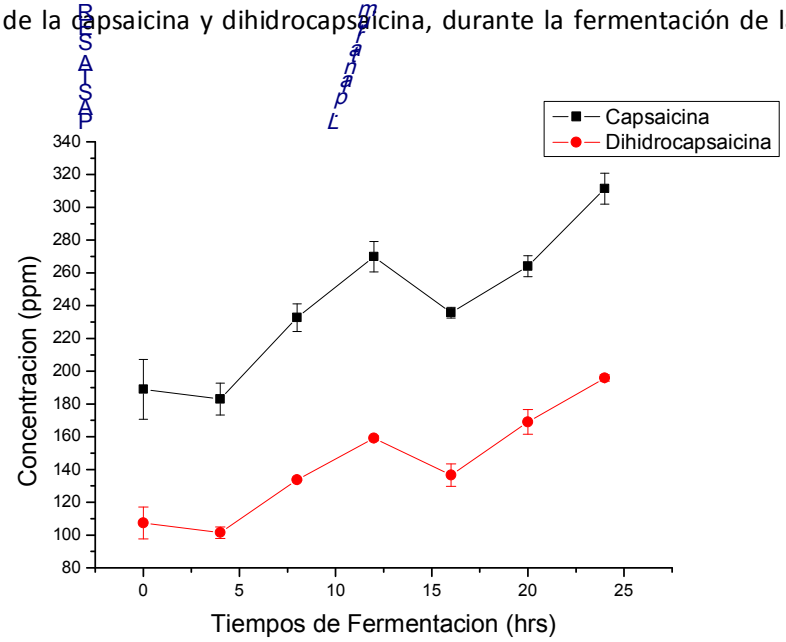


Figura 1.- Evolución de la capsaicina y dihidrocapsaicina, durante la fermentación de la pasta de chile serrano.

En la Tabla 1, se muestra el número de compuestos volátiles clasificados por familias, presentes en las pastas de chile jalapeño y Serrano en al inicio y final de la fermentación.

Tabla 1.Número de compuestos volátiles, presentes en las pastas de chile Jalapeño y serrano, a tiempo inicial y final de la fermentación.

Familias de compuestos químicos	Jalapeño		Serrano		Total
	Tiempo inicio	Tiempo final	Tiempo inicio	Tiempo final	
Acidos	8	10	7	9	9
Alcoholes	4	4	4	4	4
Aldehídos y cetonas	8	8	10	10	10
Azufrados	8	4	5	2	8
Esteres	5	5	5	5	5
Terpenos	10	10	10	10	10
Fenoles	1	2	2	2	2
Hidrocarburos	6	6	5	5	6
Diversos	14	14	12	12	14
Total compuetos					68

DISCUSIONES

En las Figuras 1 y 2, se puede observar la gráfica que indica el incremento de los capsaicinoides en función del tiempo de fermentación.

En las muestras de chile jalapeño (Figura 1), la capsaicina aumento su concentración de 29.79 ppm a 37.81 ppm a las 24 h de fermentación. Para la dihidrocapsaicina los valores encontrados fueron de 15.11 ppm a tiempo cero de fermentación y de 28.86 ppm a tiempo final. Para las muestras de chile serrano (Figura 2), de 188.98 ppm y 107.39 ppm a tiempo inicial de fermentación, y de 311.43 ppm y 195 ppm a tiempo final, para la capsaicina y dihidrocapsaicina respectivamente. Independientemente de la variedad de chile, las pastas sometidas a fermentación presentaron un incremento relativamente continuo, lo que hace suponer que no se forman durante el proceso, si no que se liberan durante el mismo, sin embargo, es importante señalar que están reportados como inhibidores de la fermentación [5].

Respecto a los compuestos volátiles, en la Tabla 1 se puede observar el número de compuestos por familia y su variación al inicio y final de fermentación. Se observa que compuestos como los alcoholes, los terpenos, los ésteres, no cambiaron durante el proceso; otros solo cambiaron por variedad, como los aldehídos y cetonas, los fenoles, hidrocarburos y los de naturaleza diversa, en otros se observa que cambiaron por variedad y por tiempo de fermentación como los ácidos, y lo compuestos sulfurados.

A continuación se mencionan algunos de los compuestos volátiles encontrados en las muestras analizadas: Ácidos: Acético, propanoico, butírico, hexanoico, octanoico, decanoico, dodecanoico, tretranoico, octadecanoico. Alcoholes: Metanol, etanol, 1-octen-3-ol, 3,6-nonadienol. Aldehídos y cetonas: 2-pentenal, hexanal, 2-hexenal, 4-heptenal, heptanal, 2-heptenal, benzaldehído, 2,4-heptadienal, 2-octenal, 2,6-nonadienal. Azufrados: Butil heptadecil sulfato, pentil tetradecil sulfato, 4-(Metiltio)-2-tiol, 2-(metiltio)-4-tiol, Ditiol, 2-Mercapto-4-heptanol, 4-Hepteno-2-tiol, 2-heptanetiol. Esteres: Metil salicilato, etil 2-metilbutanoato, etil 4-metilpentanoato, 4-metilpentil pentanoato, hexil-2-

metil butirato. Terpenos: Terpineol, murolol, linalol, mentol, gama-terpineno, alfa-terpineol, alfa pineno, mirceno, humuleno, isocariofileno. Fenoles: Guaiacol, eugenol.

CONCLUSIONES

Para el chile serrano se cuantificó 188.98 ppm de capsaicina y 107.39 ppm de dihidrocapsaicina en pasta sin fermentar y 311.53 ppm y 195.80 ppm de capsaicina y dihidrocapsaicina respectivamente en pasta fermentada. Para el chile jalapeño, se encontró 29.78 ppm de capsaicina y 15.11 ppm de dihidrocapsaicina en pasta sin fermentar y en pasta fermentada fue de 37.81 ppm de capsaicina y 28.86 ppm de dihidrocapsaicina. La fermentación permitió una mejor detección de los capsaicinoides y permitió identificar algunos cambios en compuestos volátiles.

REFERENCIAS

[1] Guadarrama L., Beltrán L., Dorantes A., Jaramillo F. (2010). Influencia de las Condiciones de Extracción en la Obtención de Pigmentos de Chile (Capsicum annuum L. grossum sendt.) XVIIII Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica XVIIII. Clave: ALI288AND20091222

[2] Matsufuji H. (2008). Chemical Structures and Antioxidant Activity of Natural Food Colorants Department of Food Science and Technology, College of Bioresource Sciences, Nihon University Foods Food Ingredients J. Jpn., Vol. 213, No.6.

[3] Clegg M.E., Golsorkhi M., Henry C.J. (2011). Combined medium-chain triglyceride and chilli feeding increases diet-induced thermogenesis in normal-weight humans. European Journal of Nutrition. Loeser J. et al.,2012 Chili zur Therapie der Trigeminusneuralgie.Schmerz26:435–437.

[4]Loeser J., Pilgram B., Dagtekin O. (2012). Chili zur Therapie der Trigeminusneuralgie.Schmerz26:435–437.

[5] Messens, W., De Vuyst, L. (2002). Inhibitory substances produced by Lactobacilli isolated from sourdoughs-a review. Intertational Journal of food microbiology. 72:31-43.

[6] Schneider, R., Fernandez, F.J. Aguilar, M.B., Guerrero-Legarreta, I., Alpuche-Solis, A., Ponce-Alquicira E. (2006). Patrial characterization of a class llapediocin produced by Pediococcus parvulus 133 strain isolated from meat (Mexican “chorizo”). Food Control. 17:909-915.

[7] Pederson, C. S., Albury, M.N. (1955). The influence of salt and temperature on the microflora of sauerkraut fermentation. Food Technology, 8(1), 1-5.

[8] Deshpande, S.S., Salunkhe, D.K. (2000). Fermented grain legumes, seeds and nuts. A global perspective. New York: FAO Agricultural Services Bulletin No.142.

[9] Dokken, L., Schmindt, B. (2003). Fermentation in the Food Industry: An Introduction to Biotechnology: Biotechnology workshop for teachers. Wisconsin: University of Wisconsinriver Falls.

BROMATOLOGICAL COMPARISON OF COMMERCIAL TOMATO PUREE *vs* ARTISANAL

(Comparación bromatológica de puré de tomate comercial *vs* artesanal)

Willy Morales-Ávila[a*+], Cinthya Annel Avila-Estrada[a], Rosa Eréndira Fosado-Quiroz[a], María Zenaida Saavedra-Leos[a]

[a]Coordinación Académica Región Altiplano de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: willy.morales@alumnos.uaslp.edu.mx

Área del Conocimiento: Q. Alimentos.

ABSTRACT
The bromatological analyses in food are of great importance, because in this way you can know the qualitative and quantitative composition, and thus, the quality of the same. Therefore, are very useful for the development of a new product or the improvement of these. To the problem which faced the present project, develop an artisanal product, tomato puree, with the same properties as the best-selling product, in order to meet the expectations proposed by the main purchaser of this product to the producers of fresh tomatoes in the region. It is as well, which was prepared tomato puree in an artisanal way in response to the national regulations in force for the development and analysis of this product (NMX-F-033-1982). The trademark has 10 Brix degree and 0.088 mg/mL of carbohydrates. In the process of preparing were measuring these variables to equalize because affect significantly the flavor and texture. At the conclusion of the process was determined to the two products as indicated by the regulations are carried out in triplicate: Brix degree, moisture, ashes, titratable acidity, pectin, carbohydrates and proteins. The results for each of the studies were 10 Brix degree in both product; the artisanal tomato puree: moisture 84.26 %, ashes 8.71 g, 0.07164 titratable acidity, pectin 0.2289 g, carbohydrates 0.083 mg/mL and total nitrogen 19.89 %. And in the commercial tomato puree: 89.09 % moisture, ash 4.79 g, 0.07113 titratable acidity, 0.1455 g pectin, 0.088 mg/mL total carbohydrate and nitrogen 10.5 %. The results are satisfactory, the tomato puree hand-crafted equals the values of the commercial product and serves national regulations set for this product.

Keywords: Bromatological analysis; tomato puree; artisanal product.

RESUMEN
Los análisis bromatológicos en los alimentos son de gran importancia, ya que con ellos se puede conocer la composición cualitativa, cuantitativa y por ende la calidad de los mismos. Y por ende, son de gran utilidad para la elaboración de un nuevo producto o bien la mejora del mismo. Problemática a la cual se enfrentó el presente proyecto, elaborar un producto artesanal, puré de tomate, con las mismas propiedades que el producto de mayor venta en la región, a fin de cumplir las expectativas propuestas por el principal comprador de este producto a los productores de tomate fresco de la región. Es así, que se elaboró puré de tomate de manera artesanal atendiendo la normatividad nacional vigente para la elaboración y análisis de este producto (NMX-F-033-1982). La marca comercial tiene 10°Brix y 0.88 mg/mL de hidratos de carbono, por lo que en el proceso de elaboración se estuvieron midiendo estas

variables para igualarlas ya que afectan apreciablemente el sabor y textura. Al concluir el proceso se le determinó a los dos productos y como india la normativa por triplicado: grados Brix, humedad, cenizas, acidez titulable, pectina, carbohidratos y proteínas. Los resultados para cada uno de los estudios fueron 10 °Brix en ambos producto; el puré artesanal: humedad 84.26%, cenizas 8.71 g, 0.07164 acidez titulable, pectina 0.2289 g, carbohidratos 0.83 mg/mL y nitrógeno total 19.89 % y el puré comercial: 89.09% humedad, cenizas 4.79 g, 0.07113 acidez titulable, 0.1455 g pectina, 0.88 mg/mL carbohidratos y nitrógeno total 10.5 % . Los resultados fueron satisfactorios, el puré de tomate artesanal igualó los valores del comercial y cumplió con la normativa nacional para este producto.

Palabras Clave: Análisis bromatológicos; puré de tomate; producto artesanal.

INTRODUCCIÓN

El Altiplano Potosino es una región productora de tomate, su máxima producción se da en los meses de Mayo a Agosto, a pesar de tener una alta producción de esta hortaliza no toda es aprovechada, y gran parte de las cosechas en la región se utilizan para alimentar ganado o para composta de los mismos terrenos, lo cual conlleva a pérdidas económicas para los productores, debido a esto se están buscando alternativas para aprovechar el excedente que se genera año con año.

El tomate es de las frutas con mayor versatilidad ya que puede procesarse en diferentes formas tales como jugos, mermeladas, salsas, pastas, cátsup y puré, siendo el puré el objeto de estudio, debido a su demanda en locales de pizzerías de la región. En el diseño de nuevos productos es importante su calidad para que así puedan competir con marcas reconocidas, una manera de verificarse esta son los análisis bromatológicos, ya que con ellos se puede caracterizar de manera cualitativa, cuantitativa y de forma confiable las cualidades principales del nuevo producto, y por tanto estar dentro de los estándares de calidad de las principales marcas comerciales. Se realizó una comparación de las principales características bromatológicas entre un puré comercial y uno elaborado de manera artesanal con el objetivo de igualar la calidad del puré artesanal con la del comercial y cumplir con la normativa nacional vigente para este giro.

METODOLOGÍA

Muestras. Para el presente trabajo se manejaron dos tipos de muestra, puré de tomate comercial y puré de tomate elaborado de manera artesanal. El puré comercial fue adquirido en un mercado local y fue seleccionado por ser la marca de preferencia en la región, al momento de hacer los análisis se homogeneizó y se guardó en frascos de 125 ml, se mantuvo en refrigeración a 4 °C para su posterior análisis, en cuanto al puré artesanal, se realizó de acuerdo a la norma NMX-F-033-1982. La cual establece las especificaciones en cuanto a materia prima y elaboración del producto, una vez concluida la elaboración del producto, se procedió a envasado en frascos de vidrio de 125 ml los cuales fueron almacenados en refrigeración a 4 °C.

Sólidos solubles totales (SST). El porcentaje de SST se determinó utilizando un refractómetro digital ATAGO modelo PAL 1 el cual fue calibrado con agua destilada siguiendo las especificaciones del modelo, el cual tiene medidor de temperatura. En el receptor se colocaron dos gotas de puré y se procedió con la

lectura. Para dicho análisis no fue necesario corregir los resultados debido a que esto lo realiza el equipo de forma automática.

Humedad. El análisis se realizó en una termobalanza marca OHAUS modelo MB45. En la cual se colocaron 5 g de muestra a 90°C por 90 minutos [1].

Pectina. Se realizó bajo la norma NMX-F-347-S-1980 [2], el proceso consistió en pesar 50 g y llevar a ebullición durante una hora con 400 mL de agua destilada, manteniendo el volumen constante, una vez terminado este proceso se filtró con papel Whatman No. 4. Se tomaron alícuotas de 100 mL de la solución anterior, se adicionaron 100 mL de agua destilada y 10 mL de NaOH 1.0 N, esta solución se dejó en reposo por una noche, se adicionaron 50 mL de $C_2H_4O_2$ 1.0 N con agitación, pasados los 5 min recomendados por la norma, se le añadieron 25 mL de $CaCl_2$ 1N con agitación constante, y se mantuvo en reposo 1 hora. Para finalizar, se filtró en caliente utilizando papel filtro Whatman No. 41 hasta eliminar los restos de cloruro, lo cual se verificó utilizando solución de $AgNO_3$, una vez concluido el filtrado se colocó el papel filtro en horno de secado DHG-9145 a 105°C. Debido a esto se aseguró el peso constante del papel antes de ser utilizado.

Cenizas. Este análisis se realizó bajo la norma NMX-F-066-S-1978 [3] la cual establece este procedimiento, primero se procedió a pesar los crisoles, y posteriormente colocarlos en la estufa a 115 °C por una hora para asegurar su peso contante, después se colocaron 5g de muestra y se introdujo a una mufla marca LabTech a 500 °C por 6 h.

Carbohidratos. Se realizó utilizando el método fenol-sulfúrico (Dubois et al. 1956), Este método se fundamenta en la sensibilidad de los carbohidratos a ácidos fuertes y altas temperaturas. La forma en que se lleva a cabo la reacción no es estequiometria y por lo tanto depende de la estructura del azúcar, por lo cual se realiza una curva patrón.

Para la obtención de la curva patrón se preparó una solución estándar de glucosa de 100 ppm de la cual se tomaron alícuotas de 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 y 0.1 ml y se colocaron en tubos de ensayo y fueron completadas con agua a 1 mL, se adicionaron 0.6 mL de C_6H_6O y 3.6 mL de H_2SO_4 se dejó reaccionar durante 20 minutos antes de leer su absorbancia en el espectrofotómetro a 480 nm. La muestra se trató de la misma manera.

Acidez como ácido cítrico. Se determinó con la norma NMX-FF-011-1982 [4] antes de iniciar la titulación se calibró el potenciómetro Marca Sev usando reguladores de pH conocido. Se transfirió por medio de una pipeta volumétrica a un vaso de precipitados 50 mL de muestra con agitación y se tituló con NaOH 0.1 M a través de una bureta (±0.05 mL) hasta ajustar un pH de 8.1.

Proteínas. Para hacer este análisis se empleó la norma NMX-F068-S-1980 [5], utilizando el destilador micro-Kjeldahl marca Sev. En el tubo de digestión se agregó 0.1 g de muestra, 1g de catalizador, 3 perlas de ebullicion y 25 mL de H_2SO_4, se colocó en el digestor aumentando gradualmente la temperatura hasta que la solución se tornó transparente, una vez terminada la reacción el tubo se acopló a un sistema de destilación y fue titulado con 50 mL de NaOH. El destilado fue colectado en un matraz con 50 mL de H_3BO_3 y 3 gotas de indicador *Shiro Tashiro* hasta que la solución cambió de color de violeta a verde claro, para después ser titulada con HCl 0.1 N.

RESULTADOS

Los cálculos se realizaron de acuerdo a las indicaciones de cada método, utilizando una hoja de Excel y las ecuaciones estadísticas de la misma para calcular promedio y desviación estándar, esto se realizó para las muestras de puré de tomate artesanal y puré de tomate comercial.

Los resultados para cada uno de los estudios fueron 10 °Brix en ambos producto, en la siguiente tabla se muestran los resultados para cada producto y sus determinaciones.

Tabla 1. Resultados para cada producto y sus determinaciones

Determinaciones	Puré comercial	Puré artesanal
SST, %	10 ± 0.11	10 ± 0.25
Humedad, %	89,09 ± 0.63	84,25 ± 0.21
Pectina, g	0,14 ± 0.03	0,22 ± 0.1
Cenizas, g	4,58 ± 0.56	8,71 ± 1.69
Carbohidratos mg/ml	0,088 ± 0.032	0,083 ± 0.022
Acidez como ácido cítrico, %	0,07 ± 0.00035	0,07 ± 0.00035
Proteínas, %	10,50 ± 0.64	19,89 ± 2.45

DISCUSIONES

Los cálculos arrojaron que ambos productos tienen un alto contenido de humedad debido a que el agua es el principal componente en la estructura de esta tipo de hortalizas. Para el puré de tomate artesanal se extrajo una mayor cantidad de pectina lo cual se esperaba debido a la coloración del producto terminado. La cantidad de cenizas en el puré artesanal sugiere una mayor cantidad de minerales y esto es debido a que no es un producto industrializado, por lo cual se puede afirmar que se mantuvieron en mayor medida sus propiedades naturales. En el caso de los carbohidratos el puré comercial obtuvo una mayor concentración, lo cual era de esperarse, ya que al ser procesado se le adicionan sustancias y/o aditivos para conservación a base de azúcares. En la determinación de acidez titulable, se observa que los dos tuvieron la misma acidez, ya que el término de la elaboración del puré artesanal y al destapar el puré comercial inmediatamente se les midió la acidez mediante potenciómetro y los dos tuvieron prácticamente la misma acidez, por lo cual fue de esperarse que mediante este método se tuvieran los mismos valores. La diferencia de proteínas en el puré artesanal con respecto al comercial fue considerable, llegando a ser prácticamente el doble, comprobando así que al no ser procesado de una manera tan rigurosa estas se conservaron de mejor manera.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos, se logró igualar las características del puré comercial y aunado a esto se el puré artesanal cumplió con los parámetros establecidos por la normativa nacional, debido al porcentaje de SST el producto artesanal puede denominarse como puré de tomate, ambas muestras cumplieron con la normativa vigente.

AGRADECIMIENTOS

Al Fondo de Apoyo a la Investigación (FAI) de la Universidad Autónoma de San Luís Potosí, convenio C15-FAI-04-25.25.

REFERENCIAS

[1] Dirección nacional de normas (México). Alimentos - determinación de humedad en productos alimenticios. NMX-F-83-198. México, D. F., 1986. 5 p.

[2] Dirección nacional de normas (México). Frutas y derivados. Determinación de pectina. Fruits and derivatives. Determination of pectine. NMX-F-347-S-1980. México, D. F., 1980. 3 p.

[3] Dirección nacional de normas (México). Determinación de cenizas en alimentos. Foodstuff determination of ashes. NMX-F-066-S-1978. México, D. F., 1978. 2 p.

[4] Dirección nacional de normas (México). Productos alimenticios no industrializados, para uso humano. Fruta fresca. Determinación de acidez titulable. Método de titulación. Non industrialized food products for human use. Fresh fruit. Determination of titrable acidity. titration method. NMX-FF-011-1982. México, D. F., 1982. 3 p.

[5] Dirección nacional de normas (México). Alimentos. Determinación de proteínas. Foods. Determination of proteins. NMX-F-068-S-1980. México, D. F., 1980. 3 p.

BROMATOLOGY STUDY OF THE RAW SPECIE AND ORGANIC WASTE OF ADULT INSECT *Ulomoides dermestoides*

(Estudio bromatológico de la especie en bruto y del desecho orgánico del insecto adulto *Ulomoides dermestoides*)

Vania Montserrat Salazar Camarillo[a*], Sandra Fabiola Velasco Ramírez[a], Ana Cristina Ramírez Anguiano[a], Lizet Yadira Rosales Rivera[b], Sánchez-Peña María Judith[a], Luis Javier González Ortiz[a], José Luis Navarrete Heredia[c], José de Jesús Luna Díaz[a+]

[a] Departamento de Química, Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Universidad de Guadalajara, Blvd. Marcelino García Barragán 1421, 44430 Guadalajara, Jalisco, México
[b] Instituto de Terapéutica Experimental y Clínica; Departamento de Fisiología, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara, Sierra Mojada 950, Colonia Independencia, CP 44340, Guadalajara, Jalisco, México.
[d] Departamento de Botánica y Zoología, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara, Camino Ramón Padilla Sánchez 2100, Nextipac, 44600 Zapopan, Jalisco, México

* Autor que presentó.
+ Autor para correspondencia: pepechuy_luna@hotmail.com

Área de conocimiento: Q. Alimentos.

ABSTRACT
Edible insects and their products have long been used as food or medication by ethnic groups in Asia, Africa and Latin America; this practice is known as “Entomophagy”. It is well known that the proportion of food from animal origin should be less than those of vegetable origin, since they have a higher percentage of fats like cholesterol and saturated fatty acids, that are equivalents to a high caloric value and this increase the risk of developing dyslipidemia and therefore cardiovascular disease; so insects can be the ideal food source to replace the usual conventional foods of animal origin. Insects are rich in minerals, vitamins and essential amino acids and they could also be the moderator needed against food shortages and malnutrition present in the world. *Ulomoides dermestoides* is a beetle of the family *Tenebrionidae*, commonly known as Chinese beetles, that feeds on grains, and is used by folk medicine as an alternative therapy; however few scientific studies confirm these uses, and most of them have focused on the biology and culture method. The aim of this study was to determine the nutritional value of the adult insect and organic waste. Bromatological content was analyzed by a proximate analysis technique, a general or physicochemical test that determines the basic nutrients. The comparative results between the adult insect, organic waste and food substrate indicates that the adult insect and waste contains a high amount of protein, the adult insect has a significant value for fiber and has no free nitrogen extract, the food substrate fulfills the nutritional contribution to the diet and the waste has a higher mineral content. We conclude that the adult insect and waste are suitable as a source of food, because their composition in proteins is comparable to red meat or any other edible insect.

Keywords: *Ulomoides dermestoides*; waste, bromatology; protein.

RESUMEN
Los insectos comestibles y sus productos han sido utilizados como alimento o medicamento por grupos étnicos de Asia, África y América Latina; esta práctica se conoce como "entomofagia". Se conoce que la proporción de los alimentos de origen animal debe ser inferior a los de origen vegetal, ya que tienen un mayor porcentaje de grasa como el colesterol y ácidos grasos saturados, que son equivalentes a un alto valor calórico y esto aumenta el riesgo del desarrollo de dislipidemia y enfermedades cardiovasculares, por lo tanto; los insectos pueden ser la fuente de alimento ideal para reemplazar los alimentos convencionales de origen animal. Los insectos son ricos en minerales, vitaminas y aminoácidos esenciales, esto podría ser el moderador necesario contra la escasez de alimentos y la desnutrición presente en el mundo. El *Ulomoides dermestoides* es un escarabajo de la familia Tenebrionidae, conocido comúnmente como escarabajo chino, se alimenta de granos, y es utilizado en la medicina popular como una terapia alternativa; sin embargo, pocos estudios científicos confirman estos usos, y la mayoría de ellos se han centrado en su biología y su cultura. El objetivo de este estudio fue determinar el valor nutricional del insecto adulto, el sustrato alimenticio y su desecho orgánico. Se determinó el valor bromatológico, el cual se analizó mediante la técnica de análisis proximal, prueba general o físico-química que determina los nutrientes básicos. Los resultados comparativos entre el insecto adulto, desecho orgánico y sustrato alimenticio indica que el insecto adulto y su desecho contiene una alta cantidad de proteínas; el insecto adulto tiene un valor significativo para la fibra y no tiene extracto libre de nitrógeno, el sustrato de alimenticio cumple con el aporte nutricional a la dieta del insecto y el desecho tiene un contenido mineral superior. Llegamos a la conclusión de que el insecto adulto y el desecho orgánico, son adecuados como una fuente de alimento, porque la composición en proteínas es comparable con la carne roja o cualquier otro insecto comestible.

Palabras Clave: *Ulomoides dermestoides*; desecho, bromatológico; proteína.

INTRODUCCIÓN
Los insectos son uno de los grupos animales que más tiempo llevan en el medio terrestre desde hace varios cientos de millones de años, ya sabemos de su adaptación a los cambios ocurridos en el planeta con o sin la intervención del hombre, y de su gran resistencia ecológica. Éstos nos han otorgado a los seres humanos múltiples beneficios (alimento, ropa, comida, medicina, transformación de desechos orgánicos, etc.). [1 ,2]
Dentro de los alimentos de origen animal se encuentran los insectos, el ingerir insectos y sus derivados se denomina Entomofagia. La Entomofagia se practica en muchos países del mundo, principalmente en las regiones de Asia, África y América Latina. Pueden ser la fuente ideal de alimento para suplantar aquellos a los que estamos acostumbrados (alimentos convencionales). Por lo regular, son ricos en minerales, vitaminas y aminoácidos esenciales como la lisina. Además, podrían ser el moderador necesario contra la falta de alimentos y la desnutrición, presentes en el mundo. [2, 3]
El contenido proteico de un insecto, considerando su peso seco, equivale casi al 75%, mientras que la carne vacuna, en las mismas condiciones, contiene sólo el 43% de proteínas. Los insectos aportan nutrientes de alta calidad en comparación con el pescado. Los insectos son especialmente importantes

como suplemento para los niños desnutridos porque la mayor parte de las especies de insectos contienen niveles elevados de ácidos grasos (comparables con el pescado). También son ricos en fibra y micronutrientes como cobre, hierro, magnesio, fósforo, manganeso, selenio, zinc. En la Tabla 1, se muestran algunos insectos comestibles y su valor bromatológico. [4, 5, 6, 7]

Tabla 1.- Valor bromatológico de algunos insectos comestibles (g/100 g base seca). [5]

Orden	Nombre	%Prot.	%Grasas	%Cenizas	%Fibra	%ELN
Orthoptera	Langostas	61.1	17	4.6	10	7
	Chapulín	71.35	6.52	2.41	1.58	8.11
Hemíptera	Jumiles	50.38	28.2	1.75	19.64	0.001
Lepidóptera	Gusano rojo de maguey	32.16	56.82	2.76	5.61	2.64
Díptera	Poxi	35.81	5.8	31.12	22	5.18
Hymenoptera	Escamol	41.61	36.21	2.4	2.1	5.28
	Hormiga chicatana	34.42	34.02	4	10.8	16.12
	Abeja	28.95	41.25	3.14	6.2	20.43
	Avispa	57.73	19.92	0.71	1.78	20.56

El *U. dermestoides* es un coleóptero que pertenece a la familia Tenebrionidae, comúnmente reconocidos como escarabajos oscuros, de hábitos fitófagos, que se alimenta de granos como el maní, el maíz, el sorgo, el arroz, la soya. Muchas culturas en el mundo utilizan insectos de la familia Tenebroide como recursos Nutracéuticos (alimento o parte de un alimento que proporciona beneficios para la salud, incluyendo la prevención y/o tratamiento de enfermedades). El *U. dermestoides,* se consume vivo como terapia alternativa para el asma bronquial, artritis reumatoide, diabetes mellitus, inflamaciones, VIH y diferentes tipos de cáncer. Pocos estudios científicos confirman esta terapia, debido a que la mayoría se han enfocado en su biología y método de cultivo. [4, 8, 9]

METODOLOGÍA

Este estudio se llevó acabo en el laboratorio de Análisis Químico Cualitativo. Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías (CUCEI). Universidad de Guadalajara.

La población de *U. dermestoides* se obtuvo de una especie taxonómicamente identificada del reservorio del Centro Universitario de Ciencias Biológicas Agropecuarias (CUCBA), Departamento de Botánica y Zoología por el Dr. José Luis Navarrete Heredia. Las crías se depositaron en un envase de plástico y se criaron a una temperatura de 25-30°C, el estado adulto del insecto se separó en diferentes depósitos. La alimentación constó de una mezcla de centeno y manzana.

La obtención del desecho orgánico del insecto *U. dermestoides:* se realizó a partir de adultos de *U. dermestoides* de aproximadamente 36 semanas de edad. El desecho se recolectó y se cernió para evitar la presencia de residuos alimenticios y se refrigero a 5 °C.

Para determinar el valor bromatológico del insecto adulto, desecho orgánico y sustrato alimenticio, se realizó un análisis proximal, conformado por análisis de: humedad, cenizas, extracto etéreo, proteínas, extracto libre de nitrógeno. [10, 11, 12]

Determinación de humedad (método gravimétrico y volumétrico o Bidwell-Sterling): el método gravimétrico está basado en la pérdida de peso debido a la evaporación de agua en el punto de

ebullición o temperaturas cercanas a éste, la pérdida de peso se mide analíticamente y se reporta como humedad.

En el método volumétrico se midió el volumen de agua liberada por la muestra durante su destilación continua junto con un disolvente inmiscible, de densidad menor el agua y de alto punto de ebullición. El agua se recogió en un colector con una sección graduada en la que se separó del disolvente y se cuantifico. [10, 11

Determinación de cenizas (método gravimétrico): las cenizas de un alimento es el residuo inorgánico que queda después de quemar o calcinar la materia orgánica y representa la porción mineral. El material inorgánico se determinó por calcinación a 550°C, donde el agua se pierde y los constituyentes orgánicos se queman en forma de dióxido de carbono. Los minerales permanecen en el residuo. [11, 12]

Determinación de extracto etéreo (método Soxhlet): el contenido de "grasa" o "extracto etéreo" son aquellas sustancias de naturaleza lipídica, que pueden ser extraídos por disolventes no polares, como éter etílico y hexano. Incluye lípidos simples (esteroles y grasas neutras), lípidos compuestos (lecitina, fosfolípidos, glucolípidos), vitaminas liposolubles (A, D, E, y K), pigmentos liposolubles (clorofila y carotenoides) y otros compuestos solubles en el solvente. La determinación se realizó por extracción a partir de una muestra seca con una fracción de hexano. [10, 11, 12]

Determinación de proteínas (método Kjeldahl): el método propiamente analiza nitrógeno orgánico de aminoácidos, aminas y amidas presentes en el alimento. Se basa en la combustión de la muestra por calentamiento con ácido sulfúrico en presencia de catalizadores (Selenio y Sulfato de Potasio o Zinc) para reducir el nitrógeno orgánico de la muestra hasta amoníaco, el cual queda en solución en forma de Sulfato de Amonio (primera etapa o digestión). El digerido se alcaliniza con Hidróxido de Sodio (segunda etapa o alcalinización) y se destila directamente para desprender el amoníaco (tercera etapa o destilación), el cual es recibido en un ácido débil (cuarta etapa o recepción) y finalmente, se titulan los aniones formados en la recepción basados en reacciones de neutralización (quinta etapa o titulación). El resultado representa el contenido de proteína cruda del alimento. Ya que el nitrógeno también proviene de componentes no proteicos, al final del proceso se usó un factor de conversión de nitrógeno a proteínas de 6.25. [10, 11, 12]

Determinación de fibra (método de Kennedy): la fibra es el residuo orgánico no nitrogenado que representa a la fracción de carbohidratos que resiste la digestión alternada de ácidos y álcalis. La "fibra cruda" consiste principalmente en celulosa, lignina, hemicelulosa y quitina. Para determinarla se usó el método de Kennedy, que consiste en someter a la muestra a una digestión con ácidos y álcalis, que actuarán sobre todos los compuestos solubles, dejando como residuo a la fibra cruda. [11, 12]

Carbohidratos y vitaminas hidrosolubles: los carbohidratos son representados como el extracto libre de nitrógeno o ELN o NIFEXT. El ELN se obtuvo por diferencia de los resultados de los restos de los análisis e indica la presencia de azúcares, almidón, pigmentos y vitaminas solubles en agua, y otras sustancias de naturaleza carbohidratada. [11, 12]

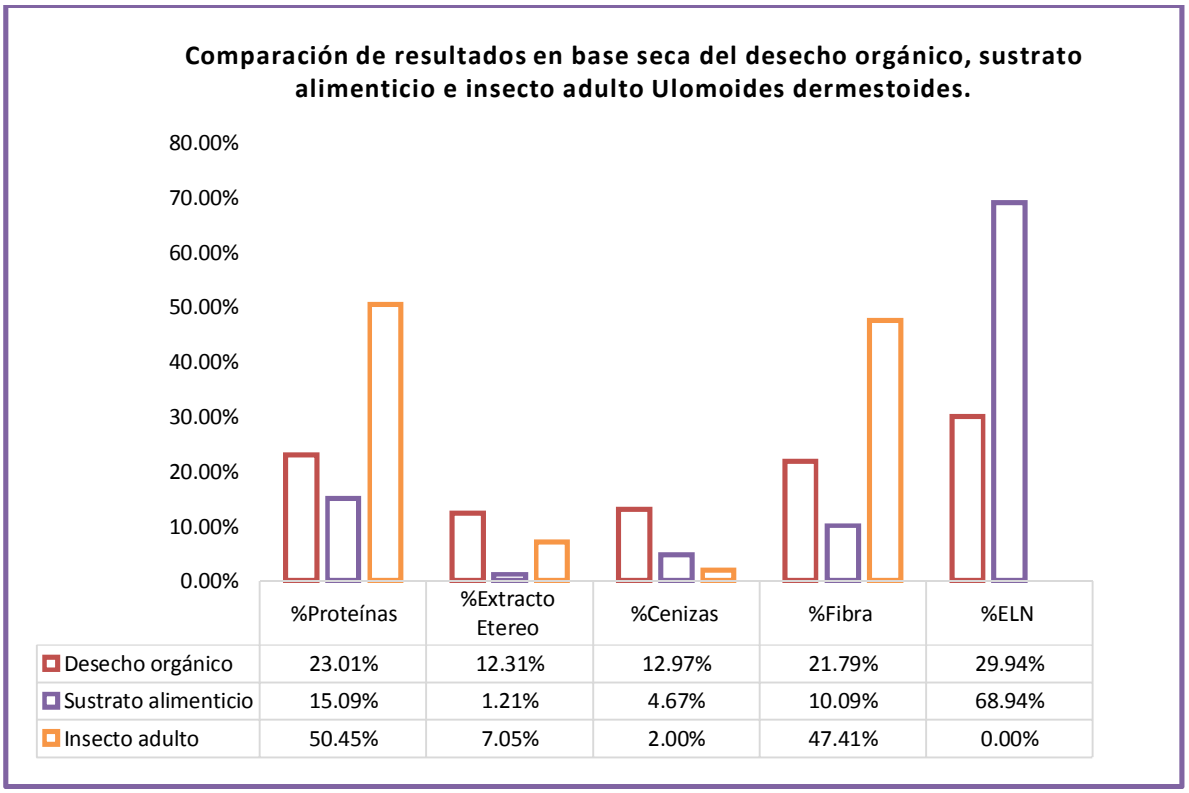
RESULTADOS

En la Figura 1, se muestra la comparación de los resultados en base seca de los análisis realizados en las muestras de insecto adulto *U. dermestoides,* desecho orgánico y sustrato alimenticio.

El desecho orgánico tiene un valor bromatológico, comparable con un alimento tradicional, esto puede estar relacionado con la alimentación del insecto, el sustrato alimenticio le aporta al insecto en su mayoría agua, una baja cantidad de proteínas, minerales y carbohidratos necesarios.

Es importante resaltar la alta cantidad de proteínas y los escasos carbohidratos encontrados en el insecto adulto. En el desecho orgánico los resultados obtenido pueden compararse con alimento

convencional, esto hace que podamos considerar al desecho como una suplemento alimenticio en un futuro.



	%Proteínas	%Extracto Etereo	%Cenizas	%Fibra	%ELN
Desecho orgánico	23.01%	12.31%	12.97%	21.79%	29.94%
Sustrato alimenticio	15.09%	1.21%	4.67%	10.09%	68.94%
Insecto adulto	50.45%	7.05%	2.00%	47.41%	0.00%

Figura 1.- Grafica de resultados comparativos del análisis proximal realizado al desecho orgánico, sustrato alimenticio e insecto adulto *U. dermestoides*.

DISCUSIONES

El contenido de proteínas del sustrato alimenticio es bajo esto se debe a que el sustrato es una mezcla de manzana y centeno, nos indica que la ingesta de proteínas del insecto es menor, esto quiere decir que dentro de su organismo se está metabolizando o realizando una serie de síntesis que se deben investigar más a fondo para saber porque produce aproximadamente el doble de proteínas de las que consume y esto se ve reflejado en el desecho, debido a que podemos ver que secreta una cantidad considerablemente superior a la del sustrato.

La comparación de los resultados del análisis de extracto etéreo, lo que más resalta es ver que el desecho tiene una alta cantidad de grasa en comparación con el sustrato alimenticio que el insecto ingiere, parte del cuerpo del insecto contiene grasa pero el aporte más importante de grasa al insecto es proporcionado por lo que come, para comprobar cómo es que el insecto desecha una cantidad mayor de grasa a la que ingiere, esto lo podríamos hacer realizando una serie de estudios más específicos en el desecho y el insecto adulto.

La comparación del contenido de cenizas y/o minerales tienen una sucesión similar a las comparaciones anteriores donde el desecho orgánico es mayor que el sustrato alimenticio y que el insecto adulto, el resultado del desecho es mayor debido a que el insecto desecha los minerales que no necesita o su

cuerpo no absorbió; los minerales en el sustrato se deben en gran medida al centeno que tiene una cantidad de minerales de 0.86% según la FAO y la OMS más el aporte de minerales que le da la manzana (0.18%) aunque este sea más bajo contribuye al resultado. El resultado de cenizas en el insecto está dentro del rango de la referencia de Luna Díaz (2012), y dentro del rango de las referencias mencionadas anteriormente para cada muestra. [5]

En el análisis de fibra bruta el insecto adulto es el que presenta un mayor resultado esto puede estar relacionado con la quitina que contiene en el cuerpo, la fibra del sustrato es menor debido a que este es más digerible y se absorbe en el cuerpo del insecto La alta cantidad de fibra en el desecho es algo que aún se debe investigar más afondo.

La comparación de ELN nos da una idea de lo que puede estar sucediendo en el organismo del insecto, el sustrato alimenticio tiene una alta cantidad de carbohidratos debido a que este está compuesto por centeno el cual contiene 68.74% y manzana que contiene 13.37% de carbohidratos según estudios realizados por la FAO; en el desecho podemos encontrar cierta cantidad de los carbohidratos que forman parte del sustrato alimenticio y este a su vez contienen una cantidad de fibra (22.6%) que hace que se eliminen del organismo del insecto, este resultado comparado con la carne de cerdo magra es muy alto, pero como se mencionó anteriormente aún se tienen muy pocos estudios de la composición principal del desecho en insectos comestibles. El resultado de ELN en el insecto adulto es cero esto nos indica que este utiliza o consume estos carbohidratos como fuente de energía para las actividades que realiza y desecha lo que ya no necesita o no son digeribles, con base en el estudio realizado por Luna Díaz (2012) este es el único insecto que reporta una cantidad de cero en el análisis de ELN. [5, 13, 14]

CONCLUSIONES

Con este trabajo de investigación y experimentación se demostró que el insecto adulto *U. dermestoides* y su desecho orgánico son una fuente viable para la alimentación, pues contienen de manera significativa los nutrientes necesarios para los humanos. Las proteínas se encontraron como uno de los nutrientes mayoritarios en el desecho orgánico del insecto, considerándolo como un suplemento proteico a futuro. El contenido de humedad en el desecho orgánico del insecto fue bajo y esto beneficia la reducción del desarrollo de hongos y bacterias en el alimento. La investigación realizada fue general, únicamente abarco los grupos básicos de nutrición; es necesario particularizar estos parámetros con estudios más avanzados y conocer a fondo cada componente nutritivo que pueda contener el insecto *U. dermestoides* y su desecho orgánico, y no solamente en un enfoque analítico o nutricional, también en un enfoque bioquímico y económico.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Guadalajara (UDG).

REFERENCIAS

[1] Ramos-elorduy, J., & Montesinos Viejo, L. J. (2007). Los insectos como alimento humano : Breve ensayo sobre la entomofagia, con especial referencia a México Insects as human food : Short essay on entomophagy , with special reference to Mexico. Bol. R. Soc. Esp. Hist. Nat. Sec. Biol, 102, 61–84.

[2] Halloran, A., & Vantomme, P. (n.d.). La contribución de los insectos en la seguridad alimentaria, los medios de vida y el medio ambiente, 4. Disponible en: http://www.fao.org/docrep/018/i3264s/i3264s00.pdf

[3] Sustentable, E. P., Autónoma, U., Entomofagia, L., Carlos, F., González, V., Carlos, F., & González, V. (2009). Entomophagy in Mexico : Some cultural aspects.

[4] Delfín, H., Virginia, G., Ramírez, M., Manrique, P., Reyes, E., David, N., & Hernández, C. (n.d.). Insectos, 226–228.

[5] Luna Díaz José de Jesús. 2012. Análisis bromatológico comparativo entre insectos y carnes como fuente de nutrición humana. [Tesis]. [México (Jalisco)]. Universidad de Guadalajara. p. 64.

[6] Mendoza, D. L., & Saavedra, S. (2013). Chemical composition and anti-irritant capacity of whole body extracts of Ulomoides dermestoides (Coleoptera, Tenebridae). *Revista de La Facultad de Quimica Farmacéutica*, *20*, 41–48.

[7] Arango Gutiérrez, G. P., & Gutiérrez, G. P. A. (2005). Los insectos: una materia prima alimenticia promisoria contra la hambruna. *Revista Lasallista de Investigación*, *2*(1), 33–37.

[8] Sustentable, E. P., Autónoma, U., Entomofagia, L., Carlos, F., González, V., Carlos, F., & González, V. (2009). Entomophagy in Mexico : Some cultural aspects.

[9] Ramos-elorduy, J., & Montesinos Viejo, L. J. (2007). Los insectos como alimento humano : Breve ensayo sobre la entomofagia , con especial referencia a México Insects as human food : Short essay on entomophagy , with special reference to Mexico. *Bol. R. Soc. Esp. Hist. Nat. Sec. Biol*, *102*, 61–84.

[10]Gallegos Castillo S, López Martín del Campo ME, Abascal Johnson MMS. (2009). Métodos de análisis para alimentos. México, Jalisco: Amate. p. 15 – 31.

[11]Kirk RS, Sawyer R, Egan H. 2005. Composición y análisis de alimento de Pearson. México, D.F: Continental. p. 9 – 43.

[12]Zumbado Fernández H. 2008. Análisis químico de los alimentos: métodos clásicos. Cuba, La Habana: Universitaria. P 174-206.

[13]Fernández, E., & Galván, A. (2006). Métodos para la cuantificación de proteínas. *Departamento de Bioquímica*, 1–7. Retrieved from http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Métodos+para+la+cuantificación+de+proteínas#1

[14]El sorgo y el mijo en la nutrición humana (DEPÓSITO DE DOCUMENTOS DE LA FAO, Producido por: Departamento de Agricultura y Proteccion del Consumidor) [Internet]; [consultado el 15 Junio 2015]. Disponible en: http://www.fao.org/docrep/t0818s/T0818S0b.htm

[15]Uso del maíz en los trópicos (DEPÓSITO DE DOCUMENTOS DE LA FAO, Producido por: Departamento de Agricultura y Proteccion del Consumidor) [Internet]; [consultado el 30 Mayo 2015]. Disponible en: http://www.fao.org/docrep/003/x7650s/x7650s08.htm#TopOfPage

[16] Ramos-elorduy, J. (2012). Insectos comestibles en algunas localidades en la región centro del Estado de México : técnicas de recolección , venta y preparación Edible insects in some locations in Central Region of Mexico State : Collection , techniques , sale and preparation, *19*(2), 123–133.

SKELETAL ASSESSMENT OF RAINBOW TROUT RAISED IN CAPTIVITY FOR IT´S POSSIBLE USE IN DEVELOPING A CATTLE FOOD

(Evaluación del esqueleto de trucha arcoíris criada en cautiverio para su posible uso en la formulación de un alimento para ganado)

Oscar Gómez-Zamora[a*+], Araceli Castañeda-Ovando[a], Elizabeth Contreras-López[a], Javier Añorve-Morga[a], Luis Guillermo González-Olivares[a], Judith Jaimez-Ordaz[a].

[a] Área Académica de Química, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Carr. Pachuca-Tulancingo, km 4.5, C.P. 42184, Mineral de la Reforma, Hgo., México.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: oscar_gomez_zamora@hotmail.com

Área del Conocimiento: Q. Alimentos.

ABSTRACT
The aquaculture industry has increased it´s production in recent years, generating a greater amount of by-products from fish that are not widely used, as in the case of the skeleton, which by its high content of protein and unsaturated fatty acids makes a viable option for it´s use as a food supplement for cattle. Cattle feed is one of the most important factors for optimal growth throughout the animal's life, the food must have an adequate balance of nutrients such as minerals, lipids and proteins, therefore, the food supplementation with an external source of protein and lipid which is recommended for optimal growth. So, the aim of this study was to analyze the skeleton of rainbow trout by physicochemical characterization, fatty acid profile and content of calcium, iron and phosphorus for their potential use in a food supplementation for cattle. The percentages of moisture, ash, fat, protein and fiber skeleton were determined following the official AOAC techniques. The fatty acid profile was done by gas chromatography and finally, the content of iron, calcium and phosphorus were analyzed by ICP. It was found that high percentages of protein (29%), lipids (30 and fatty acids omega 3, 6 and 9 family, make it a good choice for use as a supplement in cattle feed, in addition, the high- minerals (10g of calcium, 0.7g of phosphorus and 0.04g oh iron).

Palabras clave: Esqueleto; trucha arcoíris; ácidos grasos; suplementación.

ABSTRACT
La industria acuícola ha tenido una mayor producción en los últimos años, generando así una cantidad mayor de subproductos provenientes del pescado que no son ampliamente utilizados, tal es el caso del esqueleto, que por su alto contenido en proteínas y ácidos grasos insaturados lo convierte en una opción viable para su utilización como suplemento alimenticio para ganado. La alimentación del ganado es uno de los factores de mayor importancia para lograr un óptimo crecimiento a lo largo de la vida del animal, el alimento debe tener un balance adecuado de nutrientes como minerales, lípidos y proteínas, por ello, que la suplementación del alimento con una fuente externa de proteína y lípidos, que es recomendable para su óptimo crecimiento. Por lo que, el objetivo de este trabajo fue analizar el esqueleto de trucha arcoíris mediante una caracterización fisicoquímica, perfil de ácidos grasos y

contenido de calcio, hierro y fósforo para determinar su potencial uso en la suplementación de un alimento para ganado. Los porcentajes de humedad, cenizas, lípidos, proteínas y fibra del esqueleto se determinaron siguiendo las técnicas oficiales de las AOAC. El perfil de ácidos grasos se realizó por cromatografía de gases y por último, el contenido de hierro, calcio y fósforo se analizaron por ICP. Se encontró que los altos porcentajes de proteína (29%), lípidos (30 y ácidos grasos de la familia omega 3, 6 y 9, lo hacen una buena alternativa para usarlo como un suplemento en alimento para ganado; además, el alto contenido de minerales (10g of calcium, 0.7g of phosphorus and 0.04g oh iron).

Palabras Clave: Esqueleto; trucha arcoíris; ácidos grasos; suplementación.

INTRODUCCIÓN

Las harinas provenientes de los subproductos del pescado son productos químicos de origen natural obtenidos de la pesca, estos subproductos son utilizados en la formación de alimentos balanceados para la nutrición animal, ya sea de productos acuícolas, de aves, de rumiantes y de animales domésticos [1].

Las harinas provenientes del pescado presentan claras conveniencias si las comparamos con las otras harinas de origen vegetal y animal. Entre estas ventajas son el alto contenido de proteína (el cual es más importante la cantidad que la calidad debido a que son capaces de transformar el nitrógeno no proteico en nitrógeno proteico a través de las bacterias presentes en el rumen), el contenido de minerales como calcio y hierro, además del contenido alto contenido lipídico que presenta ácidos grasos de cadena larga, estos nutrientes son de suma importancia para que el animal cumpla con sus necesidades básicas, además de que le permiten mantener una salud adecuada [1,2].

Es importante que los alimentos balanceados que son suministrados a los rumiantes deban contener un alto contenido en carbohidratos, fibra y proteína, así el animal tendrá una vida más sana y esto se verá reflejado tanto en la carne y en sus derivados como la leche, teniendo productos de calidad para el futuro consumidor.

Por ello, la suplementación con harina de esqueleto de trucha arcoíris lo hace una opción viable para obtener proteína y ácidos grasos de una fuente externa, además de que se aprovecha un subproducto de la acuicultura que actualmente no ha sido fuertemente explotado.

METODOLOGÍA

Para realizar el análisis fisicoquímico se utilizó el esqueleto de truchas arcoíris criadas en el municipio de Huasca de Ocampo. El esqueleto, después de ser retirado, se limpió manualmente eliminando los residuos de carne de tamaño mediano y grande. Los residuos más pequeños se separaron sumergiendo el esqueleto en agua a temperatura ambiente (aproximadamente 20°C).

Posteriormente, se trituró en una licuadora Osterizer modelo 450-20 hasta reducir su tamaño y ser introducido en un matraz balón, y conservado en ultracongelación (-70°C), para después eliminar la humedad utilizando una liofilizadora Labconco modelo Freeze dry system/ freezone 4.5 con alto vacío ($100x10^{-3}$ mBar) y una temperatura de -40 ºC.

Finalmente, la muestra se trituró con un molino para granos marca KRUPS modelo GX4100 hasta obtener el menor tamaño de partícula posible y así poder realizar el análisis proximal utilizando los métodos descritos por la AOAC [3].

Determinación de humedad

En charolas de aluminio a peso constante se pesaron, por separado, de 4 a 5 g de muestra y se llevaron a peso constante en una estufa de vacío a 70±1ºC y 100 mmHg de presión.

Determinación de cenizas

En crisoles, a peso constante, se colocaron por separado, de 4 a 5 g de muestra y se incineraron en una parrilla de calentamiento, hasta que la muestra ya no desprendiera humo.

Posteriormente, los crisoles se colocaron en una mufla (Fisher Scientific) a 550ºC hasta obtener un color homogéneo de las cenizas y un peso constante del crisol.

Determinación de grasa cruda

Se tomaron las muestras libres de humedad (se utilizaron las obtenidas del análisis de humedad) y cada una de ellas se colocó en cartuchos de celulosa, después se introdujeron en el compartimiento de extracción de un equipo Soxhlet.

Por otro lado, se colocaron matraces balón (uno por cada muestra), previamente puestos a peso constante, se les adicionaron a cada uno 150 mL de éter petróleo y se dispusieron en la parrilla de calentamiento. Después, se procedió a un calentamiento moderado, hasta la extracción total de la grasa (aproximadamente 5 horas), regulando que el reflujo fuera gota a gota y constante.

Una vez completa la extracción, la mayor parte del solvente se recuperó por evaporación a presión reducida y el resto se eliminó colocando el matraz en una estufa a 65 ºC hasta peso constante.

Determinación de proteína cruda

Se utilizó el método Kjeldahl, que consiste en someter la muestra a tres procedimientos: digestión, destilación y valoración (N: 6.25).

Determinación de ácidos grasos

La determinación de la composición de ácidos grasos se realizó mediante cromatografía de gases utilizando la metodología descrita por Añorve y colaboradores [4].

Determinación de minerales

El procedimiento se basó en el método EPA 3052 [5], con modificaciones para el tipo de muestra (alimento).

RESULTADOS

Caracterización fisicoquímica

En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos del análisis proximal del esqueleto de trucha arcoíris.

Tabla 1 Composición proximal del esqueleto de trucha arcoíris de Huasca de Ocampo, Hgo.

Componente, %	Esqueleto
Humedad	1.67± 0.37
Cenizas	32.57± 0.46
Grasa	30.54± 0.49
Proteína	29.41± 0.47
Fibra	4.32±0.78
ENN*	1.49
Aporte energético, Kcal/100g	415.74

Media ± SD: desviación estándar de 3 réplicas

Contenido de calcio, hierro y fósforo

En estudios acerca de la dieta de rumiantes se ha precisado que estos animales deben consumir Fe, Ca y P, por ello se determinaron de manera cuantitativa el contenido de estos minerales presentes en el esqueleto (Tabla 2).

Tabla 2. Cuantificación de Fe, P y Ca presentes en el esqueleto de trucha arcoíris en mg por cada 100g de muestra

Elemento	mg/100 g
Fe	4.88±0.25
P	750.63±4.21
Ca	10161.40±53.85

Media ± SD: desviación estándar de 3 réplicas

Perfil de ácidos grasos

Además del alto contenido en grasa, el esqueleto de la trucha arcoíris presenta ácidos grasos esenciales, esto se confirma en la tabla 3, donde el perfil muestra ácidos grasos de la familia omega 6 y 3.

Tabla 3. Cuantificación de ácidos grasos presentes en el esqueleto de trucha arcoíris en mg por cada 100 g de muestra.

Ácido graso	mg/100g de muestra
C12:0	66.57±2.56
C14:0	1804.73±9.31
C14:1	3.21±0.34
C15:0	5.84±0.39
C15:1	2.13±0.12
C16:0	26271.76± 65.78
C16:1	867.81±13.05
C17:0	12.91±2.20
C17:1	97.31 ± 4.30
C18:0	5847.40 ± 392.47
C18:1n9	1552.56 ± 1.72
C18:2n6	22.94 ± 1.38
C18:3n3	14.07± 3.22
C20:2	40.54 ± 0.81
C20:3n6	13.84 ± 5.73
C20:4n6 Araquidónico	289.09 ± 1.18
C24:0	30.65 ±1.67
C20:5n3 EPA	25.94 ± 2.73
C24:1	82.10±1.01

Media ± SD: desviación estándar de 3 réplicas

DISCUSIONES

Como se puede observar en la Tabla 1, el contenido de humedad representa el 1.67% del contenido total de la harina, éste es bajo en comparación a lo reportado por la FAO [6], donde mencionan que el contenido de humedad para este tipo de harinas es en promedio de 7.3%, este bajo nivel de humedad puede ser atribuido al proceso de liofilización que se le realizó al esqueleto.

En lo que respecta al porcentaje de cenizas, como se puede observar, es de 32.57% (de los cuales 10% es de calcio, 0.7% de fosforo y 0.04% de hierro) esto es atribuido a que el esqueleto está principalmente constituido por minerales, la FAO[6] reporta que en promedio las harinas de pescado deben contener un 17%, este contenido es menor al experimental, esto puede ser debido a que las harinas de pescado, además del esqueleto, utilizan otros subproductos del pescado como la piel, las vísceras y en ocasiones la cabeza [7].

El contenido de proteína encontrado en el esqueleto es una fuente importante, presenta un promedio de 30%, cumpliendo con las necesidades de proteína de los ovinos [8], estos autores mencionan que para cubrir las necesidades de proteína de los ovinos es necesario suministrar en la dienta de un 14 a un 16%. Además de que el contenido de proteína es más importante que la calidad de ésta, ya que son capaces de transformar el nitrógeno no proteico en nitrógeno proteico a través de las bacterias presentes en el rumen [9].

En cuanto al contenido de fibra y extracto no nitrogenado (ENN) la suma de estos componentes es de 5.81%, este porcentaje es muy bajo para los requerimientos en la dieta de ovinos, dado que deben tener generalmente un 60% de éstos, es por ello que la harina de esqueleto de trucha arcoíris es un suplemento con el que el forraje debe ser enriquecido ya que si se hace un alimento únicamente de esta harina, el animal no podría asimilar los nutrientes de una manera adecuada.

Por último el contenido de lípidos es alto (30%) , este alto contenido se refleja en el contenido de ácidos grasos, haciéndolo una fuente importante de ácidos grasos insaturados como lo son el alfa linolénico, ARA y EPA, estos son muy importantes en la salud de los rumiantes, ya que fortalecen el sistema inmunológico y protege el sistema cardiovascular [1]

CONCLUSIONES

El esqueleto de trucha arcoíris puede ser utilizado en la suplementación de un alimento dirigido a rumiantes, debido a su alto contenido en proteína y la presencia de ácidos grasos de la familia omega 3 y 6.

REFERENCIAS

[1] Zaldívar, L.F. (2002). "Las harinas y aceites de pescado en la alimentación acuícola". En *Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola.* (Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D,Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M. G., Simoes eds.). Cancún, Quintana Roo, México.

[2] Lanuza, F.A. (2000). "Requerimientos de nutrientes, según el estado fisiológico en bovinos de leche", *INIA Remehue 148,1-16.*

[3] AOAC. (2005). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist. (18th ed). Washington:USA .

[4] Añorve, M.J., Castañeda, O.A., Cepeda, S.A., Durant, A.A., Jaimez, O.J., Contreras, L.E., González, O.L. & Rodríguez, R.J. (2015). "Microextraction method of medium and long chain fatty acids from milk", *Food Chemistry 172*, 456–461.

[5] Environmental Protection Agency (EPA). (1996). Method 3052. Microwave assisted acid digestion of siliceous and organically based matrices.

[6]Food and Agriculture Organization (FAO). (2008). Programa de información de especies acuáticas, Oncorhynchus.

[7]Centro Tecnológico Nacional de Conservación de Productos de la Pesca y la Acuacultura. (2012). El aprovechamiento de los subproductos del pescado para la obtención de productos funcionales y bioactivos. Madrid: CECOPESCA

[8] Muñoz, G.F. & Garduño, C.Y. (2010). Manejo de ovinos en el Estado de México "Engorda intensiva". Instituto de investigación y capacitación agropecuaria, acuícola y forestal del Estado de México, Estado de México.

[9] López, Z.J. (2007). Obtención y validación de una dieta balanceada para la engorda de ovinos a partir de harina de bagazo de naranja (Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo): 30.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

CHEMICAL ASSESSMENT BRAN FLOUR BARLEY (*Hordeum vulgare*) WITH POTENTIAL APPLICATION IN THE DEVELOPMENT OF A BAKERY PRODUCT

(Evaluación química de harina de afrecho de cebada (*Hordeum vulgare*) con potencial aplicación en el desarrollo de un producto de panificación)

Carlos Andrés Piedrahita Bermúdez[a*+], María Orfilia Román Morales[a], Laura Cristina Preciado Velásquez[a]

[a] Departamento de Alimentos. Grupo de Investigación en Alimentos Saludables-GIAS. Universidad de Antioquia.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: roki2908@hotmail.com

Área del Conocimiento: Q. Alimentos.

ABSTRACT
In brewing, brewer's spent grain (BSG) is generated after the process of maceration and mash filtering. It represents 85% of the by-products of the beer industry, and is used as animal feed. Its composition varies according to the variety and harvest time of the barley (*Hordeum vulgare*), and the type of technology implemented in beer production. BSG is a lignocellulosic material containing protein and other nutrients. Due to its elevated fiber content the potential use of this by-product as an ingredient in the development of baked dietary products for human consumption was considered. The objective of this research was to evaluate the physicochemical and microbiological properties of BSG for the incorporation of BSG flour as a raw material in baked products. To obtain the flour, wet BSG was subjected to convection drying, grinding, sifting and was packed until its posterior analysis. Chemical characteristics were determined according to AOAC methods and the following results were obtained: humidity (10.06 g/100 g), protein (15.31 g/100 g), ashes (2.68 g/100 g), ethereal extract (4.52 g/100 g), total dietary fiber (54.60 g/100 g), carbohydrates (67.42 g/100 g). In brewing, the use of temperatures between 60ºC and 70ºC during the process of maceration hinders the contamination of BSG, but it could be contaminated during the process of recollection. The counts of total and fecal coliforms, mesophilic microorganisms, molds, and yeast were examined and a good microbiological quality was found. The studied flour is useful for the formulation of baked products. Cookies with an addition of 25 % and 30 % of BSG flour were developed, and they showed to be of good quality.

Keywords: beer, bran, barley, cookies.

RESUMEN
En la elaboración de cerveza después de la maceración y separación del mosto se genera el afrecho que representa un 85% de los subproductos de la industria cervecera y se utiliza para alimentación animal. La composición de éste varía con la variedad y el tiempo de cosecha de la cebada (*Hordeum vulgare*) y la tecnología de elaboración de la cerveza. El afrecho es un material lignocelulósico que contiene proteína y otros nutrientes. Por el alto contenido en fibra se consideró el uso potencial de éste como ingrediente en el desarrollo de productos alimenticios horneados para consumo humano. El objetivo de este trabajo

fué evaluar las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas del afrecho de cerveza para la incorporación de harina de afrecho como materia prima en productos de panificación. Para la obtención de la harina el afrecho húmedo se sometió a secado por convección y molienda, tamizado y empacado hasta su posterior análisis. Las características químicas se determinaron según métodos AOAC y se obtuvieron los siguientes resultados: humedad (10,06g/100g), proteína (15,31 g/100g), cenizas (2,68 g/100g), extracto etéreo(4,52 g/100g), fibra dietaria total (54,60 g/100g), carbohidratos (67,42 g/100g). En el proceso de maceración en la elaboración de cerveza se utilizan temperaturas entre 60 ºC y 70ºC, lo que dificulta la contaminación del afrecho, pero en el proceso de recolección puede contaminarse; se realizó recuento de coliformes totales y fecales, microorganismos mesófilos, mohos, levaduras y se encontró buena calidad microbiológica. La harina en estudio es útil para formular productos de panadería; se desarrollaron galletas adicionadas de 25% y 30% de harina de afrecho, que presentaron buena calidad.

Palabras Clave: cerveza, afrecho, cebada, galletas.

INTRODUCCIÓN

Hoy día, existe una gran presión política y social para reducir la contaminación procedente de las actividades industriales. Casi todos los países desarrollados y subdesarrollados están tratando de adaptarse a esta realidad mediante la modificación de sus procesos para que sus residuos puedan ser reutilizados [1].

La industria cervecera genera importantes cantidades de residuos procedentes de su actividad industrial como lo son el afrecho, lúpulo y levadura [1], entre estos subproductos, el afrecho, representa hasta el 85% de los residuos totales del proceso de elaboración y corresponde a aproximadamente 20 kg por cada 100 litros de cerveza [2]. Según la American Association of Feed Control Officials (AAFCO), "El residuo seco extraído de la sola Malta de Cebada o mezclada con otros granos cereales o productos de granos resultantes de la manufactura del mosto o de la cerveza" se considera afrecho [3], y "puede contener residuos de lúpulo en cantidades no superiores al 3%" [3], este a su vez representa la fracción sólida residual de malta de cebada [4] que se obtiene después de la maceración y separación del mosto.

La composición de afrecho varía con la diversidad de cebada, el tiempo de cosecha, adjuntos adicionados y la tecnología de infusión [5], sin embargo se reporta en la literatura como valores teóricos un contenido de 31% de peso seco de proteína, 19% de pentosanos, 16% de lignina, almidón y ß-glucanos en un 12%, 9% de celulosa y lípidos además de 4% de ceniza [6], referente a la disponibilidad, se tiene que es homogénea durante todas las épocas del año y su costo tiende a valores bajos o nulos, limitándose por lo tanto a ser usado como base para alimentación animal [1], sin embargo, en la actualidad, se ha incursionado en la explotación del afrecho como materia prima en procesos biotecnológicos como alimento para setas y actinobacteria, [1] o base para tratamientos enzimáticos donde se liberan compuestos de valor añadido, tales como pentosas (xilosa y arabinosa) y ácidos hidroxicinámicos (ácido ferúlico), con usos potenciales en la industria alimentaria [6].

Los alimentos funcionales pueden describirse como productos alimenticios que aportan beneficios saludables específicos, además de los componentes nutricionales básicos. En caso puntual, los

productos de galletería son alimentos de consumo masivo que contienen harinas, azúcar y grasas en su formulación, con variedad de sabores, larga vida útil y permiten la incorporación de alto contenido de fibra [7], por lo tanto se considera una base ideal para ser adicionada con harina de afrecho, subproducto que puede proporcionar altas cantidades de fibra dietaría a bajo costo, contribuyendo a la prevención ciertas enfermedades como cáncer, trastornos gastrointestinales, diabéticos y enfermedad cardíaca coronaria [8].

Algunos componentes que hacen parte de alimentos tradicionales se han asociado con beneficios saludables, pero son pocas las investigaciones donde se soporta con datos experimentales sus efectos fisiológicos. Algunos autores consideran que el futuro alimentario está en el consumo de alimentos saludables. Entre éstos la fibra ocupa un lugar destacado, ya que se ha asociado con la salud intestinal, prevención de cáncer colonrectal, enfermedades cardiovasculares y el mantenimiento del peso [7] Los nutricionistas y diferentes organizaciones sanitarias, incluyendo la OMS respecto al consumo de fibra, fijan una cantidad mínima de 30 g de fibra por persona al día, de la cual al menos un 30% debe ser fibra soluble [7].

METODOLOGIA

Materiales

El afrecho de cerveza fue obtenido de un lote de cerveza tipo hefewiezen, típicas cervezas que incluyen trigo en sus formulaciones, esté fue proporcionado por el Grupo de Investigación de Alimentos Saludables de la Universidad de Antioquia.

Preparación de la muestra

Inmediatamente termino el proceso de maceración en la producción de cerveza, el afrecho fue retirado y para evitar procesos de deterioro microbiano se eliminó parcialmente el agua por medio de prensado en una prensa manual, posteriormente fue llevado a congelación hasta realizar secado en estufa de aire forzado convectivo a 55ºC durante 4 horas.

Análisis microbiológicos de la harina de afrecho de cerveza

Se realizó recuento total de microorganismos mesófilos aeróbios/g, número más probable NMP de coliformes totales/g, NMP de coliformes fecales/g, recuento total de mohos y levaduras/g, detección de *E. coli* [9].

Análisis fisicoquímicos de harina de afrecho de cerveza

Con el fin de caracterizar este subproducto se llevó a cabo análisis fisicoquímicos por triplicado del afrecho de cerveza [7].

- Humedad: AOAC 925,09 estufa de aire
- Cenizas totales: AOAC 923,03
- Proteína: AOAC 991,20
- Extracto etéreo: AOAC 939,05
- Fibra dietaría: AOAC 993.27
- Carbohidratos: AOAC 29,026
- Fibra cruda: AOAC 993.21

Evaluación de propiedades funcionales del afrecho de cerveza

En el laboratorio de Investigación de Alimentos Saludables-GIAS- de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias de la Universidad de Antioquia, se evaluó la capacidad de hinchamiento (CH) y la capacidad de retención de agua (CRA).

Capacidad de hinchamiento (CH): Se pesaron 2 g de cada muestra en una probeta graduada de 100 ml y se midió el volumen ocupado por la harina de afrecho de cerveza (Vo) (mL); se adicionaron 10 ml de agua destilada y se agitó manualmente durante 5 min. Se dejó en reposo durante 24 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se midió el volumen final de las muestras (V1)(mL) La capacidad de hinchamiento (mL/g) se calculó mediante la siguiente fórmula [9]:

$$\mathrm{CH} = \frac{V1 - V0}{peso\ de\ muestra}$$

Capacidad de retención de agua (CRA): En tubos de centrífuga (Centrífuga Universal Rotofix HETT), se pesaron 0,5g de cada muestra (Po) (g), se adicionaron 10 ml de agua destilada y se agitaron manualmente durante 10 minutos; se dejó durante 24 horas a temperatura ambiente; se centrifugó a 3000 r.p.m durante 10 minutos, inmediatamente se retiró el sobrenadante y se pesó el sedimento (P1) (g). La CRA se calculó mediante la siguiente fórmula [9]:

$$CRA = \frac{P1 - P0}{P0}$$

Desarrollo de la formulación para las galletas

El proceso de elaboración de las galletas adicionadas con harina de afrecho de cebada se llevó a cabo en una empresa productora de galletas, de acuerdo con la formulación y metodología empleada por ésta. Se realizaron 2 formulaciones con un 25% (Muestra 1), un 30% (Muestra 3) de afrecho en las galletas de acuerdo a lo establecido por Stojceska y Ainsworth [8] que recomiendan un porcentaje de afrecho menor a 30% en productos de panadería para no afectar de manera significativa la textura del producto, también se realizó una formulación de 50% (Muestra 2) de porcentaje de afrecho con el fin de evaluar el nivel de aceptación de los potenciales consumidores frente a un mayor porcentaje de adición de harina de afrecho. Las muestras fueron almacenadas a temperatura ambiente en bolsas de polietileno con cierre hermético, hasta su evaluación fisicoquímica, microbiológica y sensorial.

Análisis microbiológico de las galletas

Se realizó recuento total de microorganismos mesófilos aeróbios/g, número más probable NMP de coliformes totales/g, NMP de coliformes fecales/g, recuento total de mohos y levaduras/g, detección de *E. coli* [8].

Análisis sensorial de las galletas

Se realizó prueba de aceptación hedónica de las 3 formulaciones con 50 consumidores, según la Norma Técnica Colombiana NTC. 5328. Análisis sensorial. Directrices para el uso de escalas de respuestas cuantitativas. Para esta evaluación se presentó a los evaluadores la siguiente escala, donde se calificó el nivel de agrado para cada formulación, la muestra que presentó mayor aceptación por el público objetivo se le realizo evaluación fisicoquímica.

Tabla1. Escala de aceptación sensorial, prueba hedónica

0	1	2	3	4	5
No me gusta	Me disgusta un poco	Ni me gusta ni me disgusta	Me gusta un poco	Me gusta	Me gusta mucho

Evaluación fisicoquímica de galletas

Evaluación fisicoquímica de las galletas. Se realizó por triplicado la determinación del contenido en humedad, proteína, grasa, cenizas, fibra dietaría total (F.D.T.), según los métodos descritos en el A.O.A.C. (2011) [8].

RESULTADOS

La calidad microbiológica de la harina de afrecho de cerveza estuvo conforme con las especificaciones de la Norma Técnica Colombiana NTC 442. Industrias alimentarias cebada para consumo directo y cervecero.

En la Tabla 2 se presentan los resultados del análisis fisicoquímico de la harina de afrecho de cerveza

Tabla 2. Composición química del afrecho de cerveza

Parámetro Analizado	Resultados	D.E.	C.V.
% Humedad	10,06	0,1065	0,010
% Proteína	15,31	0,9051	0,059
% Cenizas Totales	2,68	0,0678	0,025
% Extracto Etéreo	4,52	0,1771	0,039
% Fibra Cruda	12,82	0,0900	0,007
% Carbohidratos	67,43	1,1100	0,016
% Fibra Dietaría Total	54,61	0,5420	0,009

En la Tabla 3 se presentan los resultados de la evaluación de las propiedades funcionales de la harina de afrecho de cerveza.

Tabla 3. Propiedades funcionales de la harina del afrecho de cerveza.

Parámetro Analizado	Resultados	D.E.	C.V.
Capacidad de Hinchamiento (ml/g)	0,49	0,2450	0,500
Capacidad de retención de agua	4,76	0,3900	0,080

La calidad microbiológica de las galletas con harina de afrecho de cerveza estuvo conforme con la Norma Técnica Colombiana NTC 1241 productos de molinería. Galletas.

En la figura 1 se presentan los resultados del análisis sensorial de las galletas.

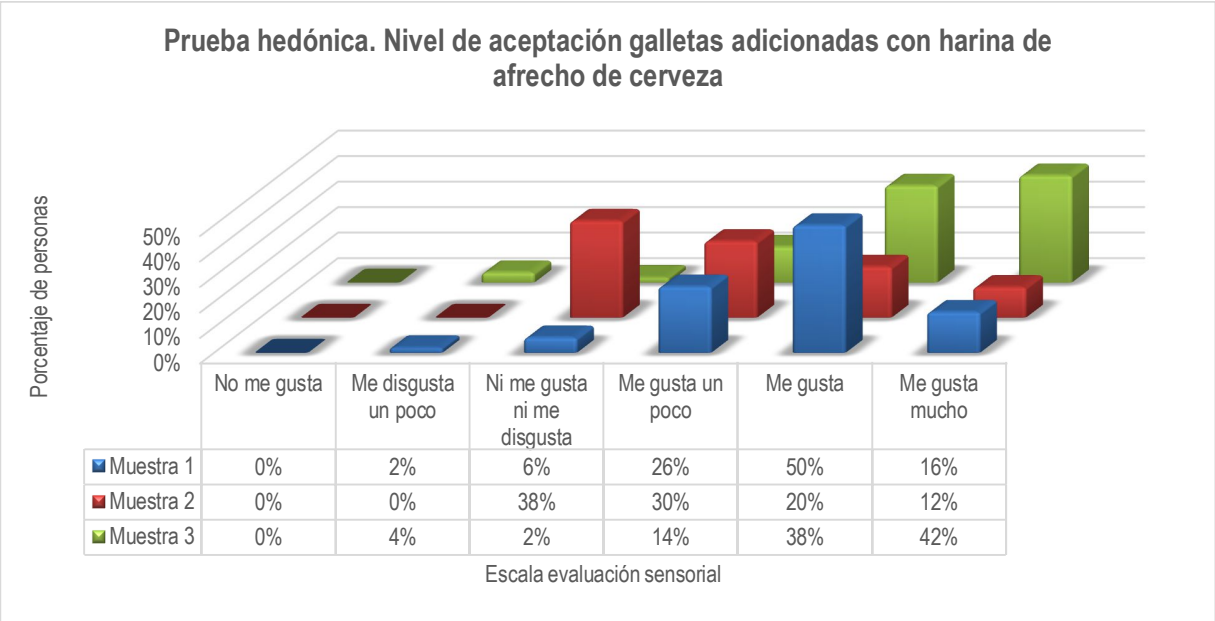


Figura 1. Evaluación sensorial de las galletas.

La formulación que presentó mayor aceptación por el público objetivo fue la muestra 3, que fue adicionada con un 30% de harina de afrecho de cerveza. A esta muestra se le realizo evaluación fisicoquímica, según Resolución del Ministerio de Protección Social de Colombia Nº1320 del 29 de abril del 2009, que regula alimentos o bebidas enriquecidas. En la tabla 4 se presentan los resultados de la composición proximal y el contenido de fibra dietaría total.

Tabla4. Composición química de las galletas

Parámetro Analizado	Resultados	D.E.	C.V.
% Humedad	4,94	0,3905	0,079
% Proteína	8,66	0,3800	0,040
% Cenizas Totales	2,10	0,2000	0,095
% Extracto Etéreo	24,85	0,9096	0,036
% Fibra Dietaría Total	13,85	0,1500	0,010

DISCUSIÓN

De acuerdo con los resultados del análisis fisicoquímico de la harina de afrecho de cerveza (Tabla 2), se observa que este subproducto presenta un contenido de humedad adecuado para su conservación. El alto contenido de proteína (15,31%) y de fibra dietaría total (54,61%), además si se tiene en cuenta que el afrecho representa hasta el 85% de los residuos totales del proceso de elaboración de cerveza, hace este subproducto de interés para la alimentación humana, aunque tradicionalmente se ha utilizado para alimentación animal [1,2]

Los resultados de las pruebas funcionales (Tabla3) indican una escasa capacidad de hinchamiento (0,49 g de H2O/g muestra), esto significa que la harina de afrecho de cerveza tiene muy baja capacidad de aumentar su volumen en un exceso de agua, por lo que no contribuye en la sensación de saciedad ni en el aumento del bolo fecal humano. El valor de CRA de 4,76 es similar a la CRA que presentaron muestras de extractos comerciales de fibra dietaría micro pulverizada de trigo y avena y uno de manzana (3.8, 3.9 y 4.1 g de H2O/g MS respectivamente); lo anterior significa que la harina de afrecho de cerveza retiene aproximadamente 5 veces su peso en agua, propiedad importante en el desarrollo de productos de panadería y productos cárnicos, entre otros [11]

En la figura 1, se observa que la formulación que obtuvo un mayor valor promedio de aceptación fue la muestra 3, no se ve diferencia estadísticamente significativa entre el promedio de aceptación entre la muestra 1 y la muestra 2. En general, la población que evaluó las galletas con adición de harina de afrecho, expresó en mayor porcentaje que la muestra número 1 se encuentra entre “me gusta un poco y me gusta” dentro de la escala de calificación presentada. Con respecto a la muestra 2 el mayor porcentaje de la población indicó que la muestra 2 “ni les gusta ni le disgusta” dentro de la escala de calificación. La evaluación de la muestra 3 mostró, que el 32 y 42% de la población expresó que la esta muestra” les gustaba y les gustaba mucho” respectivamente. Es importante mencionar que dentro del grupo de evaluación nadie manifestó desagrado por las muestras evaluadas. Teniendo en cuenta el análisis sensorial, se realizó la evaluación fisicoquímica de la formulación número 3.

En la tabla 4 se presentan los resultados de la composición proximal y el contenido de fibra dietaría total de la formulación número 3. Este producto presenta un alto contenido de fibra dietaría total (13,85), que estuvo conforme con las especificaciones de la Resolución del Ministerio de Protección Social de Colombia Nº1320 del 29 de abril del 2009.

CONCLUSIONES

El alto contenido de proteína y de fibra dietaría total de la harina de afrecho de cerveza reafirma, que este subproducto se puede utilizar como materia prima en el desarrollo de productos alimenticios de consumo humano. En este estudio se desarrollaron galletas adicionadas con fibra, que presentaron un buen nivel de aceptación y alto contenido de fibra dietaría total (13,85%), lo que lo convierte en un producto alimenticio que puede contribuir a la buena salud intestinal de las personas.

REFERENCIAS

[1] S.I. Mussatto, G. Dragone, I.C. Roberto, Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications, Journal of Cereal Science, Volume 43, Issue 1, January 2006, Pages 1-14.

[2] Giuseppina Mandalari, Craig B. Faulds, Ana I. Sancho, Antonella Saija, Giuseppe Bisignano, Rosario LoCurto, Keith W. Waldron, Fractionation and characterisation of arabinoxylans from brewers' spent grain and wheat bran, Journal of Cereal Science, Volume 42, Issue 2, September 2005, Pages 205-212.

[3] Fernandez Mayer A, Transformación de subproductos y residuos de agroindustria de cultivos templados, subtropicales y tropicales en carne y leche bovina, Instituto nacional de tecnología agropecuaria, 1ra Edición, 2014, Pagina 17.

[4] Aoife L. McCarthy, Yvonne C. O'Callaghan, Alan Connolly, Charles O. Piggott, Richard J. FitzGerald, Nora M. O'Brien, Phenolic extracts of brewers' spent grain (BSG) as functional ingredients – Assessment of their DNA protective effect against oxidant-induced DNA single strand breaks in U937 cells, Food Chemistry, Volume 134, Issue 2, 15 September 2012.

[5] Inge Celus, Kristof Brijs, Jan A. Delcour, The effects of malting and mashing on barley protein extractability, Journal of Cereal Science, Volume 44, Issue 2, September 2006, Pages 203-211.

[6] M Santos, J.J Jiménez, B Bartolomé, C Gómez-Cordovés, M.J del Nozal, Variability of brewer's spent grain within a brewery, Food Chemistry, Volume 80, Issue 1, January 2003, Pages 17-21.

[7] Román M, M.O., Valencia G, F.E. Evaluación de galletas con fibra de cereales como alimento funcional. Vitae. Vol. 13, No. 2. 2006. p. 36-43.

[8] Valentina Stojceska, Paul Ainsworth, The effect of different enzymes on the quality of high-fibre enriched brewer's spent grain breads, Food Chemistry, Volume 110, Issue 4, 15 October 2008, Pages 865-872.

[9] Valentina Stojceska, Chapter 16 - Dietary Fiber from Brewer's Spent Grain as a Functional Ingredient in Bread Making Technology, In Flour and Breads and their Fortification in Health and Disease Prevention, edited by Victor R. PreedyRonald Ross WatsonVinood B. Patel, Academic Press, San Diego, 2011, Pages 171-181

[10] Association of Official Analytical Chemists A.O.A.C. 2011.

[11] Valencia G, F.E., Román M, M.O. Caracterización fisicoquímica y funcional de tres concentrados comerciales de fibra dietaria. Vitae. Vol. 13, No. 2. 2006. p. 54-60.

QUALITY OF VARIOUS MEXICAN COMMERCIAL BEERS

(Calidad de diferentes cervezas mexicanas comerciales)

Mónica Virginia Montoya-Hernández[a]*, Julisa Edith López-Ramírez[a], Francisco Javier Pérez-Martínez[a], Juan Villafaña Rojas[b], Mirna Estarrón-Espinosa[a +]

[a] Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. Unidad de Tecnología Alimentaria / Av. Normalistas No. 800, Colinas de la Normal, C.P. 44270. Guadalajara, Jalisco.
[b] Departamento de Química, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Guadalajara/ Av. Patria 1201, Col. Lomas del Valle, C.P. 45129, Zapopan, Jalisco, México.

* Autor que presentó.
[+] Autor para correspondencia: mestarron@ciatej.mx

Área del Conocimiento: Q. Alimentos.

ABSTRACT
Beer is the third most widely consumed beverage, just after tea and water. The quality of a beverage like beer is an important issue due to its high consumption rates; however, in our country, there are no relevant studies about this matter. In this work we evaluated the physicochemical quality of seven different commercial beers based on methods established by national and international parameters like bitterness, pH, total acidity, CO_2 concentration, Brix degrees and volatile profile. It was found that most of them are within the range of the parameters established in the regulations for beer. The results were also analyzed statistically via multivariate analysis (PCA) to find similarities, differences and correlations between samples. The PCA analysis was able to classify the samples, through three major components explaining 72 % of data variability, in two categories: raw material and beer style based in physicochemical characteristics such as bitterness, total acidity and pH, as well as volatile groups like esters, methanol and higher alcohols.

Keywords: Beer; quality; physicochemical; volatile

RESUMEN
La cerveza es la tercera bebida más consumida en el mundo, antecedida por el té y el agua. La calidad de una bebida como la cerveza es una cuestión de interés a causa de sus altos niveles de consumo; sin embargo, en nuestro país, no son accesibles estudios de relevancia referentes a este producto. En este trabajo se evaluó la calidad fisicoquímica de siete cervezas comerciales por medio de métodos establecidos por normas nacionales e internacionales respecto al amargor, pH, acidez total, concentración de CO_2, grados Brix y perfil volátil. Se encontró que la mayoría de los productos evaluados se ajustan a los parámetros establecidos en las reglamentaciones sobre cerveza. Los resultados fueron sometidos a un análisis estadístico multivariado (PCA) con el objeto de distinguir diferencias, similitudes y correlaciones entre muestras. Mediante el análisis PCA se logró clasificar las muestras, a través de tres componentes principales explicando el 72 % de variabilidad de los datos en dos categorías: material prima y estilo de cerveza, en base a características fisicoquímicas como amargor, acidez total y pH, así como al contenido de ésteres, metanol y alcoholes superiores.

Palabras Clave: Cerveza; calidad fisicoquímica; volátiles

INTRODUCCIÓN

La cerveza es una bebida alcohólica altamente consumida en el mundo, ya sea por su gran gama de sabor o por su popularidad a nivel mundial. La cerveza se obtiene mediante la fermentación de una mezcla que consiste en cereales malteados (usualmente cebada), agua, lúpulo y levaduras [1]. Existen tantos tipos como estilos y variedades de estilos de esta bebida que hasta la fecha, la Asociación de Productores de Cerveza (BA) ha clasificado más de 140 estilos diferentes de cerveza [1]. Las diferentes combinaciones de ingredientes, procesos de fabricación y diseño del proceso dan lugar a un producto químicamente complejo que comprende cientos de compuestos presentes en un amplio rango de concentraciones, de los cuales los más abundantes son agua, etanol y carbohidratos, además de proteínas en pequeñas cantidades [2,3]. Cada etapa de producción influye en la expresión del sabor final del producto, con la formación de una completa variedad de compuestos volátiles con relevancia organoléptica, cuyo perfil está en función de la cepa de la levadura y la composición del mosto hervido utilizado [4]**.** En México no existen normas específicas que regulen la calidad de la cerveza, por lo tanto, para evaluar la calidad de una cerveza comercial se debe cumplir con la Norma Oficial Mexicana NOM-142-SSA1-1995 [5]. A nivel internacional, tres documentos principales aportan los límites para considerar una cerveza de calidad para su consumo, éstos son el Real Decreto 53/1995 de España, la Norma Francesa No. 92-307 y las Normas de la Asociación de Productores de Cerveza de Inglaterra [6, 7, 8]. Actualmente, son escasos los estudios disponibles enfocados a evaluar las diferencias de calidad fisicoquímica y volátil que existen entre cervezas comerciales consumidas en México, a pesar de ser la bebida más consumida en América Latina [9]. La Revista *Business International Monitor* reportó recientemente que el incremento de las ventas anuales será de 7.9% hasta 2018, además de mencionar que México posee una de las marcas más comercializadas internacionalmente, por lo que el aporte de conocimiento acerca de la calidad de diversas marcas nacionales es importante para acompañar este crecimiento económico [10]. El presente estudio aporta información preliminar sobre algunos parámetros de calidad de cervezas mexicanas claras, obscuras y de agave.

METODOLOGÍA

- Selección y Preparación de Muestras. Se seleccionaron cervezas comerciales obscuras y claras, cuyas marcas son consideradas representativas mexicanas y en el gusto de los consumidores, además de 5 lotes de cerveza artesanal de agave. Las muestras fueron obtenidas en centros comerciales. Las cervezas fueron desgasificadas durante 20 minutos en un baño ultrasónico a baja temperatura, previo a los análisis fisicoquímicos.

-Análisis Fisicoquímicos. Las determinaciones fisicoquímicas realizadas a la muestras fueron pH, acidez total, concentración de CO_2 disuelto, color y °Brix de acuerdo a los protocolos descritos en la NOM-142-SSA1-1995, NMX-V-0121986 y el Real Decreto 53/1995 de España. El nivel de amargor (IBU) de las muestras fue realizado de acuerdo a la metodología reportada por la Sociedad Americana de Químicos Cerveceros (ASBC).

-Perfil Volátil. El perfil volátil mayoritario de las muestras de cerveza fue obtenido mediante el análisis acoplado head-space-cromatografía de gases con detección de flama (HS- GC-FID). Se colocaron 0.98 mL de cerveza en un vial de 10 ml adicionando 3-octanol (EI) para tener una concentración final de 86 ppm, después fueron colocados en el head-space HP7694E con temperaturas en vial, loop y línea de transferencia de 80, 110 y 120 °C, programando los tiempos de equilibrio del vial, presurización, llenado

del loop, equilibrio del loop y de inyección de 7, 0.2, 0.2, 0.8 y 1 min respectivamente. Los volátiles en equilibrio fueron inyectados al cromatógrafo de gases Agilent Technologies 6890 manteniendo un flujo de 0.7ml/min de helio y temperaturas en inyector y detector de 230°C y 250° respectivamente. La separación de los componentes se realizó en una columna HP-INNOWAX a una temperatura inicial de 40°C (7 min), incrementando 5°C/min hasta 120°C (5 min), después elevó a 10°C/min hasta 170°C y finalmente se incrementó hasta 240°C a razón de 20°C/min, manteniendo 20 min.

-Análisis Estadístico. Los resultados fueron tratados estadísticamente mediante un Análisis de Varianza (ANOVA) utilizando el software Statgraphics Centurion XVI.II y análisis de componentes principales (PCA) mediante el software SIMCA-P 7.01.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

En la Tabla 1 se resumen los resultados de los diferentes parámetros fisicoquímicos evaluados en las cervezas. En general, las cervezas oscuras presentaron mayores niveles de amargor que las cervezas claras, y éstas a su vez, mayor amargor que las cervezas de agave. El amargor de la cerveza se origina por la concentración de ácidos iso-α y β resultado de la adición de lúpulo. El nivel de amargor suele ser más elevado en cervezas obscuras (15 a 28 IBU) que en claras (8 a 18 IBU). Lo anterior, coincide en el caso de las cervezas mexicanas oscuras evaluadas, que presentaron los mayores valores de amargor (12.5-15.5 IBU), pero sin ser tan elevados como algunas europeas. Contrariamente, las cervezas de agave fueron las menos amargas con valores de IBU que fluctuaron entre 2.1-14.0 IBU. Mediante un ANOVA de los resultados de este parámetro, se determinó que existen diferencias significativas en el amargor de las cervezas oscuras y de agave, Figura 1a.

Tabla 1. Resultados de los análisis fisicoquímicos relacionados con la calidad de la cerveza.

Cervezas	Amargor	CO_2	°Brix	pH	Acidez	Color
	X ± STD	X ± STD	X ± STD	X ± STD	X ± STD	X ± STD
Claras						
CC1	12.50 ± 0.71	2.89 ± 0.01	1.65 ± 0.07	4.26 ± 0.02	0.43 ± 0.00	111.44 ± 5.62
CC2	9.50 ± 0.71	2.71 ± 0.06	0.83 ± 0.04	4.26 ± 0.02	0.30 ± 0.02	253.30 ± 13.81
CC3	10.50 ± 0.71	2.73 ± 0.03	0.80 ± 0.14	4.30 ± 0.02	0.35 ± 0.02	86.64 ± 13.36
Obscuras						
CO1	14.00 ± 1.41	2.73 ± 0.03	3.05 ± 0.07	4.33 ± 0.01	0.23 ± 0.01	5813.29 ± 12.46
CO2	12.50 ± 0.71	2.77 ± 0.00	1.80 ± 0.00	4.13 ± 0.00	0.19 ± 0.00	5244.80 ± 15.62
CO3	15.50 ± 0.71	2.94 ± 0.00	2.83 ± 0.04	4.19 ± 0.01	0.40 ± 0.00	5044.09 ± 9.37
Agave						
CA1	8.38 ± 0.53	3.09 ± 0.00	2.35 ± 0.07	3.23 ± 0.02	0.25 ± 0.02	2565.85 ± 5.13
CA2	2.11 ± 0.15	2.96 ± 0.00	2.15 ± 0.07	3.68 ± 0.02	0.18 ± 0.02	1296.00 ± 16.43
CA3	4.14 ± 0.19	2.62 ± 0.00	2.20 ± 0.14	3.31 ± 0.02	0.36 ± 0.01	2617.31 ± 5.94
CA4	11.95 ± 0.07	2.76 ± 0.06	2.70 ± 0.00	3.30 ± 0.01	0.46 ± 0.01	1582.83 ± 59.27
CA5	14.00 ± 2.83	2.56 ± 0.57	2.70 ± 0.01	3.33 ± 0.04	0.29 ± 0.03	1807.29 ± 7.10

La concentración de CO_2 disuelto no presentó diferencias significativas entre tipos de cerveza, Figura 1b. Los parámetros de calidad establecidos en [6] indican que el contenido de anhídrido carbónico en la cerveza no debe ser menor a 3 g/L. Ninguna de las cervezas evaluadas cumplió este requisito, sin embargo dadas las implicaciones de esta determinación, los bajos valores de CO_2 obtenidos podrían atribuirse a una manipulación inadecuada de las muestras durante su cuantificación. A pesar de esto, el hecho de no observar diferencias significativas entre los tipos de cerveza evaluadas para este parámetro, indica que la adición de CO_2 durante el envasado es un proceso estandarizado en la industria cervecera.

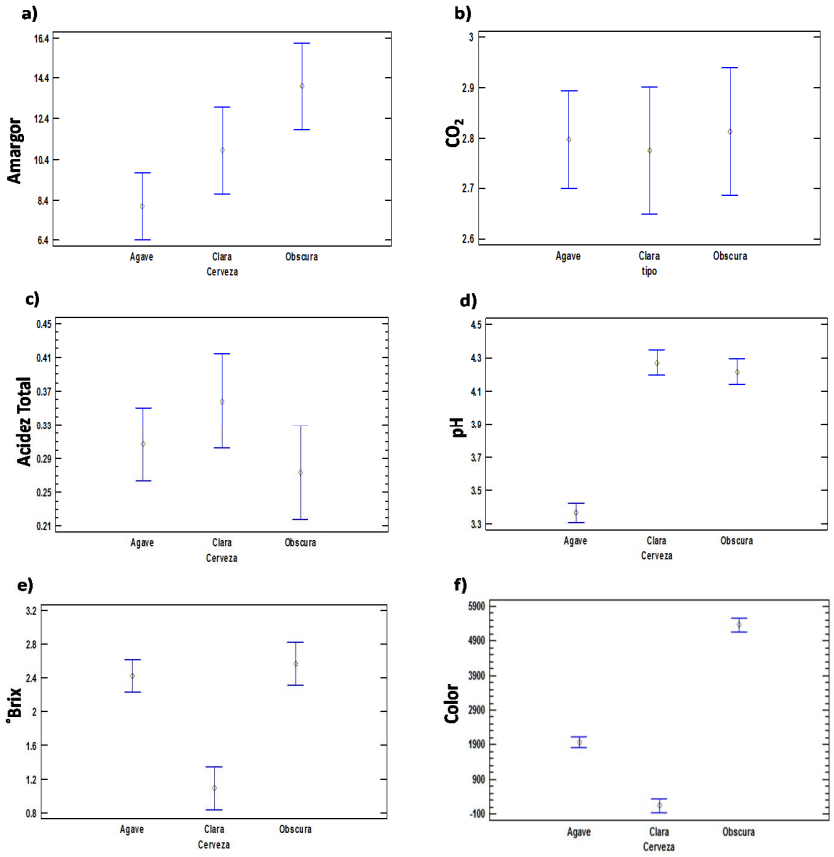


Figura 1. Gráficos de medias de las diferentes determinaciones fisicoquímicas ($p < 0.05$)

En cuanto al pH, no se observaron diferencias significativas entre las cervezas comerciales de malta, las cuales tuvieron valores en el rango de 4.13 a 4.33, cumpliendo con el parámetro de calidad establecido en [6], el cual corresponde a valores entre 3.5 y 5, mientras que la cerveza de agave presentó valores de pH menores a lo reglamentado fluctuando entre 2.56-3.09, como se observa en la Figura 1d. Aunque no se realizaron mediciones de ácidos orgánicos en las muestras, los valores de pH obtenidos sugieren que la materia prima utilizada en la elaboración de las cervezas de agave podría propiciar una mayor

generación de ácidos orgánicos derivados del metabolismo de las levaduras durante la fermentación, lo cual contribuiría a disminuir el pH del producto final.

Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas para la cuantificación de acidez total entre tipos de cerveza (Figura 1c). De acuerdo con las normas de calidad, la concentración de acidez no debe ser mayor a 0.3 g/100mL, sin embargo en este estudio algunas cervezas excedieron este criterio.

El análisis estadístico mostró que existen diferencias significativas en los ˚Brix de las cervezas claras evaluadas con respecto a las oscuras y las de agave, Figura 1e. Por norma, se declara como aceptable un máximo de 7.5 °Brix, por lo que de acuerdo a lo valores presentados en la Tabla 1, todas las cervezas analizadas cumplieron la norma. En cuanto al color, se evidenciaron diferencias significativas en los tres tipos de cervezas evaluadas, Figura 1f.

Como puede observarse en la Tabla 2, en la composición volátil de las diferentes cervezas, los alcoholes y ésteres fueron los componentes de mayor concentración, seguidos del grupo de aldehídos, metanol y furanos. La concentración de terpenos en las cervezas de agave fue mayor, lo anterior puede deberse a que de origen, la materia prima empleada para su elaboración tiene un contenido elevado de compuestos de este grupo, los cuales se suman a los que aporta el lúpulo durante su elaboración.

Tabla 2. Concentración de compuestos volátiles mayoritarios.

Cerveza	Aldehídos	Ésteres	Metanol	Alcoholes	Furanos	Terpenos*
	X ± STD	X ± STD	X ± STD	X ± STD	X ± STD	X ± STD
CC1	1.72 ± 0.15	3.95 ± 0.13	0.66 ± 0.02	37.13 ± 1.51	0.82 ± 0.03	0.69 ± 0.62
CC2	2.31 ± 0.11	8.82 ± 0.13	1.31 ± 0.13	47.20 ± 5.00	0.82 ± 0.04	0.70 ± 0.61
CC3	0.89 ± 0.02	3.53 ± 0.26	1.37 ± 0.12	38.59 ± 1.55	1.13 ± 0.06	2.60 ± 2.26
CO1	2.49 ± 0.19	5.16 ± 0.12	1.33 ± 0.03	45.15 ± 2.28	0.92 ± 0.02	0.17 ± 0.14
CO2	1.93 ± 0.03	5.93 ± 0.20	0.95 ± 0.03	51.75 ± 0.86	1.92 ± 0.04	0.88 ± 0.80
CO3	1.87 ± 0.13	7.37 ± 0.18	0.86 ± 0.09	59.52 ± 2.84	1.11 ± 0.03	0.00 ± 0.00
CA1	3.22 ± 0.05	4.28 ± 0.23	2.36 ± 0.17	67.69 ± 2.43	1.07 ± 0.04	6.66 ± 5.84
CA2	5.71 ± 0.48	2.72 ± 0.19	1.40 ± 0.04	48.40 ± 1.75	1.19 ± 0.02	11.77 ± 10.38
CA3	4.54 ± 0.22	3.88 ± 0.16	2.29 ± 0.08	69.83 ± 1.94	0.99 ± 0.03	13.00 ± 11.29
CA4	4.84 ± 0.36	4.75 ± 0.30	4.70 ± 0.42	74.57 ± 8.85	0.90 ± 0.07	11.51 ± 10.34
CA5	5.05 ± 0.21	4.42 ± 0.19	2.18 ± 0.17	67.02 ± 2.42	0.47 ± 0.02	9.79 ± 8.51

Unidades en ppm; *Unidades en µg/L

Un análisis de componentes principales (PCA) a partir de los resultados fisicoquímicos y de composición volátil permitió clasificar los diferentes tipos de muestras a partir de tres componentes principales explicando un 72% de la variabilidad de los datos. Se observó que las funciones de los componentes 1 y 2 en la Figura 2a, muestran las diferencias que existen entre las cervezas elaboradas con granos y agave, siendo los parámetros determinantes en esta clasificación el pH, amargor y la concentración de ésteres (Figura 2b). Por otro lado, los componentes principales 1 y 3 en la Figura 2c, agrupan las cervezas de agave, obscuras y claras, a partir de las cuantificaciones de furanos, pH, acidez, color y ˚Brix (Figura 2d).

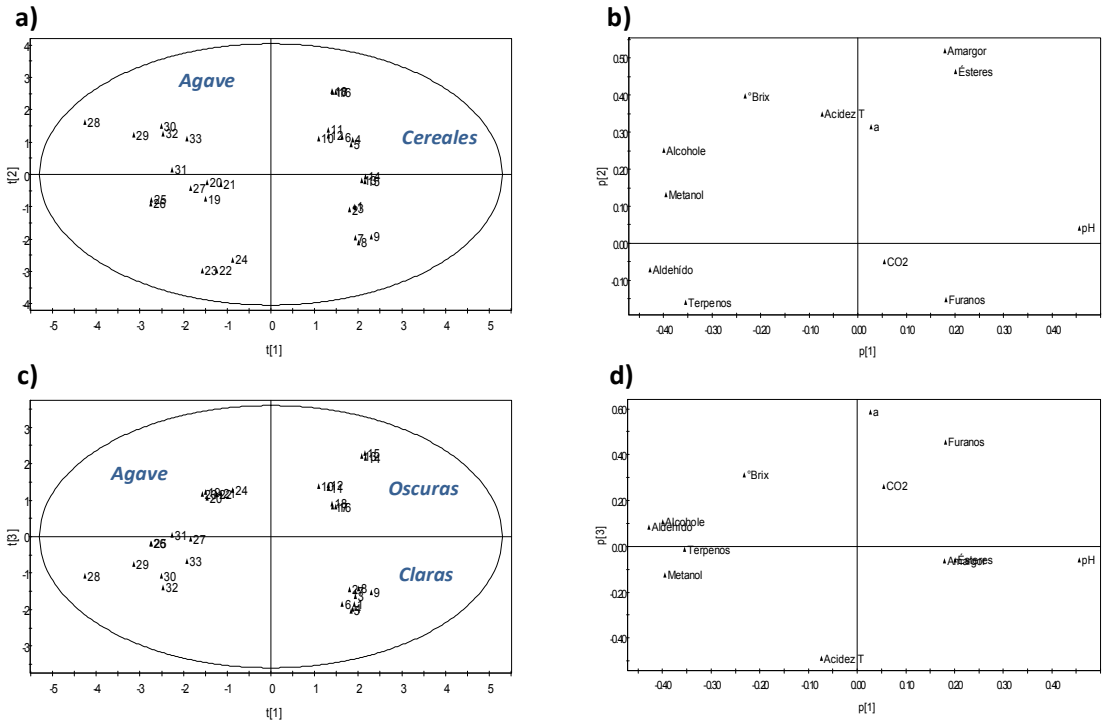


Figura 2. Análisis de componentes principales en base a la calidad fisicoquímica y volátil de las cervezas

CONCLUSIONES

Las cervezas comerciales elaboradas con malta se ajustaron a la mayoría de los parámetros establecidos por las normas nacionales e internacionales, sin embargo, las cervezas de agave mostraron una variabilidad importante entre lotes. Los resultados obtenidos en este trabajo, especialmente para las cervezas de agave, revelaron características muy particulares sobre todo en amargor, pH, color, contenido de aldehídos, metanol, alcoholes y terpenos que podrían servir de base para establecer en lo futuro parámetros de calidad para este producto de incursión reciente y exitosa en el mercado de las cervezas mexicanas artesanales.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo financiero del proyecto CERVEZA del CIATEJ, A.C. para la realización de este estudio.

REFERENCIAS

[1] Patterson, M. &.-P. (2014). The Geography of Beer. New York: Springer, 1-5.

[2] Hughes, P., & Baxter, E. (2001). Beer: Quality, Safety and Nutritional Aspects. Cambridge: RSC: Cambridge, 1-13, 40-73, 98-119.

[3] Rübsam, H. G. (2013). Influence of the range of molecular weight distribution of beer components on the intensity of palate fullness. European Food Research and Technology, 236(1), 65-75.

[4] Rodrigues, J. E. (2011). Tesis: Metabonomic studies to assess beer quality and stability.

[5] Norma Oficial Mexicana NOM-142-SSA1-1995. Bienes Y Servicios. Bebidas Alcohólicas. Especificaciones Sanitarias. Etiquetado Sanitario y Comercial.

[6] Real Decreto 53/1995. Reglamentación técnico-sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de la cerveza y de la malta liquida.

[7] Décret n°92-307 du 31 mars 1992 portant application de la loi du 1er août 1905 sur les fraudes et falsifications en matière de produits ou de services en ce qui concerne les bières

[8] Brewers Association 2014 Beer Style Guidelines.

[9] García-Sánchez, J. C. (2014). Cerveza Mexicana: Antología de un Arte Efervescente. Guadalajara, Jalisco: Ilustra, 1-15.

[10] Soto, O. (2015). Industria cervecera, un mercado a prueba de crisis. Forbes.

[11] NMX-V-0121986. Bebidas Alcohólicas. Vinos. Especificaciones.

DESIGN OIL-WATER MICRO EMULSIONS FOR STABILIZATION ALKAMIDES

(Diseño de emulsiones aceite-agua para la estabilización de alcamidas)

García Márquez Eristeo[a+], Morales Pérez Teresa Del Rocío[a*], Espinosa Andrews Hugo[a], García Fajardo Jorge Alberto[a]

[a] Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, Tecnología Alimentaria.

*Autor presentador: Teresa Del Rocío Morales Pérez
+Autor para correspondencia: egarcia@ciatej.mx

Área del Conocimiento: Q. Alimentos.

ABSTRACT
Microemulsions are systems that can disperse lipophilic and hydrophilic substances. These systems are vehicles carriers to encapsulate substances of high value aggregate, with application in the food and pharmaceutical industries. Micro emulsions have been used to prolong the stability of flavours and fragrances. In this collaboration were made emulsions to control stabilize and creaming. Finally, reduce degradation of concentrated extract *of Heliopsis longipes*, obtained by supercritical extraction. It has been reported that the extract of *Heliopsis longipes* has been used as traditional medicine for its anaesthetic effect, fungicide and bacteriostatic, but it is unstable during storage. We also explore the possibility to prolong the stability of emulsions with minimal concentration of stabilizer. Microemulsions were prepared in a relationship ϕ= 0.2. The phase oily was a mixture of caprylic / capric. A dispersion stock mesquite gum 32 g / 100 g solution as aqueous phase was used. The stock solution was used to obtain different ratios of mesquite gum in the continuous phase. The stabilizer concentration was 0.75% weight, based on the total dispersion. Microemulsions were prepared in the following ratios oil – water (1:0.8, 1:1.1 and 1:1.2, preliminary assay). The samples were emulsified with two rates; 3000 and 9000 rpm for 5, 10 and 15 min, monitoring the temperature of homogenization at 25°C. The stability of the emulsions was compared, verifying creaming rate and particle size distribution, with emulsion without added cosolvent.
Different relationships oil/mesquite gum, were decisive on results of particle size distribution, and creaming. The mayor stability during test cremated was in emulsion oil: mesquite gum (1:1.2). The creaming length was virtually zero to 2683Xg for 90 min. The formulation described above showed the smallest particle size. The particle size distribution was maintained between 0.59 and 0.8 µm, the span value was 1.68 units, and unimodal distribution was observed.

Keywords: Emulsion, Creaming, particle size.

RESUMEN
Las microemulsiones son sistemas que pueden dispersar sustancias lipófilas e hidrófilas. Las microemulsiones, han sido utilizadas en la industria alimentaria y farmacéutica para prolongar la estabilidad de sabores y aromas. En esta colaboración se hicieron emulsiones para controlar y estabilizar la formación de cremado de la fase oleosa, y finalmente reducir la degradación de extracto concentrado

de *Heliopsis longipes,* obtenido por extracción supercrítica. Se sabe que el extracto de *Heliopsis longipes* se ha sido utilizado como medicina tradicional por su efecto anestésico, fungicida y bacteriostático, pero suele ser inestable a condiciones de almacenamiento durante el tiempo. Se exploró la posibilidad de prolongar el tiempo de estabilidad de las emulsiones con una mínima concentración de cosolvente. Las micro emulsiones se prepararon en una relación de Ø = 0.2. El aceite vegetal denominado Neobee 1053, esta constituido de una mezcla de triglicéridos, de los ácidos caprílico/cáprico. Se utilizó una dispersión de la goma de mezquite 32 g / 100 g de solución, como fase acuosa. La dispersión estándar fue diluida para obtener diferentes relaciones de goma de mezquite en la fase continua. La concentración de cosolvente fue de 1.5% en peso, basado en la dispersión total. Las micro emulsiones se prepararon siguiendo la proporción de aceite – agua (1:0.8, 1:1.1 y 1:1.2, en el ensayo preliminar). Las muestras fueron emulsionadas utilizando dos velocidades de cizallamiento; 3000 y 9000 rpm, durante 5, 10, y 15 min., controlando la homogeneización a 25°C. La estabilidad de las emulsiones fue comparada verificando la de tasa de cremado, y distribución del tamaño de partícula. Las relaciones aceite/goma de mezquite, fueron decisivas en los resultados de cremado y distribución de tamaño de partícula (0.59 y 0.8 µm, y un span de 1.68 unidades). Los resultados obtenidos, permitieron concluir que las emulsiones más estables fueron las relaciones aceite: goma de mezquite (1:1.1 y 1:1.2), no se observó diferencia significativa entre éstas.

Palabras Clave: Emulsión, cremado, tamaño de partícula.

INTRODUCCIÓN

Los fungicidas sintéticos son ampliamente utilizados para el control de hongos fitopatógenos, sin embargo, la aplicación indiscriminada ha originado diversos problemas, como toxicidad en usuarios y daños al medio ambiente. Por lo que deben extremarse las precauciones al utilizarlos [1].

El chilcuague (*Heliopsis Longipes)* [2,3] presenta actividad insecticida. Sus raíces han sido utilizadas para extraer compuestos bioactivos como las alcamidas. Utilizadas como anestésico local, en condimentos alimenticios y saborizante de bebidas. Sus raíces al ser masticadas producen intensa salivación y un efecto analgésico local, Little [4]. El principio activo contenido en sus raíces y semillas es la afinina. Está formada por un ácido graso de una cadena alifática de diez carbonos con tres insaturaciones unido a una isobutilamina. Entre sus aplicaciones comunes, puede resaltarse el tratamiento de micosis como el pie de atleta y virus como el *Herpes simplex y Herpes zoster*, Ospina [5].

Sin embargo, el extracto de afinina no cuenta con las condiciones para mantener su estabilidad, su degradación reduce las propiedades anestésicas, bactericidas y fungicidas. Por lo que, se implementó una estrategia que prolongue la estabilidad del extracto, por medio de una micro emulsión conteniendo extracto de *Heliopsis Longipes.*

Una emulsión se forma con al menos dos fases líquidas inmiscibles, usualmente el agua y aceite. Una de las fases debe ser la continua, mientras que la otra fase debe ser la dispersa, los glóbulos de la fase dispersa deben estar en el intervalo de 0.1 a 100 µm, McClements [6]. Las emulsiones se clasifican de acuerdo a la distribución de las fases acuosa y oleosa; cuando la cantidad de fase dispersa está contenida en la acuosa el sistema es conocido como una emulsión (O/W), si el sistema consiste en la dispersión de agua en una fase oleosa se conoce como emulsión agua en aceite (W/O). Las membranas suaves, han sido la elección para dispersar y estabilizar compuestos bioactivos hidrofóbicos como las

alcamidas. En esta contribución se estudió la velocidad y el tiempo de emulsificación. Parámetros elegidos después de realizar pruebas preeliminares de premezclado y concentración de cosolvente.

METODOLOGÍA

Materiales

La fase oleosa (FO) fue formulada con aceite Neobee 1035, 5% de extracto de *Heliopsis longipes* en función de la concentración de aceite. Fase acuosa (FD): dispersión de goma de mezquite en agua desionizada (32 g sólidos/100 g H2O) a 25°C, adicionado de 1.5% de cosolvente polihidroxilado. Comparando con un control con 0% de cosolvente. En todos los ensayos se utilizó agua bidestilada.

PREPARACIÓN DE LAS EMULSIONES

Se prepararon emulsiones con 20 g de FO, conteniendo 1 g de extracto concentrado de *Heliopsis longipes*. Posteriormente se agregó 22 g de goma de mezquite como fase dispersa y 0.33 g de cosolvente polihidroxilado. La mezcla de fase oleosa y acuosa ((1:0.8, 1:1.1, 1:1.2), fue mezclada durante 4.5 h. Después, la mezcla obtenida fue sometida a homogenización con un dispersor de alto corte a 3000, 6000 y 9000 rpm utilizando un mezclador de alto corte (L5M-A, Silverson, Waterside, Chesham, England) a 25°C, a 5, 10 y 15 min, como se indica en la tabla 1.

Tabla 1. Condiciones experimentales de homogeneización.

EXPERIMENTO	RPM	TIEMPO (MIN)
1	3000	5
2	9000	5
3	3000	15
4	9000	15
5	6000	10

ANÁLISIS DE TAMAÑO DE PARTÍCULA

El tamaño de partícula en emulsiones es importante porque determina propiedades intrínsecas como la viscosidad, separación de la emulsión (cremado y sedimentación). La distribución de tamaño de partícula es una forma de determinar la eficiencia de homogenización. Existen varios métodos para determinar el tamaño de partícula que van desde los ópticos hasta la dispersión de rayos laser. La dispersión de rayos laser permite medir un amplio intervalo de tamaños de partícula que van de 0.1 µm a 2000 µm. La determinación de tamaño de partícula de las emulsiones (1:1.1, 1.5%, 4.5 h) fue determinada con un equipo Mastersizer 2000. La metodología de difracción de rayo láser mide la distribución de tamaño de glóbulos o partículas, mediante la variación angular de luz dispersada de un rayo láser, que pasa a través de una muestra diluida (frecuentemente, entre 0.01 a 01 g de producto por cada 100 mL). Las partículas grandes dispersan luz en ángulos pequeños con relación al haz láser, mientras las partículas pequeñas dispersan la luz en ángulos mayores. Los datos obtenidos de dispersión

angular generan un patrón de dispersión, que utilizando la teoría de MIE de dispersión de luz, se obtiene un registro de diámetro de una esfera equivalente volumétrica.

ESTABILIDAD DE LAS EMULSIONES

Las emulsiones son sistemas termodinámicamente inestables cuando las partículas dispersas en el medio continuo están entre 0.1 µm a 100 µm de diámetro, pero estos sistemas pueden prolongar su estabilidad modificando la tensión interfacial entre la fase dispersa y la fase continua. Evitando los tres principales fenómenos de inestabilidad: floculación, agregación y cremado. El cremado es una forma de inestabilidad que puede determinarse rápidamente utilizando un método de centrifugación, la ausencia de cremado significa alta estabilidad, y el alto cremado, inestabilidad de las emulsiones. La variación de tiempo con respecto a las fuerza de gravedad es un método indicativo para determinar la inestabilidad de las emulsiones. La estabilidad de las emulsiones se determinaron por medio de una centrifuga HERMLE Z 383 K a 2683 g, variando el tiempo: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16 y 20 min.

RESULTADOS

ANÁLISIS DE TAMAÑO DE PARTÍCULA

La figura 1, muestra 5 de los experimentos realizados. Observando que la tasa de corte y tiempo de homogeneización permitieron obtener el menor tamaño de partícula, entre 0.592 10 µm – 0.804 µm (experimento 4), seguido por un tamaño de partícula con intervalo entre 0.980 µm – 1.331 µm (experimento 2)..

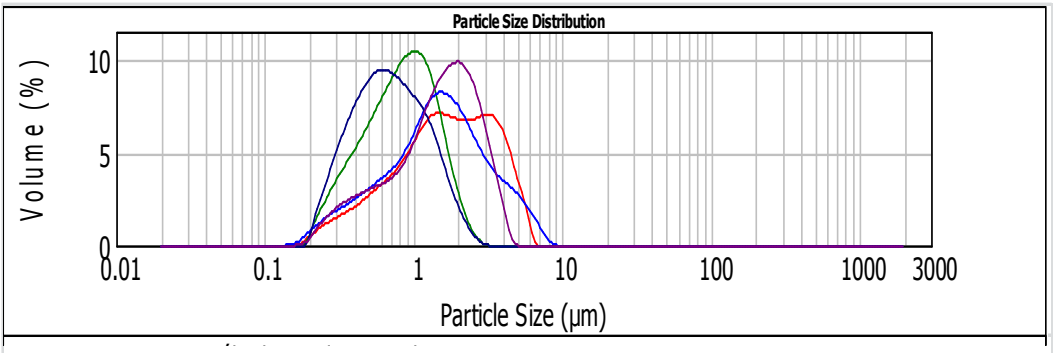


Figura 1. Representa la distribución de glóbulos, y el número de experimentos, representados en la gráfica: rojo (1), verde (2), azul (3), azul oscuro (4) y morado (5), respectivamente.

ESTABILIDAD DE EMULSIONES

En este experimento se destacó que la emulsión 1:1.1 con porcentaje de cosolvente de 1.5% y con agitación de 4.5 horas y 9000 rpm. Se obtuvo el menor tamaño de partícula y menor valor de span. La

relación mencionada, tuvo un cremado de prácticamente cero. La longitud de cremado fue de 0.3 mm, en comparación con las tasas de corte de 3000 y 6000 rpm de homogeneización.

En la figura 2, puede observarse el perfil de estabilidad. El tiempo de cremado fue prácticamente cero a tiempos menores de 5 min, mientras que a tiempos mayores a 5 min se observo mayor efecto de desestabilización, excepto la emulsión (1:1.1). Pensamos que, el mezclado previo, y relación de relación fase dispersa-fase continua logran evitar la agregación de los glóbulos en las emulsiones preparadas, datos obtenidos a partir de pruebas preliminares.

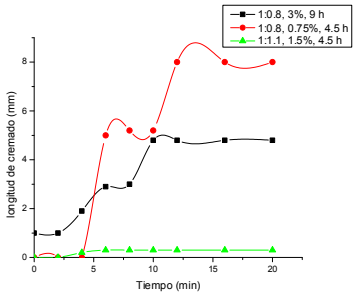


Figura 2. Tasa de cremado en función de tiempo a 2683Xg

Basado en la tasa de cremado como una forma de medir la inestabilidad de las emulsiones se fijó el tiempo de cremado en 90 min., luego se varió la fuerza de gravedad para observar la inestabilidad de las emulsiones, experimento 2 y 4, determinando la longitud de cremado. Los resultados mostrados en la figura 3, se puede observar que el cremado fue prácticamente cero. Los datos demuestran que las emulsiones obtenidas en los experimentos (2) y (4), son estables al fenómeno de cremado. En términos prácticos, puede decirse que el fenómeno de cremado, no influirá en el proceso de inestabilidad inmediata.

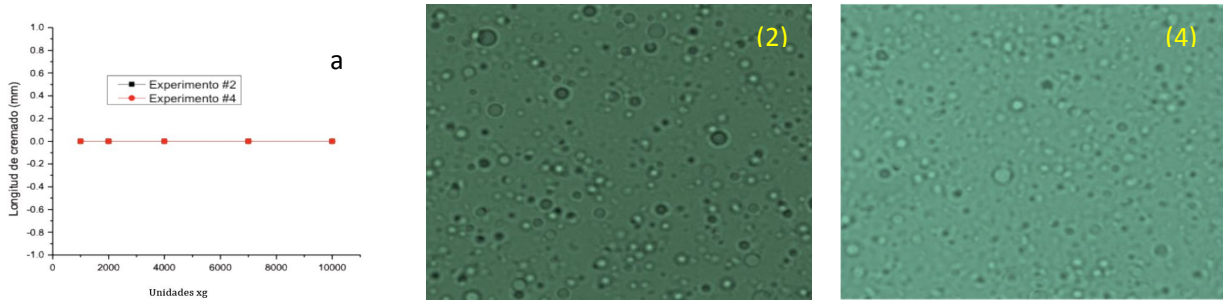


Figura 3. Longitud de cremado en función de centrifugación (a), emulsión (2), emulsión (4).

DISCUSIONES

Las microemulsiones son sistemas dispersos, y su estabilidad depende de muchos factores, entre ellos, la relación de fase dispersa, concentración de sales, polisacáridos utilizados, pH, tipo de

homogeneización, tiempo, entre otros. Debido al gran numero de variables de estudio, se mantuvo constante la relación de fase dispersa y se determinó el efecto de la tasa de homogeneización y el tiempo. Factores, que permitieron obtener homogeneidad en la distribución de tamaño de partícula, que aquellas con diferentes cantidades de cosolvente. La concentración de cosolvente tiene efecto importante en la distribución de tamaño de partícula y en la estabilidad, determinada por el efecto de la fuerza centrifuga. Una forma de acelerar el proceso de desestabilización. La emulsión obtenida de aceite-goma de mezquite (1:1.1 y 1:1.2) y 1.5% de cosolvente polihidroxilado pueden funcionar como un sistema acarreador de sustancias susceptibles a la degradación, en este caso, las alcamidas obtenidas de raíces de *Heliopsis longipes*.

CONCLUSIONES

Es posible obtener emulsiones estables físicamente, utilizando aceite Neobee-goma de mezquite (1:1.1), 1.5% de cosolvente polihidroxilado y 5% de extracto de alcamidas. Los datos indican que la relación de aceite-goma de mezquite, agente polihidroxilado y alcamidas, bajo las condiciones establecidas, se obtiene distribución homogénea de los glóbulos de aceite dispersos en goma de mezquite. Concentraciones mayores o menores modifican el tiempo de cremado, y en consecuencia, el tiempo de agregación de glóbulos de aceite. El ensayo de cremado acelerado, permite intuir menor agregación entre los glóbulos en las emulsiones preparadas, y por lo tanto, prolongar la vida de los compuestos bioactivos emulsionados.

AGRADECIMIENTOS
Se agradece a las instalaciones del CIATEJ campus Zapopan, por su apoyo brindado para la realización de este proyecto.

REFERENCIAS

[1] Wilson C, Wisniewski. (2000). Microbial Food Contamination. Boca Raton: Wilson C, Droby S (Eds.).
[2] Fisher, T. R. 1957. Taxonomy of the genus *Heliopsis* (Compositae). Ohio J. Sci. 57: 171-191.
[3] Martínez, M. 1994. Las Plantas Medicinales de México. Ediciones Botas. 6a ed. pp: 113-115.
[4] Little E. (1948). El chilcuague (*Heliopsis longipes*). Planta insecticida. Boletín de la Sociedad Botánica de México 7:23-27.
[5] Ospina, N. L. S., C. J. Olarte y O. E. Núñez. 1986. Estudio fitofarmacológico de la fracción liposoluble de las flores de *Spilanthes americana*. *var mutis*. Parte 1. Estudio fitoquímico. Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas 15: 37-42.
[6] D.J McClements. (2005). Food Emulsions: Principles, Practice and Techniques, 2nd Edition. Boca Raton, Florida: CRC, Press.

CUPCAKE WITH AMARANTH, RICE AND OATS FLOURS: DEVELOPMENT AND EVALUATION

(Cupcake con harinas de amaranto, arroz y avena: Desarrollo y evaluación)

Laura Lucía Ramírez Ramos[a], Norma Chamé Pérez[b], Claudia Patricia Beltrán Miranda[c], María Leonor Valderrama-Cháirez[d*+]

[a] Alumna Licenciatura en ciencia de los Alimentos, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Benemérita Universidad de Guadalajara, Camino Ramón Padilla Sánchez 2100, Nextipac, C.P. 44600 Zapopan, Jal. (+52 33)3777 1150 ext 33041.
[b] Alumna Ingeniería en Agroindustrias, Universidad Politécnica de Chiapas , Prol. Ave. Palmas, Los Laureles I, Tapachula de Córdova y Ordóñez, Chis C.P. 3070
[c] Profesor Investigador Centro de Investigaciones en Comportamiento Alimentario y Nutrición (CICAN), Centro Universitario del Sur. Benemérita Universidad de Guadalajara. Av. Enrique Arreola Silva No. 883, colonia centro, Ciudad Guzmán, Jalisco, México C.P. 49000. Teléfono: (+52-341) 57 52222 ext 46134
[d] Profesor Investigador, Departamento de Salud Pública, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Benemérita Universidad de Guadalajara, Camino Ramón Padilla Sánchez 2100, Nextipac, C.P. 44600 Zapopan, Jal. (+52 33)3777 1150 ext 33041.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: valderramanoy@gmail.com

Área del Conocimiento: Q. Alimentos.

ABSTRACT
Bakery products are part of the Mexican diet; which are prepared from refined wheat flour have a high glycemic index (GI), bread provides a lot of calories because of the content of simple carbohydrates; which contributes to weight gain in the consumer, encouraging diseases like diabetes and obesity. It is therefore important to develop products incorporating low GI meals and nutraceuticals; as is the amaranth flour, highlighting its content of the 8 essential amino acids, antioxidants, peptides, soluble and insoluble fiber; also contained in the oats, and the latter together with the rice starch have a characteristic which makes them favorable for baking industry. Due to the characteristics mentioned above these meals help prevent diseases such as colon cancer, diabetes and cholesterol, are gluten-free which makes it a suitable for people with celiac disease food. The ingredients used were flour of amaranth, oats and rice, milk, egg, oil and sugar. The cupcake was evaluated, physicochemically (moisture, ash, protein, lipid, and crude fiber, water activity and color CieLab), microbiologically (molds and yeasts, mesophilic aerobic bacteria, Total coliforms and *Salmonella* spp.), were tested by the Mexican Standard. The sensorial analysis evaluated consumer acceptance, using a 5 points hedonic scale (1= dislike extremely and 5=like extremely), it carried out with 40 untrained judges. Results: Protein 5.10%, Lipid 15.27%, Total carbohydrates 52.39%, Fiber 2.88%, Aw 0.91, moisture 23.47, Chroma 354.33 and L 62.32. Data obtained from the microbiological analysis were: Aerobic mesophilic bacteria <10 UFC/g, total coliforms <10UFC/g, molds and yeast <10UFC/g, and *Salmonella* spp. absent in 25g, these results are within Mexican regulation. The attributes with highest score were color (94%), texture (90%), and the acceptance was 90.2%. Under the applicable regulations, the analyzed cupcakes were microbiologically safe and had the appropriate physicochemical characteristics, and consumer acceptance of cupcake was high.

Keywords: Cupcacke, Amaranth, Functional food

RESUMEN
Los productos de panadería forman parte de la dieta del mexicano, y están preparados a bse de harina refinada de trigo, la cual tiene un índice glicémico alto. El pan aporta bastantes calorías dado su contenido de grasas y carbohidratos simples, contribuyendo al aumento de peso en el consumidor; y en ocasiones provoca enfemedades, como lo son la diabetes y obesidad. Por ello es importante desarrollar alimentos con nutracéuticos y productoscon bajo IG; como lo es la haarina de amaranto, tiene un alto conenido de los 8 aminoácidos esenciales, además de peptides antioxidants, fibra soluble e insoluble, que también está presente en la avena, y la harina de arroz tiene almidón con características favorables, para la industria de panificación. Dadas la características mencionadas del amaranto, avena y arroz, su consume ayuda a prevenir enfermedades como cancer de colon, diabetes, dislipidemia; son libres de gluten por lo cual pueden ser consumidos por celiacos. Como ingredients se usaron harinas de amaranto, avena y arroz, además de leche, huevo, aceite y azúcar. Siguiendo la normatividad Mexicana, al cupcake se le realizaron evaluaciones fisicoquímicas (humedad, cenizas, protein cruda, grasa, actividad de agua, fibra cruda y color CieLab), microbiologicas (bacterias mesófilas erobias, mohos y levaduras, coliformes totals y *Salmonella* spp.); se evaluó la preferencia y aceptación del consumidor usando una escala hedónica de 5 puntos (1=disgusta mucho y 5=gusta mucho), un panel de 40 jueces no entrenados. Resultados: Proteína 5.10%, grasa 15.27%, Carbohidrtos totales 52.39%, Fibra 2.88%, Aw 0.91, humedad 23.47%, y los components del color Chroma 35.3301 y L 62.32. Los datos obtenidos de la evaluación microbiológica fueron: bacterias mesófilas aerobias <10 UFC/g, total coliforms <10UFC/g, mohos y levaduras <10UFC/g, y *Salmonella* spp. ausente en 25 g; estos resultdos están dentro de la Noromatividad Mexicana. El atributo de color fue el mejor evaluado (94% de preferencia), textura (90%), y la aceptación en general fue de un 90.2%. Se logró un pan sin harina de trigo ni leudantes, con las evaluaciones fisicoquímicas y microbiológicas se determina la calidad del producto, y con una aceptación arriba del 90% en sus atributos de color, olor, sabor y textura por parte del consumidor.

Palabras Clave: Cupcacke, Amaranto, alimentos funcionales

INTRODUCCIÓN

En México, la panificación está ligada a la conquista de los españoles quienes trajeron el trigo y los procesos para transformarlo en alimento, y poco a poco estos productos fueron introducidos a la dieta diaria del mexicano. La harina refinada tiene alto índice glicémico (IG), por lo que el consumo de este tipo de pan en exceso a ayudado a la aparición de enfermedades crónicas como lo son la obesidad, la diabetes y la hipertensión, estas últimas por lo general están ligadas la una a la otra [1,2].

Las harinas de amaranto, avena y arroz fueron seleccionadas como materias primas, por sus valores nutricios y sus capacidades para la producción de pan, además en específico se seleccionó al amaranto por la historia que tiene en nuestro país, ya que el amaranto es un grano que se consume desde épocas prehispánicas y a través de los años ha perdido su valor cultural pero no su valor nutricional, el cual se muestra superior en aminoácidos tales como la lisina [3].

La avena contiene un tipo de fibra soluble característico que ayuda al control de colesterol en la sangre, además de ser un buen promotor de la notabilidad intestinal, lo cual es favorable para la salud. El arroz

tiene de igual forma fibras solubles como la avena, pero éste tiene almidones comparables a los del trigo que a final de cuenta son necesarios en la producción de pan [4, 5].

En resumen, el consumo desmedido y mala alimentación contribuye al aumento de peso en el consumidor padecer enfermedades como la diabetes y la obesidad. Por ello es importante desarrollar productos que incorporen harinas de bajo IG y con propiedades funcionales. Y el objetivo del presente trabajo fue: Diseñar, desarrollar y evaluar un panque con harinas de amaranto, avena y arroz con propiedades funcionales.

METODOLOGÍA

Para el desarrollo del pan se seleccionó un proceso de la panificación que permitiera el uso y aprovechamiento de las propiedades reológicas de las harinas de amaranto, arroz y avena en conjunto, utilizando además otras materias primas tales como huevo, aceite, azúcar y leche. Se procede al diseño de la formulación utilizando una técnica en donde se inyecta aire a la formula por medio del batido de los huevos en emulsión con el azúcar llamado blanqueado, este método permitió descartar el uso de leudantes y aprovechar el almidón presente de forma natural en las harinas. Se emplearon charolas y capacillos para cupcakes.

Para la evaluación de parámetros fisicoquímicos y microbiológicos se empleó la metodología establecida por la NOM-247-SSA1-2008. Los parámetros evaluados fueron: proteínas, lípidos, Carbohidratos, fibra, minerales, vitamina A, colesterol, Actividad d agua (Aw) y color CieLab, Los valores de la determinación de color son el resultado de 10 mediciones con el colorímetro Minolta, se midió en la superficie de la corteza (SC), en la superficie lateral (SL) y en la superficie inferior (SI) del cupcake en la corteza; los microbiológicos: Bacterias mesófilas aerobias, coliformes totales, hongos y levaduras, y *Salmonella* spp. [6].

Para la evaluación sensorial del pan, se diseñó un cuestionario y se llevó a cabo con la participación de 99 jueces voluntarios, no entrenados, quienes evaluaron los atributos de:color, aroma, sabor y textura mediante una escala hedónica de 5 niveles [7]. El instrumento empleado para la evaluación fue un cuestionario en donde se preguntó ¿Cuánto le gusta? enfocada a cada uno de los atributos evaluados y con las opciones de respuesta de: me gusta mucho, me gusta, me es indiferente, me disgusta y me disgusta mucho [8]. Se realizó una comparación de medias de las evaluaciones de los atributos en conjunto mediante Fisher ($p \leq 0.5$).

RESULTADOS

El producto obtenido fue un pan esponjoso de color amarillo característico del amaranto, también se puede diferenciar el sabor de la avena en combinación con el amaranto. El pan tuvo un peso aproximado de 50 g por pieza.

Los valores obtenidos de la evaluación de los parámetros fisicoquímicos se encuentran dentro de los parámetros de acuerdo a lo establecido en la NOM-247-SSA1-2008, se logró determinar alto contenido de proteína en el producto y baja actividad de agua lo cual beneficia a la larga vida de anaquel (ver cuadro 1). La Aw obtenida fue de 0.916. El valor de L en SC fue de 58.245 y el croma de 32.5701, el valor de L en SL fue de 63.6267 y el croma de 33.2622, y en la SI, L fue de 62.3233 y croma de 35.3301.

Cuadro 1. Composición nutrimental.

Componente	Cantidad en 100g
Energía (Kcal)	22.2912
Proteína (g)	5.0959
Lípidos (g)	15.2732
Hidratos de carbono (g)	52.3861
Fibra (g)	2.8764
Calcio (mg)	37.6214
Hierro (mg	0.9138
Sodio (mg)	15.1834
Índice glicémico	7.5828
Vitamina A µg RE	8.4298
Colesterol	1.6171

Los resultado obtenidos en las determinaciones microbiológicas aseg(veer cuadro 2)uran la inocuidad microbiológica del cupcake, dado los valores obtenidos y aquellos que marca la NOM-247-SSA1-2008.

Cuadro 2 Determinaciones microbiológicas

Determinaciones	Resultados	Límite permisible NOM-247-SSA1-2008
Bacterias mesófilas aerobias	Menos de 10 UFC/g	5 000 UFC/g
Coliformes totales	Menos de 10 UFC/g	20 UFC/g
Hongos y levaduras	Menos de 10 UFC/g	50 UFC/g
Salmonella spp.	Ausencia	Ausencia

De acuero a los resulados obtgenidos en la evaluación sensorial, el cupcake tuvo una muy buena aceptación en la población evaluada, destacando una aceptación del 90% en la mayoría de sus atributos (Figura 1).

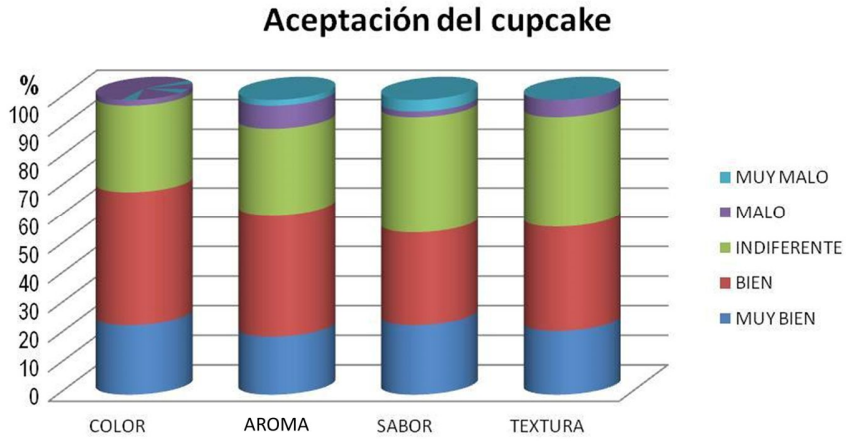


Figura 1. Porcentaje de aceptación de los atributos de color, aroma, sabor y trextura.

CONCLUSIONES

El diseño y desarrollo del alimento se logró, teniendo un pan sin harina de trigo ni leudantes, diversificando los alimentos a base de amaranto, arroz y avena; con las determinaciones, fisicoquímicas y microbiológicas se determina la calidad del producto, respecto a la evaluación sensorial se obtuvo una aceptación arriba del 90% en sus atributos de color, olor, sabor y textura por parte del consumidor .

REFERENCIAS

[1] Hirsch, S., Barrera, G., Leiva, L., Maza, M.P., Bunout, D., (2010). Índice glicémico e insulinémico de dos tipos de pasta de presentación larga y corta en individuos sanos. Revista Chilena de Nutrición 37(4): 474-479.

[2] Koh, B.P., Franz, M., Sampson, L., Liu, S., Jacobs, D.R., Spiegelman, D., Willett, W. y Rimm, E., 2004. Changes in whole-grain, bran, and cereal fiber consumption in relation to 8-year weight gain among men. American Journal of Clinical Nutrition. 80:1237-125.

[3] Tapia, M.E., (2000). Cultivos andinos sub-explotados y su aporte a la alimentación. Editores: Izquierdo-Fernández, J., Mujica, A., Jacobsen, S.E., Marathee, J.P., Morón, C., Editorial FAO. Versión electrónica. http://www.rlc.fao.org/es/agricultura/produ/cdrom/contenido/libro01/Cap7.htm, Consulta 2/Mar/2012.

[4] Zuleta, A., Binaghi, M.J., Greco, C.B., Aguirre, C., De la Casa, L., Tadini, C., Ronayne de Ferrer, P.A., (2011) Diseño de panes funcionales a base de harinas no tradicionales Revista Chilena de Nutrición 39(3): 58-64 Disponible en: http://www.scielo.cl/pdf/rchnut/v39n3/art09.pdf

[5] Wood, P.J., Weisz, J. y Fedec, P., 1991. Potential for β-glucan enrichment in brans derived from oat (Avena sativa L.) cultivars of different (1à3), (1à4)-β-D glucan concentrations. Cereal Chemistry, 68:48

[6] NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-247-SSA1-2008, productos y servicios. Cereales y sus productos. Cereales, harinas de cereales, sémolas o semolinas. Alimentos a base de: cereales, semillas comestibles, de harinas, sémolas o semolinas o sus mezclas. Productos de panificación.

Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales. Métodos de prueba. Diario Oficial de la Federación, México D.F., 27 de Julio, 2009

[7] Daniel, L., Pedro, F., y Rose, M.P., 1989. Evaluación sensorial de los alimentos. Métodos analíticos, Editorial Alhambra Mexicana, pp 106 y 107.

[8] Vignoni, L., Bauzá, M., Mirábile, M., Herrera, M.C., Bartucciotto, C., (2003). Evaluación sensorial de mermeladas de tomate de color no tradicional. Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias UNCuyo, 35(1): 43-49. –http://bdigital.uncu.edu.ar/objetos_digitales/1918/vignoniagrarias35-1.pdf, Consulta 19/Mar/2012.

QUALITY PARAMETERS, POLYPHENOLIC COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF FRESH SYCONIUMS OF COMMON FIG (*Ficus carica* L.)

(Parámetros de calidad, compuestos polifenólicos y actividad antioxidante de siconos frescos de Higuera común (*Ficus carica* L.)

Yazmin Zaragoza-Peralta[a*+], Víctor Conde-Martínez[a], Rubén San Miguel Chávez[a], Alfredo López Jiménez[b], Guillermo Calderón Zavala[b].

[a] Departamento de Botánica. Colegio de Postgraduados. Campus Montecillo. Km 36.5 Carretera México-Texcoco. 56230, Montecillo, Texcoco, Estado de México, México.
[b] Departamento de Fruticultura. Colegio de Postgraduados. Campus Montecillo. Km 36.5 Carretera México-Texcoco. 56230, Montecillo, Texcoco, Estado de México, México.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: zaragoza.yazmin@colpos.mx

Área del Conocimiento: Q. Alimentos.

ABSTRACT
The syconiums (infructescence) of common fig (*Ficus carica* L.) provide major benefits to the Mediterranean diet due to their high levels of natural nutrients and antioxidant compounds (polyphenols). The polyphenolic compounds scavenge free radicals, thus inhibiting the oxidative mechanisms that may lead to degenerative illnesses. In Mexico, the qualitative and quantitative composition of these compounds and quality parameters are unknown. The objective of this work was to evaluate the quality parameters, polyphenolic compounds content and antioxidant activity in syconium skin (dark purple) and pulp harvested at four collection sites (Xochiapulco, Xalostoc, Actopan and Texcoco. México). The weight, size, skin color, firmness and total sugar were the parameters measured in syconiums at physiological maturity stage. The phenolics, anthocyanins, flavonoids, condensed tannins total content, and antioxidant activity were determined by colorimetric methods. The results showed that the weight, size, skin color, and total sugar varied with the collection site. The syconium skin had the highest polyphenols concentration, such as anthocyanins with values of 17.29 to 144.20 mg pelargonidin chloride equivalents/100 g FW, followed by flavonoids (28.3 to 63.3 mg catechin equivalents/100 g FW). The highest antioxidant activity was of 82% for phenolic extracts of skin. Dark purple-skinned syconiums are potential fruits with nutraceutical properties.

Keywords: *F. carica* L., syconiums, quality, antioxidant activity, anthocyanins.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

PAPRIKA OLEORESIN AS A DYE AND PRESERVATIVE IN THE DEVELOPMENT OF A SOY SAUSAGE

(Oleorresina de pimiento como colorante y conservador en la elaboración de chorizo de soya)

Alma Vázquez-Luna [a,b*+], Cristian Ulises Arbez-Evangelista[b*], Alma E. Díaz-Vázquez[c], Rafael Díaz-Sobac[a, b]

[a] Instituto de Ciencias Básicas, Universidad Veracruzana. Xalapa 91000, Veracruz, México.
[b] Facultad de Química Farmacéutica, Universidad Veracruzana. Xalapa 91090, Veracruz, México.
[c] Facultad de Nutrición, Universidad Veracruzana. Veracruz 91700, Veracruz, México.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: almvazquez@uv.mx

Área del Conocimiento: Q. Alimentos.

ABSTRACT
The food market today demands a wide range of healthy products that provide diversified and innovative services; as a result of this trend now new purchase options are offered based on raw materials such as soy. The search for natural dyes that are competitive and commercial nutritionally needed to offer new alternatives to population trends requiring consumption of natural and safe products. The objective was to develop a traditional food use (sausage) made from textured soy and oleoresin paprika as bifunctional agent (dye and conservative). The finished product will be determined by thermobalance moisture, protein by Kjeldahl, Soxhlet fat and total fiber according to the AOAC. Sensory evaluation was also conducted by a facial sensory test. Conventional ingredients for such products were used. Once the homogeneous mixture was filled into a collagen membrane thickness of 40µm. Protein concentration of 36.72±1.9%, moisture 3.83±0.31% and total fiber of 2.03±0.15%, approximate values were variations to 5% during 30 days of storage was determined. As for the sensory evaluation for 70% of 30 untrained panelists liked them the appearance and taste of the product. A sausage of soy was obtained using oleoresin paprika as dye, which kept the protein content also have less total fat than existing products on the market.

Keywords: soy, papikra oleorresin, sausage

RESUMEN
Actualmente el mercado de alimentos exige una amplia gama de productos saludables que proporcionen servicios innovadores y diversos, como resultado de esta tendencia nuevas opciones de compra se ofrecen basadas en materias primas como la soja. Por otra parte la búsqueda de colorantes naturales que sean comercial y nutricionalmente competitivos, para ofrecer nuevas alternativas a la población que requiere de consumo de productos inocuos. El objetivo del presente trabajo fue desarrollar un alimento tradicional (chorizo) a base de un texturizado de soja y oleorresina de pimentón como agente bifuncional (colorante y conservador). Se le determinó al producto final humedad por termobalanza, proteína por Kjeldahl, grasa por Soxhlet y fibra total según la AOAC. También se llevó a cabo una evaluación sensorial por una prueba sensorial facial. Se usaron ingredientes convencionales para dichos productos. Una vez que la mezcla se homogenizó, se introdujo en una membrana de colágeno de 40µm de espesor. La concentración de proteína fue de 36.72 ± 1.9%, la humedad 3.83 ±

0.31% y la fibra total de 2.03 ± 0.15%, las concentraciones anteriores tuvieron variaciones de 5% aproximadamente después de 30 días de almacenamiento. En cuanto a la evaluación sensorial al 70% de los 30 panelistas no entrenados les gustó la apariencia y el sabor del producto. Se obtuvo un chorizo de soja de excelente calidad utilizando oleorresina de pimiento como colorante, lo que mantuvo el contenido de proteínas durante el tiempo de almacenamiento, además de que tuvo menos grasa total que los productos existentes en el mercado.

Palabras Clave: soja, oleorresina de pimiento, chorizo .

INTRODUCCIÓN

En la actualidad la demanda de la población consumidora de productos procesados recurre a una amplia gama de productos saludables y que en su composición existan menos agentes conservadores de origen sintético [1], como resultado de esta tendencia ahora se ofertan nuevas opciones de compra con base en materias primas como la soya y sus derivados proteicos, que satisfacen las necesidades actuales [1,2]. Cuando se habla de proteínas de un alimento, es importante hablar de su calidad y función biológica, en la soya encontramos principalmente aminoácidos como la leucina, valina, isoleucina, cisteína, tirosina, treonina entre otros [2,3]. Lo anteriormente mencionado ha llevado a la soya ser una leguminosa de alta calidad nutricional, utilizada inclusive para fortificar productos tipo harina proveniente de maíz y trigo [3].

El consumo de soya en la población se considera benéfica debido a que se ha demostrado que su consumo disminuye 9.3% del colesterol LDL y 10.5% de triglicéridos [4], además de ser un recursos importante para la población vegetariana en cuanto al consumo de proteína no animal [4]. El objetivo fue desarrollar un alimento tradicionale (embutido) utilizando soya texturizada y oleorresina de paprika como agente bifuncional (colorante y conservador).

METODOLOGÍA

Se preparó una mezcla base compuesta por soya y aceite vegetal, la cual se entremezclo con la oleorresina de Paprika, procediendo con la metodología este producto se mezcló con especies e ingrediente como cebolla, clavo, sal yodata, orégano, pimienta y comino, se refrigeró a 4 º C por 24 horas y se procedió a su molienda y empacamiento en una membrana comestible. Para evaluar si las propiedades intrínsecas de la soya se conservaban posterior al tratamiento, se hicieron determinaciones al producto terminado como fueron: determinación de proteínas, humedad y fibra total. También se realizaron pruebas organolépticas, para determinar la aceptabilidad del producto determinado.

RESULTADOS

Tabla 1. Valores obtenidos de las determinaciones realizadas al producto terminado

Determinación	**Valores en producto terminado** (g/100g)
Proteínas totales	36.72±1.9%

Fibra Total	2.03±0.15%
Humedad	3.83%3.83±0.31%

ANÁLISIS SENSORIAL

Los resultados obtenidos para la evaluación sensorial se presentan en la Figura 1 como podemos el 70% de los panelistas aceptaron el producto terminado, algunos de los comentarios expresados por los panelistas que no les agrado el producto fueron: “falta sal” o “textura fibrosa”, lo cual era de esperarse por la materia prima utilizada para la elaboración del producto.

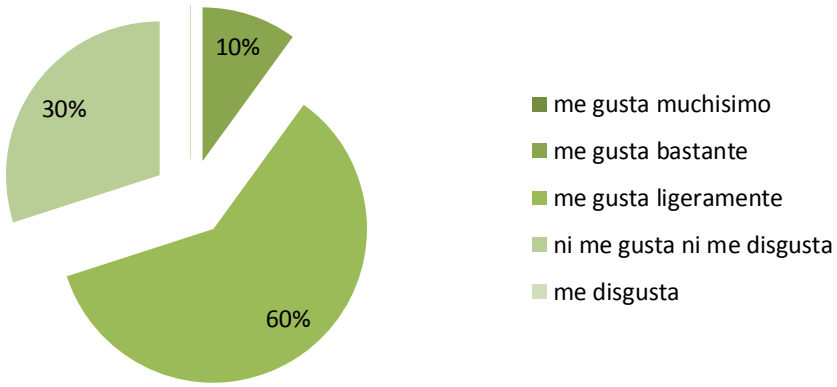


Figura 1.- Porcentaje de personas encuestadas y su criterio hacia el producto.

DISCUSIÓN

Los datos obtenidos en producto terminado muestran valores aceptables para éste tipo de producto, el producto tiene un porcentaje de humedad bajo que no lo hace poco propenso al ataque de hongos. Lo más destacable es el contenido de proteínas, ya que el valor que se obtuvo fue alto y le da un valor agregado al producto terminado. Parámetros como la fibra indicó que durante la elaboración del embutido no sé modificó el valor normal de la fibra de la soya utilizada, esto obedeció a que el producto no fue expuesto a altas temperaturas, lo que podría haber desnaturalizado las estructuras proteicas. La evaluación sensorial reflejó que nuestro producto no alcanzó el sabor de un embutido cárnico, sin embargo, fue aceptado por la mayoría de los encuestados, esto se podría corregir incorporando a la mezcla un potenciador de sabor y en cuanto a la percepción fibrosa, una alternativa sería una molienda más fina del producto. Estudios posteriores podrán determinar si la vida de anaquel de este producto es la adecuada y si el uso de un potenciador de sabor podrá mejorar la aceptabilidad del consumidor.

CONCLUSIÓN

Se obtuvo un embutido a base de soya usando como colorante la oleorresina de paprika rico en proteínas, además de contener menos grasas vegetales y menos sal, agradable al consumidor que resulta una alternativa de consumo para personas que no incluyen proteína animal en su dieta diaria.

REFERENCIAS

[1] Lombeyda A.C. (2004). Desarrollo de un prototipo de chorizo con base de soya tipo embutido en la Escuela Agrícola Panamericana.(Tesis de Licenciatura, Escuela Agrícola Panamericana).

[2] Luna J.A. (2006). Valor Nutritivo de la Proteína de Soya. Rev. Investigación y Ciencia De la Universidad Autónoma de Aguascalientes; 29-34.

[3] Luna J.A. (2007). Composición Y Procesamiento De Soya Para Consumo Humano. Rev. Investigación y Ciencia De la Universidad Autónoma de Aguascalientes;35-43.

[4] Torres T. N., Tovar P.A. (2009). La Historia Del Uso De La Soya En México, Su Valor Nutricional Y Su Efecto En La Salud. Salud Publica; 246-254.

DEVELOPMENT OF A GLUTEN-FREE BREAD AND ENRICHED WITH QUINOA

(Elaboración de un pan libre de glutén y enriquecido con quinoa)

Alma Vázquez-Luna[a,b*+], B.M.L. Cruz[b*], Maricela Santiago-Santiago[c], Rafael Díaz-Sobac[a]

[a] Instituto de Ciencias Básicas, Universidad Veracruzana. Xalapa 91000, Veracruz, México.
[b] Facultad de Química Farmacéutica, Universidad Veracruzana. Xalapa 91000, Veracruz, México.
[c] Posgrado en Ciencias Alimentarias, Instituto de Ciencias Básicas, Universidad Veracruzana

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: almvazquez@uv.mx

Área del Conocimiento: Q. Alimentos.

ABSTRACT

Advances in nutrition science, food chemistry and medicine has revealed some of the causes of diseases that currently afflict the world population, such as obesity, diabetes and cardiovascular disease. Quinoa, for high nutritional value, it is looking for new applications in the food industry because it has higher qualities cereals and grasses. The objective of this work was the development of a food product with functional food characteristics. Rice flour and quinoa were acquired in a shop, for breadmaking was used edible sunflower oil and was baked at 180°C. The finished product will be determined by Kjeldahl protein, fats by Soxhlet thermobalance moisture, ash by direct calcination and gluten as a control, in addition to microbiological tests corresponding to the NOM-110-SSA1-1994, facial sensory evaluation and shelf life. The results obtained were 32.8±2.1% protein, 20.1±1.4% fat, 1.4±0.15% ash and 5.2±0.38% moisture values are within those specified for these products and fell within generally 5% after 30 days of storage at 24°C. As for microbiological analyzes it determined that was free from fungi and molds at baseline and after one month of storage.

Keywords: quinoa; without gluten; rice flour.

RESUMEN

Los avances en las ciencias de la nutrición, química de los alimentos y la medicina ha puesto de manifiesto algunas de las causas de las enfermedades que actualmente aquejan a la población mundial, como la obesidad, la diabetes y las enfermedades cardiovasculares. Por su alto valor nutricional de la quinoa se están buscando nuevas aplicaciones en la industria alimentaria, ya que tiene cualidades superiores a los cereales y las gramíneas. El objetivo de este trabajo fue el desarrollo de un producto alimenticio con características de los alimentos funcionales. Para la fabricación del pan fueron adquiridos en una tienda de conveniencia; aceite de girasol, harina de arroz y quinoa, estos se mezclaron y se hornearon a 180 °C. Al producto final se le determinaron proteínas por Kjeldahl, grasas por Soxhlet humedad con termobalanza, cenizas por calcinación directa y el gluten como control, además de las pruebas microbiológicas correspondientes a la NOM-110-SSA1-1994, evaluación sensorial mediante una prueba facial y vida útil. Los resultados obtenidos fueron 32.8 ± 2.1% de proteínas, 20.1 ± 1.4% de grasa, 1.4 ± 0.15% de cenizas y 5.2 ± 0,38% de humedad, los valores se encuentran dentro de los especificados para estos productos y disminuyeron en promedio un 5% después de 30 días de

almacenamiento a 24 °C . En cuanto a los análisis microbiológicos se determinó que estuvo libre de hongos y mohos al inicio del estudio y después de un mes de almacenamiento.

Palabras Clave: quinoa, libre de gluten, harina de arroz.

INTRODUCCIÓN

El avance en las ciencias de la nutrición, química de alimentos y medicina ha permitido conocer algunas de las causas de las enfermedades que actualmente aquejan a la población mundial, como son la obesidad, diabetes y enfermedades cardiovasculares; que también se presentan en México. En el área de la nutrición se sabe que el consumo de alimentos procesados con altos contenidos de grasas parcialmente hidrogenadas como las margarinas y mantecas (grasas trans) elevan el nivel de lipoproteínas de baja densidad promoviendo las enfermedades cardiovasculares. Si se habla de hidratos de carbono, se sabe ahora que aquellos que se clasifican como rápidamente disponibles o con elevado índice glucémico están relacionados con la obesidad y que lo mejor es ingerir aquellos con bajo índice glucémico. En el campo de los lípidos se recomienda ahora aumentar la ingestión de ácidos grasos. Finalmente, es recomendable el consumo de fibra dietética; además de frutas, y verduras que contienen antioxidantes.

Una de las áreas que permite elaborar productos saludables es la panificación; principalmente, porque el pueblo mexicano tiene un gran gusto por el pan. A la quinoa, por su alto valor nutricional, se le están buscando nuevas aplicaciones en la industria alimentaria aprovechando sus cualidades nutricionales superiores a los cereales y gramíneas [1]. El objetivo de este trabajo fue el desarrollo de un producto alimenticio con características de alimentos funcionales

METODOLOGÍA

Las harinas de quinoa y arroz fueron obtenidas de un centro de distribución de productos naturales de la Cd. de Xalapa-Enríquez.

Determinación de cenizas

Método por calcinación directa.

Se debe pesar aproximadamente la cantidad de 0.5 a 1.5 g de muestra (seca o húmeda) en un crisol de peso conocido. Posteriormente, se carbonizó la muestra contenida en el crisol lentamente con el mechero bunsen y se llevó el crisol a la mufla a 500°C [2].

Determinación de proteínas

Método de Kjendahl-Gunning.

Para la digestión se pesó la cantidad de 0.5g de muestra la cual se colocó en el tubo Kjendahl, se adicionaron 12mL de ácido sulfúrico y las tabletas para el digestor. Posteriormente se procedió a realizar la destilación, pasando la muestra previamente digestada al contenedor del destilador y sin agitar se agregaron 25mL de solución de hidróxido de sodio 10 N. Se retiró el matraz cuando hubo un vire del color en la solución con ácido clorhídrico y el indicador. Se retiró el matraz y se tituló con NaOH 0.1N [3].

Determinación de grasas

Método de soxhlet

Se utilizó como disolvente hexano, el porcentaje de grasas calculado fue por diferencia de peso entre el matraz seco y después de tres horas de tener en reflujo un gramo de muestra.

Determinación de humedad

Por diferencia de peso colocando un gramo de muestra en un vaso de precipitado a peso constante durante 48 horas

Análisis microbiológicos

Se realizaron en base a las siguientes normas oficiales mexicanas: [4] NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-110-SSA1-1994. [5] NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-247-SSA1-2008.

RESULTADOS

En la Tabla 1 se presentan los resultados obtenidos para cada una de las determinaciones realizadas por triplicado y a seis diferentes lotes de producto elaborado.

Tabla 1. Resultados obtenidos para las diferentes determinaciones realizadas

Determinación	**Porcentaje obtenido (g/100g)**
Cenizas	1.4±0.15%
Proteínas	32.8±2.1%
Grasas	20.1±1.4%
Humedad	5.2±0.38%

Análisis microbiológicos

De manera general los panqués se encontraron dentro los parámetros aceptados por las normas oficiales mexicanas permitidas para alimentos. De acuerdo a los diferentes análisis microbiológicos que se realizaron.

Tabla 2. Límites para los distintos microorganismos que podrían estar presentes en el producto elaborado.

Bacterias mesofílicas aerobias	**Organismos coliformes totales**	**Mohos y levaduras***
100 UFC/g	<10 UFC/g	<10 UFC/g

*Debe determinarse únicamente en el producto lo que contenga relleno o cobertura a base de huevo, leche, crema pastelera u otro alimento preparado.

Tabla 3. Límites para los microorganismos patógenos que podrían presentarse en el producto elaborado.

Especificaciones	**Límite máximo**

Mesofílicos aerobios	5000 UFC/g
Coliformes totales	20 UFC/g
Staphylococcus aureus	< 100 UFC/g

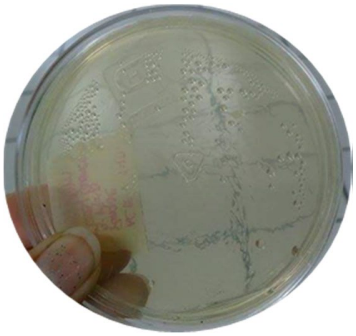


Figura 1. Agar cuenta estándar para determinar bacterias mesofílicas aerobias.



Figura 2. Agar dextrosa y papa acidificado con ácido tartárico, utilizado para determinar mohos.

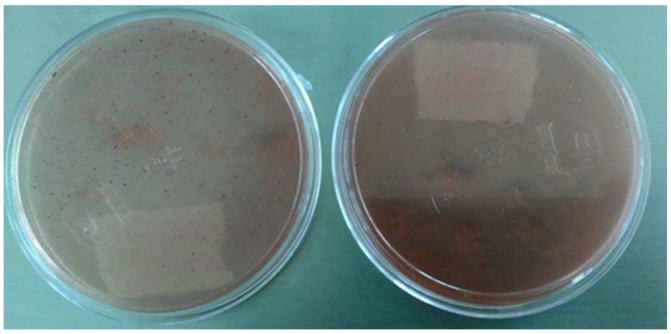


Figura 3. Ambas figuras (A y B) son agar rojo violeta bilis para determinar colonias de coliformes.

DISCUSIÓN

Las diferentes determinaciones realizadas para los panquecitos elaborados a partir de quinoa, dieron resultados en promedio aceptados dentro de las características inherentes a éste tipo de productos. El

porcentaje de proteína final fue alto lo que permite recomendar ampliamente al consumidor este tipo de productos, lo que cumpliría con el objetivo de ser funcional y del agrado no nadamas para personas vegetarianas y veganas, sino para el público en general que requieran de un aporte proteíco diario. En cuanto a los análisis microbiológicos, éstos dieron negativos para bacterias mesofílicas aerobias, mohos y coliformes, lo que indica que el producto es libre de bacterias patógenas, durante treinta días que se almacenaron a temperatura ambiente en bolsas de celofán. En estudios posteriores se deberá determinar el tiempo de anaquel para cual sería el tiempo óptimo de consumo del producto, sin embargo, podemos afirmar que para un producto que normalmente se consume fresco, treinta días es un tiempo más que suficiente.

CONCLUSIÓN

Se desarrolló un producto alimenticio con características propias de un alimento funcional, con un contenido importante de proteínas, libre de gluten y con una vida de anaquel superior al pan que se vende comercialmente en las panaderías.

REFERENCIAS

[1] Magno, M. (2006) Composición química y valor nutricional del grano de quinoa y derivados. Instituto de Desarrollo Agroindustrial (INDDA).

[2] NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-110-SSA1-1994, Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

[3] NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-247-SSA1-2008, Productos y servicios. Cereales y sus productos. Cereales, harinas de cereales, sémolas o semolinas. Alimentos a base de: cereales, semillas comestibles, de harinas, sémolas o semolinas o sus mezclas. Productos de panificación. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales. Métodos de prueba.

[4] Hart, F.L. y Fisher, H.J. (1991). Análisis moderno de los alimentos. (2ª reimpresión). España: Acribia, 320, 650.

[5] NORMA Oficial Mexicana NOM-131-SSA1-1995, Bienes y servicios. Alimentos para lactantes y niños de corta edad. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales.

DEVELOPMENT AND EVALUATION OF A POTENTIAL FUNCIONALITY CANDY BASED ON PEANUT AND ORGANIC COFFEE

(Desarrollo y evaluación de una golosina con potencial de funcionalidad, tipo mazapán, a base de cacahuate y café orgánico)

Evelin Solís-Sánchez[a]*, Severiano Patricio-Martínez[b], María Leonor Valderrama-Cháirez[b]

[a]Estudiante de la Licenciatura en Ciencia de los Alimentos de la Benemérita Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Camino Ramón Padilla Sánchez 2100, Nextipac, C.P. 44600 Zapopan, Jal. +52 (33)3777 1150 ext 33041.
[b]Profesores del Departamento de Salud Pública, División de Ciencias Veterinarias de la Benemérita Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Camino Ramón Padilla Sánchez 2100, Nextipac, C.P. 44600 Zapopan, Jal. +52 (33)3777 1150 ext 33041.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: evesolis27@gmail.com

Área del Conocimiento: Q. Alimentos.

ABSTRACT
Nowadays, the trend in the consume habits and nutrition of the people are the products that provide health benefits and pleasure (delight). Mexico is one of the countries with the highest rates of obesity, hypertension and diabetes. Therefore, a functional candy type marzipan with peanuts and organic coffee was developed. Two formulations (F1 and F2) were carried out varying the coffee and sugar content in each formulation. Sensory evaluation was performed by measuring the following attributes: color, aroma, flavor and graininess. Fat and protein were determined by Soxhlet and Kjeldahl officila methods, and the shelf life was estimated by sensory evaluation measuring: color, texture and aroma. The candy type marzipan was accepted by the 98 % of the surveyed universe, being F2 the most accepted. The F1 protein content was 12,9 +-0,3 g and F2 13,9 +-1,3 g. The fat content was 26,5 +-0.15 g for F1 and 25,3 +- 2,5 g for F2 respectively. The desire candy was obtained, and it was possible to add granulated organic coffee without interfering in the compaction and texture of the candy, as well as it liked to the surveyed universe.

Keywords: Organic coffee, antioxidants, nutritional content, marzipan.

RESUMEN
Actualmente la tendencia en la alimentación de las personas son los productos que aporten beneficios a la salud, y productos placer.
México es uno de los países que presentan mayores índices de obesidad, hipertensión y diabetes. Por este motivo, se desarrolló una golosina funcional tipo mazapán, con cacahuate y café orgánico.
Se realizaron dos formulaciones (F1 y F2) variando el contenido de café y azúcar en cada formulación. Se realizó una evaluación sensorial midiendo los atributos: color, roma, sabor y granulosidad. Se determinó grasa y proteína por Soxhlet y Kjendal, y se estimó la vida de anaquel mediante evaluación sensorial midiendo los atributos: color, textura y aroma. La golosina tipo mazapán fue aceptada por el

98% del universo encuestado. El contenido de proteína de F1 fue: 12,9 ± 0,3; de F2: 13,9 ± 1, 3. El contenido de grasa fue F1: 26,5 ± 0,15; de F2: 25,3 ± 2,05.
Se obtuvo la golosina esperada dado que se pudo agregar el café orgánico granulado sin que interfiriera en la compactación y gustó al universo encuestado.

Palabras Clave: Café orgánico, antioxidantes, contenido nutricional, mazapán.

INTRODUCCIÓN

El café (*Coffea arabica* L.) es el fruto proveniente del cafeto. Históricamente, se originó en tierras altas (más de 1 000 m.s.n.m.) de Etiopia y Sudan, en el continente Africano [1].

Su introducción en México se dio con la llegada de los conquistadores, mientras que la producción de manera orgánica en México se inicia a partir de 1963, en la finca llamada "Irlanda" ubicada en Tapachula, Chiapas; ya en 1967 se obtiene la primera cosecha orgánica**,** certificada por la empresa alemana Demeter Bund [2]. Orgánico es el término dado a la producción que promueve la mejora de la biodiversidad, los ciclos biológicos, incorporación de materia orgánica al suelo para cultivos saludables sin uso de químicos [3].

De las distintas variedades existentes en el mundo, el café arábigo se distingue por ser suave, con gran aroma, acidez, un cuerpo mediano, agradable bouquet y exquisito sabor [4], así como su alto contenido de antioxidantes, al igual que el cacahuate (*Arachis hypogaea* L.).

El cacahuate, originario de las regiones cálidas de América, Brasil, Las Antillas y México, es reconocido por su valor nutricional y su contribución benéfica a la salud, ya que se considera que sus ácidos grasos ayudan a reducir los niveles de colesterol en sangre y contribuyen al buen funcionamiento cerebral. Entre otros beneficios, estas grasas se convierten más fácilmente en energía [5].

Contiene también vitamina E que puede inhibir la oxidación del LDL; complejo B y arginina que contribuyen a la prevención de las enfermedades cardiovasculares, así como cobre y magnesio, importantes para la fijación de minerales como el calcio, y cardioprotectores como ácido elágico y resveratrol [6]. El consumo de cacahuate se limita a las botanas, golosinas y postres, al igual que el azúcar glass, producto obtenido al moler azúcar granulada con almidón de maíz con la única intención de aumentar la vida de anaquel de los productos de pastelería y confitería [7]. Ambos ingredientes cacahuate y azúcar glass son componentes principales de un dulce tradicional llamado mazapán.

El mazapán es la masa fina y compacta resultante de la mezcla o amasado de nueces y almendras con azúcar, se obtiene mediante un proceso de molido, batido o moldeado manual o mecánico de las masas, puede ser horneado o no, dependiendo del resultado que se desee obtener [8]. Así pues, los alimentos y productos funcionales son aquellos que pueden ejercer una influencia beneficiosa sobre las funciones fisiológicas al mejorar el estado de bienestar y salud, y reducir el riesgo de enfermedad, por ciertos compuestos que van más allá de lo nutritivo [9].Por la problemática de obesidad, sobrepeso y estrés oxidativo, las tendencias actuales son el consumo de alimentos saludables-funcionales, por esta razón, el objetivo fue desarrollar una golosina funcional que contrarreste y/o reduzca tales efectos negativos a la salud.

MATERIALES

El cacahuate utilizado es producido en La Ciénega de la Costa Sur de Jalisco, donde emplean métodos tradicionales y orgánicos para la producción de cacahuate; es tostado por aire caliente.

El café orgánico es Oro Maya® de Chiapas con certificaciones: USDA Organic, OCIA, Demeter, Control IMO y Bird Friendly.

El azúcar glass es Zulka®, de Zucarmex®, con certificación Kosher México.

Para el desarrollo del mismo se emplearon: 1 báscula digital para cocina, bowls y diversos artículos de cocina hechos de acero inoxidable y un molino manual, equipo Kjeldahl y equipo Soxhlet.

MÉTODOS

El desarrollo del producto se llevó a cabo en los laboratorios de fisicoquímica alimentaria y de gastronomía del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Benemérita Universidad de Guadalajara. Se desarrolló en 5 etapas:

1.-Formulación y Elaboración

Se elaboraron dos formulaciones de la golosina, las cuales consistieron en variar la cantidad de los ingredientes (± café, ± azúcar) de acuerdo a la compactación de la masa que lo conforma.

2.-Evaluación Sensorial

Los atributos evaluados fueron aroma (a café, cacahuate ó dulce), sabor (amargor, dulzor), textura (granulación del dulce en boca), apariencia y color [10].

El instrumento de evaluación empleado fue un cuestionario donde se preguntó el gusto o disgusto de cada atributo utilizando una escala hedónica estructurada; la muestra poblacional, se trató de jueces no entrenados, estuvo conformada por 60 jueces de ambos sexos, con un rango de edad de entre 30 y 70 años.

3.-Cálculo del contenido de nutrientes

Se estimó la información nutrimental del producto basándose en el Sistema Mexicano de equivalentes y en las determinaciones fisicoquímicas [11] y se comparó con la información nutrimental de un dulce comercial similar.

4.-Estimación de Vida de Anaquel

La estimación de vida de anaquel se efectuó por observación de los cambios organolépticos del producto, durante un mes [14].

5.-Evaluación Fisicoquímica

Se evaluó de la formulación con mayor aceptación el contenido de grasa por el método Soxhlet [12], el contenido de proteína por el método Kjeldahl [13].

RESULTADOS

Se obtuvieron dos formulaciones (F1, F2) en las cuales de la formulación F1 se obtuvo un color siena-beige ligeramente más claro, con sabor dulce y menos amargo, dispersos gránulos de café, ligero olor a café y muy dulce. La textura fue menos granulosa, más suave y polvosa que la F2.

De la F2 se obtuvo color sienna-beige, con sabor ligeramente amargo del café, olor fuerte a café con un ligero dulzor y textura granulosa.



Figura 1.- Formulación



Figura 2.- Formulación 2

Se encontró diferencia estadística en todos los atributos (p<0,05%) (Figura 3), siendo la formulación 2 la preferida (figura 2).

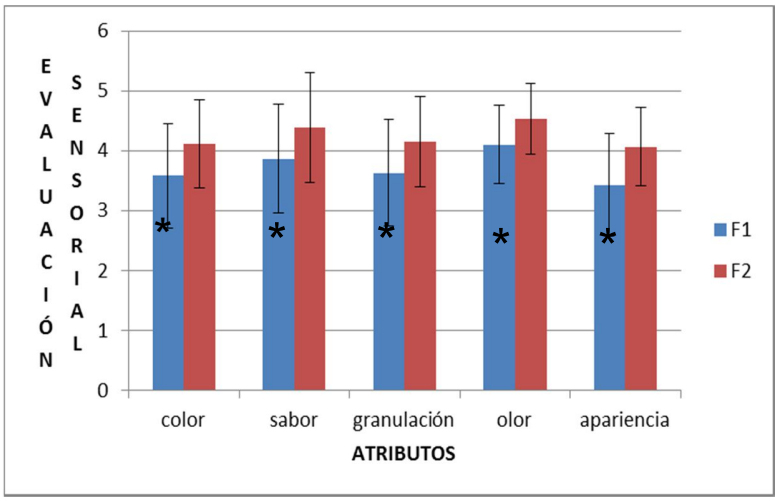


Figura 3.- Resultados de la evaluación sensorial de los atributos de las formulaciones F1 y F2 de la golosina funcional de cacahuate tipo mazapán con café orgánico.
(*)Indica diferencia estadística a un nivel de significancia del p≤5%

En cuanto al contenido calórico de la golosina, de acuerdo al Sistema Mexicano de Equivalentes y a los resultados de las pruebas fisicoquímicas, se calculó que 20 g contienen 96 kcal, 2,8 g de proteínas, 5 g de grasa, 13 g de carbohidratos, 2,1 mg de vitamina E y 24 mg de magnesio (cuadro 1).

Cuadro 1.- Contenido nutricional de la golosina con potencial de funcionalidad tipo mazapán con café orgánico

INFORMACIÓN NUTRIMENTAL	
Kilocalorías+	96
Proteína*	2.6 g
Grasa*	5 g
Carbohidratos+	13 g
Vitamina E+	2.1 mg
Magnesio+	24 mg

+[11]
*Determinación por análisis fisicoquímicos

No hubo cambios observados o percibidos en la golosina en el periodo de tiempo en el que se evaluó la vida de anaquel (1 mes).

DISCUSIÓN

El dulce desarrollado presenta 1 g más de proteína que los mazapanes existentes en el mercado debido a que se utiliza más cacahuate para su elaboración, también muestra 10 Kcal menos por porción dado a la reducción del contenido de azúcar; para la diferencia en el contenido de grasas (1 g más que el mazapán comercia) se considera también se debe al porcentaje de cacahuate que contiene el dulce, grasa insaturada, que se convierte más fácilmente en energía.
Para el caso de las vitaminas (E y complejo B) y minerales, los mismos son aportados tanto por el grano de café como el cacahuate, según Higgs, J [6].

Entre los beneficios del café y el cacahuate se les atribuye poder antioxidante [15], por lo que se considera que el dulce tiene potencial efecto antioxidante y alto nivel nutricio.

Solo se realizaron las observaciones de los cambios aparentes en el producto en un lapso de tiempo de 1 mes, durante el cual no se presentaron cambios visibles en el producto, por lo que el tiempo de viabilidad se considera suficiente para la comercialización.

CONCLUSIONES

1.- Se logró desarrollar la golosina de cacahuate tipo mazapán con café orgánico sin que el café tostado interfiriera para su compactación.
2.- El contenido de calorías y proteínas en el producto fue satisfactorio, dado que superó al dulce comercial en contenido de proteína y fue inferior en contenido calórico.

REFERENCIAS

[1] Moguel P. y Toledo V.M. (2004). “Conservar produciendo: Biodiversidad, café orgánico y jardines productivos”. Biodiversistas. CONABIO. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. 55:2-7

[2] Najera, E.O. (2002). “El café orgánico en México. Una alternativa para los productores indígenas en la economía globalizada”. Cuadernos de Desarrollo Rural. 48: Pontificia Universidad Javeriana, Colombia. pp. 71-72.

[3] Escamilla, P.E., Ruiz, R.O., Díaz, P.G., Landeros, S.C., Platas, R.D.E., Zamarripa, C.A. y González, H.V.A. (2005). “El agroecosistema café orgánico en México. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología” (Costa Rica). 76:5-14.

[4] Puerta, Q.G.I. (1998). “Calidad de las variedades de Coffea arabica L. cultivadas en Colombia”. Cenicafé. 49(4):226,269-276.

[5] Kris-Etherton, P. M., Hu. B. S., Ros, E., Sabate, J. (2007), The Role of Tree Nuts and Peanuts in the Prevention of Coronary Heart Disease: Multiple Potential Mechanisms, The Journal of Nutrition, 9(138):1-6.

[6] Higgs J. (2003), The beneficial role of peanuts in the diet –Part 2. Nutrition & Food Science, 33(2):56-64.

[7] USC. United Sugars Corporation. (2010), *Azúcar glass 6x*. pp. 1. http://www.unitedsugars.com/spanish/assets/pdf/6XPowdered.pdf.

[8] García, B.S. y Orzáez, V.M.T. (2002) El mazapán dentro de la historia de los dulces. Departamento de Nutrición y Bromatología II: Bromatología. Universidad Complutense de Madrid, 11(21):130-131 .

[9] Ashwell M. (2004), Conceptos sobre los alimentos funcionales. (ILSI) International Life Sciences Institute**,** Europe. pp 1.

[10] Cordón, O.J. (2007). Determinación acelerada de la vida de anaquel de la rosquilla hondureña. **(**Tesis de Licenciatura Ingeniero en Agroindustria Alimentaria. Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, Honduras**)**. pp 1-58. http://bdigital. zamorano.edu/bitstream/11036/576/1/T2388.pdf.

[11] Pérez, L.A.B., Palacios G.B. y Castro B.A.L. (2008). Sistema Mexicano de Alimentos Equivalentes. (Ed. Ogali). 3ra. ed. pp .77-81-89.

[12] ISPC. Instituto de Salud Pública de Chile. (2006), Procedimiento para determinar materia grasa. *Método soxhlet*. Subdepartamento Laboratorios del Ambiente. Sección Química de Alimentos. 2:1-2.

[13] ISPC. Instituto de Salud Pública de Chile. (2006), Food and Nutrition Paper. Determinación de proteínas. Método Kjeldahl. Subdepartamento Laboratorios del Ambiente. Sección Química de Alimentos. 0:1-2.

[14] Chica, C.B.A. y Osorio, S.S.l. (2003). Determinación de la vida de anaquel del chocolate de mesa sin azúcar en una película de polipropileno biorientado.(Tesis de Licenciatura Ingeniero Químico. Universidad Nacional de Colombia). pp 22-26.

[15] Carlsen, H.M., Halvorsen, L.B., Holte, K., Bøhn, S.K., Dragland, S., Sampson, L., Willey, C., Senoo, H., Umezono, Y., Sanada, C., Barikmo, I., Berhe, N., Willett, C. W., Phillips, M.K., Jacobs, R.D. y Blomhoff, R. (2010), The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. (Nutrition Journal): 9(3):1-11.

CHEMICAL CHARACTERIZATION OF FLOWER PALM *Yucca filifera*

(Caracterización química de la flor de palma *Yucca filifera*)

Rosa Eréndira Fosado Quiroz[a*], Alejandra de los Ángeles Osorio Castillo[a], María Zenaida Saavedra Leos[b], Juan Francisco Pauli Sauceda[a]

[a]Coordinación Académica Región Altiplano de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Carretera Cedral Km. 5+600, CP 78700, Ejido San José de las Trojes, Matehuala, S.L.P., MÉXICO.
[b]Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico Superior de la Región Sierra, Carretera Teapa-Tacotalpa Km 4.5, Ej. Francisco Javier, CP 86801 Teapa Tabasco, MÉXICO.
*rosa.fosado@uaslp.mx.

ABSTRACT
There are 49 species and 24 subspecies of the genus *Yucca*, which belong to the family of the agavaceous and are distributed from the northern United States to Central America. The *Yucca filifera* in SLP known as palm china produces flowers and fruits that are part of the Mexican cuisine, which are harvested from April to May. In the present work, the fruit of *Yucca filifera* cultivated in the Altiplano Potosino was partially characterized from the point of view physico-chemical, to not be able to locate information recent nutrient analysis and consider these essential for other projects in the area because the characterization of a food allows us to know the chemical composition, the nutritional value and calories as well as their physical properties, chemical, toxicological and also adulterants or contaminants that may be present in the composition of a food. The analyzes were methods of national regulations, except for the determination of carbohydrates that are carried out with the phenol-sulfuric acid method, all were done in triplicate and using frozen fruit to 4°C without any injury caused by cold. Below are reported with standard deviation: size on the basis of the length 2.9 cm (± 0.7), equatorial diameter 1.1 cm (± 0.2), unit weight 1.7 g (± 0.8), titratable acidity 0.04 (± 0.00), total carbohydrate 21.04 mg/mL (± 0.40), pectin 0.2 % (± 0.006), total protein 5.03 % (± 0.71), 80.27 % moisture (± 0.64), 1.09 % ash (± 0.15) to 600°C for 4 h and total soluble solids 8.35°Brix (± 0.06) to 28.5°C (± 0.2). The results obtained can be considered satisfactory, the palm flower is a source of nutrients and has been widely appreciated for its flavor when compared to other traditional products on the market, and by their resistance to cold may be considered for its export.
Key Words: *Yucca filifera*, chemical analysis, traditional food.

RESUMEN
Existen 49 especies y 24 subespecies del género *Yucca*, las cuales pertenecen a la familia de las agaváceas y están distribuidas desde el norte de los Estados Unidos hasta Centroamérica. La *Yucca filifera* conocida en SLP como palma china produce flores y frutos que forman parte de la gastronomía Mexicana, los cuales se cosechan de abril a mayo. En el presente trabajo, el fruto de *Yucca filifera* cultivado en el Altiplano Potosino fue caracterizado parcialmente desde el punto de vista fisicoquímico, al no localizar información nutrimental reciente y considerar estos análisis indispensables para otros proyectos del área porque la caracterización de un alimento nos permite conocer la composición química, el valor alimenticio y calórico así como sus propiedades físicas, químicas, toxicológicas y también adulterantes, o contaminantes que pueden estar presentes en la composición de un alimento.

Los análisis realizados atendieron los métodos de normativa nacional, excepto la determinación de carbohidratos que se realizó con el método de fenol sulfúrico, todos se realizaron por triplicado y utilizando fruto congelado a 4°C sin ninguna herida ocasionado por frío. A continuación se reporta con desviación estándar: tamaño en base a la longitud 2.9 cm (± 0.7), diámetro ecuatorial 1.1 cm (± 0.2), peso unitario1.7 g (± 0.8), acidez titulable 0.04 (± 0.00), carbohidratos totales 21.04 mg/mL (0.40), pectina 0.2 % (±0.006), proteínas totales 5% (± 0.7), humedad 80.27% (± 0.64), cenizas 1.08 % (± 0.14) a 600°C por 4 h y sólidos solubles totales 8.35°Brix % a 28.5 °C (± 0.2). No presenta daños por frío después de cuatro semanas de almacenamiento a 4°C. Los resultados obtenidos pueden ser considerados satisfactorios, la flor de palma es una fuente de nutrientes y ha sido ampliamente apreciada por su sabor cuando se compara con otros productos tradicionales en el mercado, y por su resistencia al frío puede considerarse para su exportación.
Palabras clave: *Yucca filifera,* análisis bromatológico, alimento tradicional.

INTRODUCCIÓN

La flor de palma china *Yucca filifera,* es una planta que crece abundantemente en grandes extensiones de las zonas áridas de México, localizándose en las partes altas y medias de las laderas, llega a tener hasta 10 m de altura de altura y produce grandes racimos de flores. Se utiliza como planta de ornato y para reforestación de algunas avenidas y/o carreteras, en la industria se utiliza para producir celulosa y la fabricación de papel "kraft", resistente a la ruptura y desgaste [1]. El fruto se cosecha de abril a mayo. La flor de palma (*Yucca filifera)*, objeto de este estudio (Figura 1), se adquirió en el municipio Matehuala San Luis Potosí, está situado geográficamente entre las coordenadas 23° 39'N de latitud norte y 100°39' de latitud oeste. Y los estudios bromatológicos que se le realizaran son la primera fase para continuar con otras investigaciones del área.

Los análisis bromatológicos son la evaluación química de la materia que compone a los nutrientes, es decir la ciencia que estudia los alimentos, sus características, valor nutricional y posibles alteraciones [2]. En un mercado globalizado, la importancia de conocer la composición química de los alimentos radica en el precio de estos, pues los fabricantes venden y los consumidores pagan de acuerdo a la cantidad de proteína cruda, grasa, minerales, etc. [3]. Así, el conocimiento de esta composición química de los alimentos permite su utilización de forma racional, con lo que se pueden evitar deficiencias o excesos de nutrimentos.

Es por esto, que los alimentos se someten a métodos de análisis cualitativos y cuantitativos los cuales permiten conocer la composición de los alimentos, el significado higiénico y todo en aspectos Y es además un arma de inapreciable valor para conocer las características organolépticas de cada uno de los alimentos y auxiliar muy valioso en los trabajos de investigación como en este caso, que permitirán dar una idea sobre el rendimiento y la conservación, para mantener en óptimas condiciones el fruto de la palma para sus posteriores estudios [4].



Figura 1. Palma china (Yucca filifera)

METODOLOGÍA

Muestra. Se compró la flor de palma a una recolectora regional de población circunvecina a Matehuala, SLP. Los 1.800 kg se empaquetaron en bolsas de 300 g y se congelaron a 4°C, después de ser lavados y secados. La división fue aleatoria, no se seleccionaron ni por tamaño o forma, Figura 2.

Los análisis bromatológicos se realizaron bajo normativa nacional y por triplicado, salvo la determinación de humedad y carbohidratos que se realizaron con otros métodos.

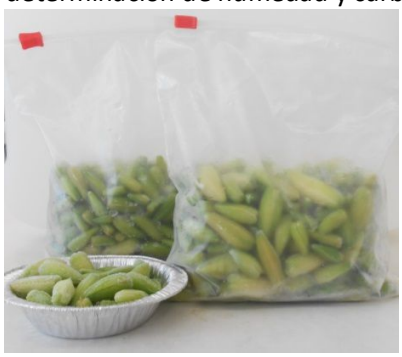


Figura 2. Fruto de palma china (Yucca filifera), congelado a 4°C, apariencia después 6 semanas.

Tamaño en base a la longitud. Utilizando la norma mexicana NMX-FF-067-1982 [5] se determinó el tamaño por longitud, donde se tomaron 5 muestras cada uno de los 4 lotes, las mediciones se realizaron con un vernier digital marca Thomas Scientific con exactitud de ± 1 mm.

Tamaño ecuatorial. Se utilizó la norma NMX-FF-009-1982 [6], la toma de muestra fue similar al proceso anterior, utilizando el mismo instrumento.

Rendimiento. A través de la norma NMX-FF-007-1982 [7] se determinó rendimiento para cada lote tomando 5 frutos de cada uno, las mediciones se realizaron en una balanza analítica marca Ohaus con exactitud de ±0.0001 g.

Humedad. El análisis se realizó en una termobalanza marca OHAUS modelo MB45, en la donde se colocaron 5 g de muestra a 100°C por 30 min.

Cenizas. Con la norma NMX-F-066-1978 [8] se realizó análisis y utilizando mufla marca LabTech a 600 °C por 4 h. Tratamiento necesario para que muestras de 2 g se redujeran en su totalidad.

Sólidos solubles totales (SST). El por ciento de SST se determinó siguiendo método de la NMX-F-015-1982 [9] y utilizando un refractómetro manual tipo Abbe calibrado con agua destilada, el cual tiene medidor de temperatura. En el receptor se colocaron dos gotas de jugo de pulpa y se leyó la escala. El resultado no fue corregido utilizando la tabla de conversión incluida en la norma de esta técnica porque el refractómetro lo realiza de forma automática.

Acidez. Se determinó con la norma NMX-FF-011-1982 [10] antes de iniciar la titulación se calibro el potenciómetro Marca Sev usando reguladores de pH conocido se transfirió por medio de una pipeta volumétrica a un vaso de precipitados con agitador magnéticos 50 mL de muestra se inicia la agitación y se adiciono NaOH 0.1 M a través de una bureta (±0.05 mL) hasta ajustar a pH 7, agregar lentamente hasta llegar a pH 8.1.

Proteínas. Para hacer este análisis se empleo la norma NMX-F-068-S-1980 [11], utilizando el destilador micro-Kjeldahl marca Sev. El tubo de digestión se preparó con 0.1g de muestra finamente picada, 1g catalizador, 3 perlas de vidrio y 25 mL de H_2SO_4, y se colocó en el digestor aumentando gradualmente la temperatura hasta que la solución se tornó clara para trasvasarla a un matraz con 50 mL de NaOH, el cual se acoplo a un sistema de destilación. El destilado fue colectado en un matraz con 50 mL de H_3BO_3 y 3 gotas de indicador Shiro Tashiro hasta que la solución cambio de color de violeta a verde claro, para titularla con HCl 0.1 N.

Carbohidratos. Se realizó utilizando el método fenol-sulfúrico [12], el cual consiste en utilizar 1 mL de muestra con 0.6 mL de C_6H_6O y 3.6 mL de H_2SO_4 dejando la reacción durante 20 min antes de leer su absorbancia en espectrofotómetro a 480 nm. Para ello, se preparó una curva estándar de glucosa de 0.02 a 0.10 mg/mL la cual nos sirvió como patrón para determinar la concentración de la muestra.

Pectinas. Determinación realizada con la norma NMX-FF-010-1982 [13], el proceso consistió en pesar 50 g y hervir durante una hora con 400 mL de agua, manteniendo constante el volumen hasta afinar la muestra, posteriormente se filtró con papel Whatman 4. Se prepararon alícuotas de 100 mL de la solución anterior, adicionando 100 mL de agua y 10 mL de NaOH 1.0 N, reposo de una noche, y se adicionó 50 mL de $C_2H_4O_2$ 1.0 N agitación y reposo de 5 min, y 25 mL de $CaCl_2$ 1N con agitación constante y reposo de 1 h. Para finalizar, se filtró en caliente utilizando papel filtro Whatman 41 hasta eliminar toda de cloruro, lo cual se verificó utilizando solución de $AgNO_3$, el filtrado se secó con todo y papel a 105°C horno de secado DHG-9145A. Por lo que el papel filtro debe tener peso constante antes de utilizarlo, para determinar el peso de la pectina por diferencia.

Tratamiento de datos. Los datos se realizaron de acuerdo a las indicaciones de cada método, utilizando una hoja de Excel y las ecuaciones estadísticas de la misma para calcular promedio, desviación estándar y realizar determinar ecuación de la recta.

RESULTADOS

El tamaño por longitud de cada lote presentó incertidumbres altas, la razón es que el tamaño del fruto es muy variable (Figura 3), es así que en los cuatro lotes se localizaron frutos con tamaño de 4.5 a 1.8 cm (± 0.1 cm).

El tamaño promedio de los cuatro lotes es de 3.1 cm (± 0.8). Estos resultados pueden dar la pauta a clasificar este producto en calidades si se llegara a comercializar en gran escala. Y esto lo confirman los resultados con respecto al tamaño ecuatorial, los cuales fueron similares se localizaron frutos con diámetro de 1.5 a 0.8 cm (± 0.1 cm) y el diámetro promedio de los cuatro lotes es de 1.2 cm (± 0.2). Podemos notar que la diferencia de tamaño longitudinal y ecuatorial es de más del 50%. El rendimiento por peso unitario presento un valor promedio de 1.7 g (± 0.8), pero debemos señalar que cuando se prepara este producto se consume prácticamente todo.



Figura 3. Tamaño de los frutos de palma en una muestra aleatoria del lote 4.

Con respecto la humedad el producto presento 80.27 % (± 0.64) dato tomado a 25 °C, resultado que nos indica que el fruto es rico en H_20 como la mayoría de los vegetales; cenizas 1.8 % (± 0.15) de cenizas nos confirma que a menor cantidad de ceniza no hay agente inorgánico que pueda afectar la salud del consumidor, pero se requieren otros estudios; SST 8.35 % (± 0.06) a 28.5°C (± 0.2); pectina 0.22 g de pectinas para 50 g, el alimento es pobre en pectina 0.5% peso total; acidez titulable 0.04, comparado con otros vegetales con acidez de 0.028 a 0.059 está dentro del rango permisible, su sabor es ligeramente ácido con un dejo de amargo el cual disminuye cuando se guisa el producto; proteínas 5.03% (± 0.72) por cada 100 g de muestra comparada con otros frutos la cantidad de similar; y carbohidratos 21.05 mg/mL (± 0.40) parámetros similar de carbohidratos localizado en vegetales u hortalizas.

CONCLUSIONES

En el consumo de alimentos la tendencia mundial es hacia productos agrícolas obtenidos de manera limpia y con menor impacto ambiental, aunado a un buen aporte nutritivo que beneficie la salud. La flor de palma es una alternativa en el mercado, por su costo y valor nutritivo es recomendable para ser consumido cotidianamente. Además de ser un producto ampliamente apreciado por su sabor y por estar incluido en la gastronomía regional.

La congelación a 4°C es una buena alternativa para la conservación del fruto, la apariencia de la flor de palma es atractiva y los resultados fueron gratificantes al cubrir la expectativa de 4 a 6 semanas de almacenamiento, lo cual nos permite adquirir el producto y almacenarlo con la plena confianza de poderlo trabajar en al menos ese lapso de tiempo, pues a la semana de adquirirlo se había concluido la cosecha y finalizado la producción. Aunque es necesario investigar la conservación utilizando otras variables y considerar otros tiempos para cosechar y otros periodos.

AGRADECIMIENTOS

Al Fondo de Apoyo a la Investigación (FAI) de la Universidad Autónoma de San Luís Potosí, convenio C15-FAI-04-25.25.

REFERENCIAS

[1] Comisión Nacional Forestal (CONAFOR). SIRE – Paquetes tecnológicos. *Yucca filefira* (Chabaud, 1976). En: http://www.conafor.gob.mx:8080/documentos/docs/13/1016Yucca%20filifera.pdf

[2] Harol, Egan et. al. (1991). Análisis químico de alimentos de Pearson. México, D. F.: CECSA, 398.

[3] Hernández, M. y Ledesma, L. (1987). Análisis químico de los alimentos I. La Habana, Cuba: ENPES, 354.

[4] Zumbado, H. (2002). Análisis químico de los alimentos. Métodos Clásicos. Cuba: Instituto de Farmacia y Alimentos de la Universidad de la Habana, 434.

[5]NMX-FF-067-1988. Productos alimenticios no industrializados para uso humano. Fruta fresca.

Determinación del tamaño con base a su longitud.

[6] NMX-FF-009-1982. Productos alimenticios no industrializados para uso humano. Fruta fresca. Determinación del tamaño con base a su diámetro ecuatorial.

[7] NMX-FF-007-1982. Productos alimenticios no industrializados para uso humano. Fruta fresca. Determinación de rendimiento de peso unitario.

[8] NMX-F-066-S-1978. Alimentos. Determinación de cenizas en alimentos. Método de prueba.

[9] NMX-F-015-1982. Alimentos para humanos. Determinación de sólidos totales por el índice de refracción.

[10] NMX-FF-011-1982. Productos alimenticios no industrializados, para uso humano. Fruta fresca. Determinación de acidez titulable. Método titulación.

[11] NMX-F-068-NORMEX-2002. Alimentos. Determinación de proteína en alimentos. Método de prueba.

[12] DuBois, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, P. A.; Rebers, J. K.; Smith F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry, 28(3): 350-356.

NMX-FF-010-1982. Productos alimenticios no industrializados, para uso humano. Fruta fresca. Determinación de pectina.

EVALUATION OF PROTEIN EXTRACTION METHODS FROM MAIZE (*Zea mays* L.) GRAINS

[Evaluación de métodos de extracción de proteínas de granos de maíz (*Zea mays* L.)]

Emir Mancilla Juan[a*+], Víctor Conde Martínez[a], Alejandrina Robledo Paz[a], Hilda Victoria Silva Rojas[a], Moisés Cortez Cruz[b]

[a] Colegio de Postgraduados. Km. 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado de México, CP. 5623
[b] Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG). Km. 8 Carr. Tepatitlán - Lagos de Moreno, Col. Rancho Las Cruces, Tepatitlán de Morelos, Jal. C.P. 47600.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: mancilla.emir@colpos.mx

Área del Conocimiento: Q. Alimentos.

ABSTRACT
Nowadays, there is a growing interest in improving protein quantity and quality in foods for human consumption. In developing countries, the diet is based on vegetable protein, and maize represents 50 to 70% of the main source of nutrients. Efficient methods of protein extraction from maize grains involve tissue homogenization and cell destruction by physical or chemical means. The objective of this study was to establish an efficient, low-cost method for protein extraction from maize grains of different genotypes. Two maize genotypes were evaluated: H-599C, a quality protein maize (QPM), and 485+488S2-48 with unknown protein content. Buffers of high and low ionic strength were used for protein extraction (TRIS-HCl pH 8.5, phosphate pH 7.6, and KCl 50 mM pH 2.0/pepsin 20 mg/ml). The extracts were analysed by the Bradford method and compared with Micro-Kjeldahl. The TRIS-HCl buffer pH 8.5 yielded a total protein content of 9.8% and 8.2% for H-599C and 485+488S2-48, respectively, when determined by Micro-Kjeldahl, while the values obtained by Bradford were of 9.5 and 8.5 mg g^{-1} dry weight for H-599C and 485+488S2-48, respectively. The phosphate buffer with pH 7.6 yielded values of 10.4 and 8.9 mg g^{-1} dry weight for H599C and 485+488S2-48, respectively. The results indicate that all of the buffer solutions evaluated are efficient for protein extraction; however, the method involving extraction in high ionic strength buffer followed by Bradford quantification is fast, reliable and low-cost, compared with the other methods. This method will be used for protein evaluation in 300 maize genotypes with different protein content.

Keywords: Maize, protein, Micro-Kjeldahl method, Bradford method, protein extraction buffer.

DEVELOPMENT AND EVALUATION OF A GUMMY CANDY WITH PITAHAYA PULP (*Hylocereus undatus)*

[Desarrollo y evaluación de una gomita a base de pulpa de pitahaya (*Hylocereus undatus)*]

Aline Manzur Aguilar[a]*, Patricio Martínez Severiano[b], María Leonor Valderrama Cháirez[b+]

[a] Estudiante de la Licenciatura en Ciencia de los Alimentos de la Benemérita Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias/ Camino Ramón Padilla Sánchez 2010, Nextipac, C.P: 44600 Zapopan, Jalisco. Teléfono (+52 33)- 37771150 ext. 33041
[b] Profesores del Departamento de Salud Pública, División de Ciencias Veterinarias de la Benemérita Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias/ Camino Ramón Padilla Sánchez 2010, Nextipac, C.P: 44600 Zapopan, Jalisco. Teléfono (+52 33)- 37771150 ext. 33041

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: valderramanoy@gmail.com

Área del Conocimiento: Q. Alimentos.

ABSTRACT
Nowdays a higher amount of people thinks artificial flavor is unreliable and because of that they have started using fruits and other organic ingredients to give flavor to food. If we look right now into candies production's area, we may notice that the majority of producers use artificial flavoring. Therefore the aim of this work was to develope a gummy candy with pitahaya pulp, to promote the consumption of candies with fruit. Two different formulations were prepared (F1 and F2) with different percentage of water, citric acid and pitahaya pulp. We measured it's acceptance by using an hedonic scale. The sample that reached our expectations, went through different physicochemical studies (humidity, protein, fat and total soluble solids , along with a comparison of the caloric level of commercial gummy candy). For F1 we obtained a thicker and more consistent gummy, with pitahaya flavor and a slightly acid taste. The F2 was thinner, had lower consistency, had numerous black colored seeds, pitahaya flavor and it tasted a little more acid than F1. The F1 sample had the best acceptance by the sensorial panel, and presented a lower caloric level than commercial gummy candies. Within a portion of 50g we find an amount of 111 calories, humidity content of 15.1 ± 1.13%, a total soluble solids: 75 °Brix, protein levels of: 5.19 ± 0.67g and a fat percentage of: 0.08 ± 0.01%.

Keywords: Hylocereus undatus; candy; gummy.

RESUMEN
Cada vez los consumidores sienten mayor desconfianza respecto a los aromas y sabores artificiales, por lo que se ha prestado especial atención en productos con ingredientes nutritivos como lo es el uso de frutas que además doten de olor y sabor al alimento. En nuestros días la mayoría de productos de confitería son elaborados con saborizantes artificiales, por tanto la elaboración de una gomita con pulpa natural de pitahaya, permitirá promover el consumo de confites con pulpa de frutas. La investigación se llevó a cabo en el Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Se realizaron dos diferentes formulaciones que difieren en la concentración de agua, pulpa de pitahaya y ácido cítrico. Se efectuó una evaluación sensorial con escala hedónica de 5 puntos. A la formulación mejor evaluada sensorialmente se le realizaron determinaciones fisicoquímicas, además de una

comparación con las gomitas de grenetina comerciales. Para la F1 se obtuvo una gomita de consistencia firme, color verde, con sabor a pitahaya y ligeramente ácida, la F2 fue una gomita delgada de consistencia firme de color verde claro y con numerosas semillas de color negro, con sabor a pitahaya y moderadamente ácida. La formulación 1 fue la de mayor aceptación y presentó un nivel calórico menor al de las gomitas de grenetina comerciales. En una porción de 50 g se obtuvo un contenido energético de 111 calorías, el contenido de humedad fue de 15,1 ± 1,13 %, 75 °Brix, proteínas 5,19 ± 0,67 g y grasa 0,08 ± 0,01 %.

Palabras Clave: Pitahaya; gomita; grenetina.

INTRODUCCIÓN

La pitahaya es un fruto globoso, de forma elipsoidal a ovalada, de 10 a 12 cm de diámetro, con pulpa blanca y numerosas semillas dispersas de color negro; la cáscara varía de rojo a rojo-púrpura y está cubierta por brácteas salientes de forma triangular, dispuestas en forma más o menos helicoidal. La pulpa es dulce, en ocasiones un poco ácida, de aroma suave y fragancia delicada, es considerada una fruta exótica y se ha consumido en América por generaciones. Crece de forma silvestre en 20 estados de la República Mexicana [1].

Las semillas poseen un aceite de efectos laxantes que ayuda al buen funcionamiento del aparato digestivo y la pulpa contiene una sustancia llamada captina que actúa como tonificante del corazón [2]. La pitahaya es una buena fuente de minerales, fibra dietética y vitaminas. Los azúcares que predominan en los frutos son glucosa y fructosa, con pequeñas cantidades de sacarosa [3]. La cáscara de la pitahaya contiene antocianinas, éstas se identifican como polifenoles y forman parte del grupo de los flavonoides [4]. El flavor (olor-sabor), lo da el furfural, compuesto que está asociado a sabores dulces, caramelo y frutal [5]. La grenetina es un polipéptido derivado de la degradación hidrolítica del colágeno, el principal componente del tejido conectivo animal. La piel y los huesos de res y cerdo son las materias primas más comunes en la producción de grenetina. Son desgrasados y desmineralizados antes de ser hidrolizados. Hay dos tipos principales de este agente gelificante: el tipo A es producido de la piel y huesos del cerdo y el tipo B es producido de la piel y huesos de la res [6]. El atributo más importante de la grenetina es su fuerza de gel y cuando está determinada por un método estandarizado se le llama "Valor Bloom". La definición de este valor es la fuerza re-querida para deprimir 4 mm la superficie de un gel mediante un embolo, esta medida es realizada 18 h después de que el gel ha sido almacenado exactamente a 10 °C. Los productos comerciales normalmente tienen valores Bloom entre 50 y 280 [7]. Debido a esto el objetivo fue desarrollar la formulación de una gomita de grenetina a base de pulpa de pitahaya, conocer su aceptabilidad y comparar sus parámetros fisicoquímicos con gomitas comerciales.

MATERIALES

Ingredientes empleados: pulpa de pitahaya de la variedad *Hylocereus undatus*, azúcar estándar, grenetina con un valor Bloom de 290, ácido cítrico, jarabe de maíz, colorante verde y agua potable.

Equipos y materiales: equipo Kjeldahl, equipo Soxhlet, mufla, desecador; refractómetro automático marca ATAGO, del modelo Master-3T con niveles de lectura de ºBrix 58.0 ~ 90%; cápsulas de porcelana, balanza analítica, bowls, cazuela de aluminio, moldes de silicón y termómetro para confitería con un rango de temperatura de 90 a 200 °C.

MÉTODOS

La investigación se llevó a cabo en los laboratorios de fisicoquímica alimentaria y gastronomía del Departamento de Salud Pública del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara.

Formulación.- Se realizaron dos formulaciones de la gomita de grenetina con pulpa de pitahaya. Para la pitahaya se utilizó la variedad *Hylocereus undatus,* En la primera (F1) se hidrató la grenetina con pulpa de pitahaya, 4,3 mL de agua más 20 g de ácido cítrico. Para la segunda formulación (F2) sólo se hidrató la grenetina con la pulpa de pitahaya y se le agregaron 24 g de ácido cítrico.

Determinación de contenido calórico.-Se determinó el contenido calórico de F1 y F2, utilizando el Sistema Mexicano de Alimentos Equivalentes [8]. Para la comparación de calorías se utilizaron dos marcas de gomitas de grenetina comerciales. La marca A con una porción de 55 g por bolsa. La marca B con una porción de 50 g por bolsa. El método utilizado fue por revisión de la información nutrimental en el etiquetado.

Evaluación Sensorial.- Los atributos a valorar fueron aroma, color, textura, sabor y dureza. El instrumento para evaluar fue un cuestionario donde se evaluó el gusto y disgusto, utilizando una escala de uno a cinco, siendo 1= me disgusta mucho y 5 = me gusta mucho [9]. Se realizó una evaluación sensorial de preferencia y de escala hedónica estructurada a los dos días de elaborado el producto (se utilizó una muestra poblacional de 50 personas no entrenadas de ambos sexos, dentro de un rango de 10 a 25 años de edad además Se realizó un análisis estadístico descriptivo utilizando el software Sigma Stat 3.1 [10], para los diferentes atributos evaluados.

Análisis Fisicoquímicos.- A la formulación mejor evaluada sensorialmente (con la obtención de media y desviación estándar), se le determinaron a los cinco días de elaborado el producto, los siguientes parámetros fisicoquímicos:
a) Humedad, se realizó por el método de secado en estufa, bajo la Norma Mexicana NMX-F-083-1986 [11];
b) Proteína, se utilizó el método Kjeldahl [12];
c) Grasa, se efectuó por el método Soxhlet bajo la Norma Mexicana NMX-F-089-S-1978 [13];
d) Sólidos solubles totales, se empleó un refractómetro automático utilizado mediante las especificaciones del fabricante.

RESULTADOS
Formulación y Determinación de Contenido Calórico
Para la F1 se obtuvo una gomita de consistencia firme, de color verde, con sabor a pitahaya y ligeramente ácida, la F2 fue una gomita delgada de consistencia firme de color verde claro y con numerosas semillas de color negro, con sabor a pitahaya y moderadamente ácida.

Se encontró diferencia en el contenido energético entre las dos formulaciones de gomita con pulpa de pitahaya frente a las gomitas comerciales. En una porción de 50 g de la F1 se obtuvo un contenido energético de 111 calorías, y en 50 g de la F2 se obtuvieron 116 calorías. En tanto que las marcas A y B, presentan mayor contenido energético (Tabla 1).

Tabla 1. Información nutrimental de las marcas comerciales A y B de gomitas de grenetina

Componente	"A"	"B"
Contenido energético	187 Cal	161 Cal
Grasas (lípidos)	0g	0g
Proteínas	2g	2,4g

Evaluación Sensorial

La F1 fue la mejor evaluada en los atributos de color, textura, olor y dureza todas con una calificación de "me gusta". La F2 presentó valores en el rango de "ni me gusta, ni me disgusta".

El único atributo que no presentó diferencia estadística significativa fue el de sabor ($p<0,05$) (figura 1).

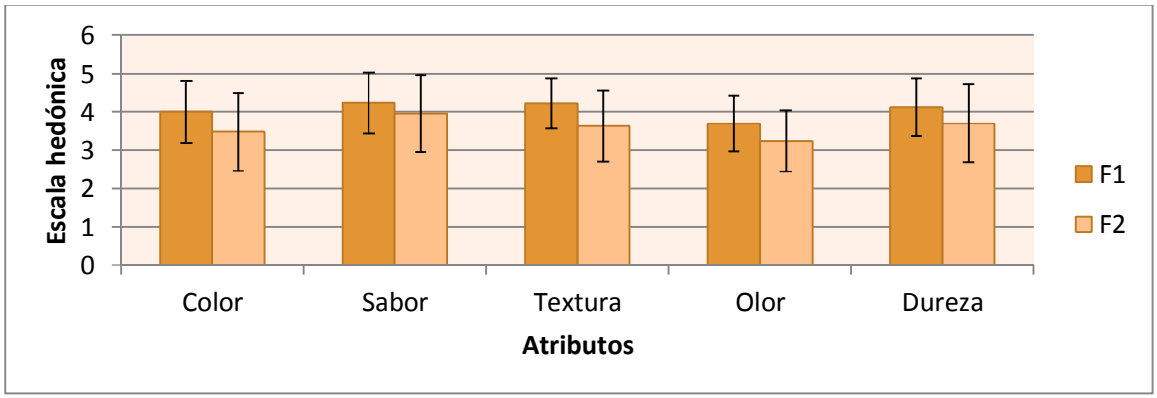


Figura 1.- Promedio y desviación estándar de la evaluación sensorial de la formulación 1 y 2 (F1 y F2) de la gomita de grenetina a base de pitahaya. (I) Indica diferencia estadística a un nivel de significancia $p>0,05\%$

Análisis fisicoquímicos

Se seleccionó la formulación 1 para realizar los análisis de laboratorio. En la tabla 2 se muestran los resultados de la evaluación fisicoquímica de dicha formulación de la gomita de pitahaya.

Tabla 2. Media y desviación estándar de las determinaciones fisicoquímicas de la F1 de la gomita de grenetina a base de pitahaya.

Determinaciones	Media ± Desviación estándar
Humedad	15,1 ± 1,13 %
Proteínas	5,19 ± 0,679 g
Grasa	O,089± 0,012 %
°Brix	75°

DISCUSIÓN

En México existe una fuerte tendencia de los consumidores hacia las gomitas suaves, lo cual se refleja en la preferencia por la formulación 1, misma que presentó mayor aceptación [14].

En este trabajo se logró obtener una consistencia adecuada así como hidratar la grenetina empleando solo la pulpa de pitahaya, gracias a que esta contiene gran cantidad de agua (89,4 g en 100 g de pitahaya) [15,16]. La acidez que presentaron las gomitas está dada por el ácido cítrico adicionado y a la propia acidez de la pulpa de pitahaya, acidez que aumenta por una desviación en el metabolismo de la fruta, pasando a la vía fermentativa [17], además hay que tener en cuenta que durante el proceso de disolución la grenetina cambia por efecto del calor y de los ácidos, esto se hace evidente a través de la reducción de la viscosidad y de la pérdida de poder de gelificación [18]. Pero en este caso al elaborar las gomitas no afectó la acidez de la pulpa debido a que se utilizaron pitahayas frescas.

Se logró obtener una diferencia en el contenido calórico, las gomitas de pulpa de pitahaya tienen una menor cantidad de calorías que las gomitas comerciales, esto puede ser debido a las cantidades de azúcar que se utilizan para la elaboración de las gomitas [19].

Los análisis de laboratorio demostraron que las gomitas comerciales y las de pitahaya tienen valores similares en los parámetros de proteínas y grasas, esto puede deberse a que se utiliza la grenetina como un agente espesante o gelificante y está tiene un porcentaje de grasa máximo de 0,2% [20]. Se pretenden realizar a futuro dos formulaciones, una con grenetina y la segunda sustituyendo la grenetina por agar-agar, y el jarabe de maíz por jarabe de maltitol, a fin de realizar una gomita sin productos de origen animal y que sea considerada producto bajo en calorías [19].

CONCLUSIONES

1. La pulpa de pitahaya se pudo incorporar a la grenetina para hidratarla, sin que la acidez de la pulpa afectará la consistencia final de la gomita.
2. La formulación 1 fue la de mayor aceptación en sus atributos sensoriales.
3. Se encontró una diferencia en contenido calórico, las gomitas de pulpa de pitahaya presentaron menor cantidad comparadas con las gomitas comerciales.
4. Los análisis fisicoquímicos demostraron que los parámetros de proteína y grasa estuvieron similares a las gomitas de grenetina comerciales.

REFERENCIAS

[1] Centurión, Y., Solís, P., Mercado, S., Báez, S., Saucedo, C. y Sauri, E. (1999), "Variación de las principales características de la pitahaya Hylocereus undatus durante su maduración postcosecha", Horticultura Mexicana, (7): 419- 425.

[2] Lezama, E.A., Tapia, S.A., Muñoz, S.G. y Zepeda, G.V. (2009). El cultivo de la pitahaya. Ficha del Sistema de Agronegocios de Traspatio SAGARPA, 1-12.

[3] Wu, M.C. and Chen, C.S. (1997). Variation of sugar content in various parts of pitaya fruit. Proceedings of the Florida State Horticultural Society, 110 :225-227.

[4] Wu, L., Hsu, H., Chen, Y., Chiu, C., Lin, Y., and Ho. (2006), "Antioxidant and antiproliferative activities of red pitaya", Food Chemistry, 95 (2): 319-327.

[5] Hernández, N., Miranda, L., Jiménez, G., Vázquez, C., y Botello, Á. (2010). Perfil químico de distintos frutos de cactáceas. XII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos, 1-14.

[6] Binsi, P. K., Shamasundar, B.A., Dileep, A.O., Badii, F. and Howell, N.K. (2009), "Rheological and functional properties of gelatin from the skin of Bigeye snapper (Priacanthus hamrur) fish: Influence of gelatin on the gel-forming ability of fish mincen", Food Hydrocolloids, 23 (1): 132-145.

[7] Karim, A.A. and Bhat, R. (2008) "Gelatin alternatives for the food industry: recent developments, challenges and prospects", Trends in Food Science and Technology, 19 (12): 644-656.

[8] Pérez, L., Palacios, G. y Castro, B. (2008). Sistema Mexicano de Alimentos Equivalentes. Editorial Ogali, 14-106.

[9] Cordón, O. (2007). Determinación acelerada de la vida de anaquel de la rosquilla hondureña. Proyecto de graduación del Programa de Ingeniería en Agroindustria Alimentaria, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Honduras, 10-23. http://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/576/1/T2388.pdf Consultada el 19/septiembre/2013

[10] Sigma Stat 3.1, 2005. Advisory Statistics for Scientists.

[11] SCFI. Secretaria de Comercio y Fomento Industrial. Norma Mexicana NMX-F-083-1986. Alimentos. Determinación de Humedad en Productos Alimenticios. Diario Oficial de la Federación. México, D.F. 14 de julio de 1986, 1-2.

[12] UNAM. Universidad Nacional Autónoma de México. (2008). Fundamentos y técnicas de análisis de alimentos. Laboratorio de alimentos I. Departamento de alimentos y biotecnología, Facultad de Química. http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/FUNDAMENTOSYTECNICASDEANALISISDEALIMENTOS_12286.pdf Consultada el 16/mayo/2013.

[13] SCFI. Secretaria de Comercio y Fomento Industrial. Norma Mexicana NMX-F-089-S-1978. Determinación de extracto etéreo (Método Soxhlet) en alimentos. Diario Oficial de la Federación. México, D.F. 03 de noviembre de 1978, 2.

[14] EI. Euromonitor Internacional. (2009). Tendencias del mercado latinoamericano en golosinas. Énfasis Alimentación, 18/septiembre. http://www.alimentacion. enfasis.com/ notas/14358-tendencias-del-mercado-latino americano-golosinas- Consultada el 24/noviembre/2013.

[15] ASERCA. Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria (1999). "Producción y comercialización de pitahayas en México", Junio. Proc. Fl. StateHortic. Soc, 3-43.

[16] Chávez, S.J., Tuxill, J. y Jarvis, D. I. (eds). (2004). Manejo de la diversidad de los cultivos en los agroecosistemas tradicionales. Instituto internacional de Recursos Fitogenéticos, Cali, Colombia. 1ra. ed, 77-106.

[17] Vargas, L., Tamayo, C., Centurión, Y., Tamayo, C., Saucedo, V. y Sauri, D. (2010), "Vida útil de pitahaya Hylocereus undatus mínimamente procesada", Revista Ibero-americana de Tecnología Postcosecha, 11 (2): 157-160.

[18] Ramírez, G. y Orozco, S. (2011). Confitería. De lo artesanal a la tecnología. Universidad Autónoma de Aguascalientes, 74.

[19]Reyo, H., Macías, O., Soto, A. y Ortiz, P. (2010) "Desarrollo de formulaciones de productos de confitería de bajo aporte calórico utilizando alcoholes polihídricos como edulcorantes", Universidad de Guanajuato, 1-20. www.respyn.uanl.mx/ especiales/2010/ee-09-2010/.../OT70.pdf Consultada el 13/mayo/2013.

[20] SCFI. Secretaria de Comercio y Fomento Industrial. Norma Mexicana NMX-F-043-1970. Grenetina Pura Comestible. Diario Oficial de la Federación. México, D.F. 10 de Marzo de 1970, 2.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

DETERMINATION OF FATTY ACID PROFILE AND PRESENCE OF CONJUGATED LINOLEIC ACID, IN TWO ARTISAN FERMENTED PRODUCTS OF THE STATE OF JALISCO (ADOBERA CHEESE AND TEJUINO) BY GAS CHROMATOGRAPHY

(Determinación del perfil de ácidos grasos y la presencia de ácido linoleico conjugado, en dos productos fermentados artesanales del Estado de Jalisco (queso Adobera y Tejuino), mediante cromatografía de gases)

Sandra Jiménez-Espinoza[a]*, Mirna Estarrón-Espinosa[b], María Dolores García-Parra[b+], Eugenia del Carmen Lugo-Cervantes[b], Socorro Josefina Villanueva-Rodriguez[b]

[a] Estudiante de Posgrado, Maestría Proceso Agroindustriales. 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. CP 44270
[b] 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. CP 44270

*Autor que presentó.
+Autor para correspondencia: dgarcia@ciatej.mx

Área del Conocimiento: Q. Alimentos

ABSTRACT
Fatty acids are the basic structural units of lipids. Essential fatty acids (EFAs), also known as omega (Ω3 and Ω6) are those that our body cannot synthesize, so they must be obtained through diet. In addition, various beneficial effects have been attributed to them. Conjugated linoleic acid (CLA) describes the positional and geometric isomers of linoleic acid and has beneficial health properties: anti-cancer, anti-inflammatory, anti-diabetic and anti-obesity, among others. In the Mexican diet, there are artisan fermented foods like Adobera cheese and Tejuino, but so far there is little information on the lipid fraction of these two regional products. In this work, the fatty acid profile and the presence of the CLA isomers was evaluated in Adobera cheese and Tejuino. The fat of the products was obtained by solvent extraction. The fatty acid profile was evaluated from the conversion of methyl esters by using BF3 and subsequent chromatographic separation using a capillary column HP-23 cis/trans. The results showed the presence of some essential fatty acids such as linoleic (Ω6), linolenic (Ω3) and oleic (Ω9) for both products. The eicosenoic fatty acid (Ω9) was present only in Tejuino, while arachidonic acid (Ω6) and CLA (cis-9, trans-11) were detected only in Adobera cheese. According to the results, we can conclude the importance of consumption of these fermented artisanal products because they also provide some essential fatty acids. In addition, the Adobera cheese contains CLA (cis-9, trans-11), whose beneficial health properties have been reported in other foods.

Keywords: FAMES; Artisan fermented foods; CLA; Tejuino; Adobera cheese

RESUMEN
Los ácidos grasos son las unidades estructurales básicas de los lípidos. Los ácidos grasos esenciales (AGE), también conocidos como omega (Ω3 y Ω6) son las que nuestro cuerpo no puede sintetizar, por lo que deben ser obtenidos a través de la dieta. Además, varios efectos beneficiosos se han atribuido a los mismos. El ácido linoleico conjugado (CLA) describe los isómeros posicionales y geométricos del ácido linoleico y tiene propiedades beneficiosas para la salud: anti-cáncer, anti-inflamatorios, anti-diabéticos y anti-obesidad, entre otros. En la dieta mexicana, hay alimentos artesanales fermentados como el queso Adobera y Tejuino, pero hasta ahora hay poca información sobre la fracción lipídica de estos dos productos regionales. En este trabajo, el perfil de ácidos grasos y la presencia de los isómeros CLA se evaluó en el queso Adobera y Tejuino. La grasa de los productos se obtiene por extracción con disolventes. El perfil de ácidos grasos se evaluó a partir de la conversión de ésteres de metilo mediante el uso de BF3 y subsiguiente separación cromatográfica utilizando una columna capilar HP-23 cis / trans. Los resultados mostraron la presencia de algunos ácidos grasos esenciales tales como linoleico (Ω6), linolénico (Ω3) y oleico (Ω9) para ambos productos. El ácido graso eicosenoico (Ω9) estuvo presente sólo en Tejuino, mientras que el ácido araquidónico (Ω6) y se detectaron CLA (cis-9, trans-11) sólo en el queso Adobera. Según los resultados, podemos concluir la importancia del consumo de estos productos artesanales fermentados, ya que también ofrecen algunos ácidos grasos esenciales. Además, el queso Adobera contiene CLA (cis-9, trans-11), cuyas propiedades beneficiosas de la salud han sido reportados en otros alimentos.

Palabras Clave; FAMES; Alimentos fermentados artesanales; CLA; Tejuino; Queso Adobera

INTRODUCCIÓN
Los alimentos fermentados artesanales se han consumido en México desde épocas prehispánicas, lo que actualmente sobrevive, es el testimonio de un conocimiento antiguo y recreado en las cocinas indígenas de nuestro país, en estos alimentos los microorganismos endógenos de la materia prima y del ambiente juegan un papel muy importante en el desarrollo de las características sensoriales y fisiológicas [10,4]. En la dieta mexicana, hay alimentos artesanales fermentados como el queso Adobera y Tejuino, originarios del estado de Jalisco, que hasta el momento hay poca información sobre la fracción lipídica de estos dos productos regionales; el queso Adobera es un queso típico mexicano, que es elaborado con leche cruda de vaca, fresco o ligeramente añejado, de pasta blanda, acidificado por la microflora natural de la leche y prensado ligeramente, se comporta como los quesos de pasta hilada, fundiéndose fácilmente al aplicarle calor [14]; el Tejuino es una bebida artesanal que se prepara a partir de granos de maíz germinado o nixtamalizado que muelen y mezclan con azúcar o piloncillo, y añaden Tejuino previamente elaborado como inóculo. Durante la fermentación se desarrollan diversos microorganismos que le confieren a la bebida sabor, olor y consistencia característicos [13]. La importancia de conocer el perfil de ácidos graso en alimentos es considerando que el cuerpo necesita energía para realizar todas sus funciones biológicas, la forma más "concentrada" de proporcionar esta energía son los lípidos o grasas, ya que intervienen también en los procesos de crecimiento. Las unidades básicas de las que están compuestas las grasas comestibles son los denominados ácidos grasos Los Ácidos Grasos Esenciales (AGE), son aquellos que nuestro metabolismo es incapaz de producir o lo hace en cantidad insuficiente para satisfacer las necesidades del organismo y que por tanto, es necesario aportarlos de forma exógena (con la dieta o con suplementos ricos en ellos). Los ácidos grasos esenciales que dan origen a las familias de ácidos grasos omega 3 y 6 [5, 11, 16, 3]. El ácido linoleico conjugado (CLA por sus siglas en inglés Conjugated linoleic acid) ha recibido gran interés en los últimos

años debido a sus efectos benéficos, que incluyen anti-cancerígenos, anti-diabético, anti-inflamatorios, anti-obesidad y anti-aterogénico, que han sido ampliamente confirmado tanto *in vivo* y *in vitro,* la principal fuente natural de CLA son los productos cárneos, grasos y lácteos derivados de los rumiantes [8, 7, 2, 1, 12, 15]. El objetivo de este estudio fue identificar el perfil de ácidos grasos, la presencia de los isómeros CLA así como de ácidos grasos omega, en la grasa del queso Adobera y del Tejuino, por medio de la técnica de Cromatografía de gases a partir de esteres metílicos de ácidos grasos (FAMEs por su siglas en ingles Fatty acid methyl esters).

METODOLOGÍA

Selección de los productos fermentados artesanales

Los alimentos artesanales se seleccionaron por ser oriundos del estado de Jalisco y por ser fermentados y elaborados de manera artesanal. Los alimentos fueron adquiridos, dentro de la zona metropolitana de Guadalajara Jalisco.

Extracción de ácidos grasos

La extracción de la grasa, para el queso Adobera se llevó a cabo mediante la extracción solido-liquido con disolvente Hexano de 110 g de queso Adobera, mediante el método de "Soxhlet" aprobado por la Norma Oficial Mexicana NOM-F-89-S-1978 [15]. La extracción de la grasa, del Tejuino fue mediante una extracción Liquido-Liquido utilizando 2400ml de Tejuino, con el disolvente "Hexano", basándonos en la técnica descrita por Rodríguez y colaboradores en 2011 [9].

Determinación de ácido grasos con la técnica de cromatografía de gases.

El perfil de ácidos grasos se evaluó a partir de la conversión de ésteres de metilo mediante el uso de BF3 como se observa en la Figura 1, se utilizaron .15g de grasa de cada uno de los productos y posteriormente la separación cromatográfica.



Figura 1. Diagrama de técnica de metilación.

La separación cromatografica fue realizada por medio de cromatografía de gases con detector de ionización de llama (Agilent tecnologies 7890B & 5977A Serie GC/MSD), siguiendo las condiciones mostradas en la Tabla 1, para la identificación de ácidos grasos, comparados con estándares de ácidos grasos y de isómeros de CLA.

Tabla 1. Condiciones del cromatógrafo.

Condiciones a utilizar en el cromatografía de gases	
Temperatura de inyector	250°C
Temperatura de detector	260°C
Programa de temperatura	40°C, 5 min; gradiente 25°C/min hasta 180°C durante 30min; gradiente 5°C hasta 250°C durante 5 min.
Volumen de inyección	1µL
Gas acarreador	Helio
Columna	HP-23 cis/trans 60m **X** 0.25nm ID **X** 0.25µm ft.
Masas 70 eV - impacto eléctrico	

RESULTADOS

En la Figura 2 se puede observar el cromatograma del Perfil de ácidos grasos de la grasa del Tejuino, donde se muestra la presencia de los ácidos grasos, como se observa no se muestra la presencia de CLA.

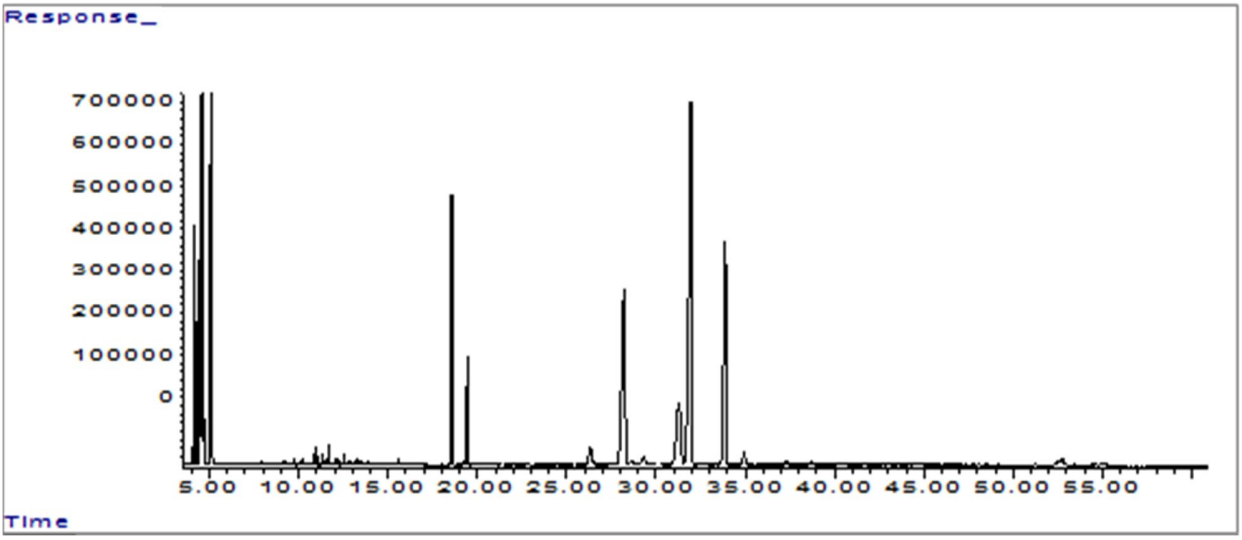


Figura 2.- Perfil de ácidos grasos de la grasa del Tejuino.

En la Figura 3 se muestra el cromatograma con el perfil de ácidos grasos y la presencia de un ácido graso CLA (el recuadro en zoom muestra la correspondencia del 9c, 11t-CLA con el estándar de la grasa del queso Adobera.

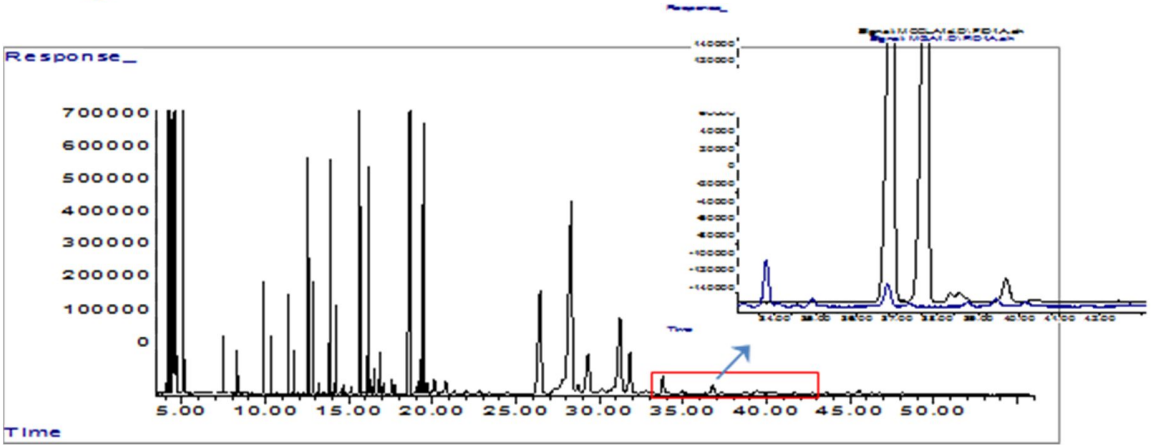


Figura 3-. Perfil de ácidos grasos de la grasa del queso Adobera.

Los siguientes resultados muestran el perfil general de ácidos grasos presentes en la grasa recuperada del queso Adobera y del Tejuino, de la misma manera se puede observar la presencia de algunos ácidos grasos esenciales tales como linoleico (Ω6), linolénico (Ω3) y oleico (Ω9) para ambos productos. El ácido graso eicosenoico (Ω9) estuvo presente sólo en Tejuino, mientras que el ácido araquidónico (Ω6) y CLA (cis-9, trans-11) se detectaron sólo en el queso Adobera. En la Tabla 2, se muestra el porcentaje de los ácidos grasos de cada una de las muestras.

Tabla 2. Perfil de ácidos grasos con % de área de la grasa del queso Adobera y del Tejuino.

Muestra de Queso Adobera y Tejuino (% de Área)		
Ácido Graso	MQA	MTJ
Butanoico	1.01	-
Hexanoico	1.30	-
Heptanoico	0.02	-
Octanoico	0.96	0.04
Nonanoico	0.03	-
Decanoico	2.43	0.07
Undecanoico	0.14	0.11
Dodecanoico	3.06	0.21
Tridecanoico	0.13	-
Tetradecanoico	10.18	0.09
Miristoleico	4.48	16.07
Pentadecanoico	1.08	-
Hexadecanoico	26.37	0.21
Palmitoleico	1.18	7.25
Heptadecanoico	0.79	3.47
Octadecanoico	11.86	35.92
Elaídico	0.68	-
cis-petroselínico	2.16	-
Oleico	24.69	0.79
cis-Vaccenico	0.88	1.58
Linoleico	3.77	32.44
Nonadecanoico	1.23	-
Linolénico	0.23	0.82
9c,11t-ALC	0.82	-
Araquídico	0.17	0.33
Eicosenoico	-	0.33
Araquidónico	0.21	-
Docosanoico	0.05	0.11
Tricosanoico	0.03	-
Lignocérico	0.06	0.16

DISCUSIONES

El perfil de ácidos grasos de la grasa del queso Adobera mostro el porcentaje de cada uno de los ácidos grasos presentes donde podemos hacer énfasis que el ácido graso oleico tiene un porcentaje de 24.69, muestra un mayor porcentaje en comparación con los ácidos linoleico y linolénico que muestran porcentaje de 3.77 y .23 respectivamente, de igual manera la determinación de CLA hace referencia a estudios anteriores donde ya se ha estudiado la presencia de este ácido en productos derivado de rumiantes .

El perfil de ácidos grasos de la grasa del Tejuino mostro un 32.44 % para el ácido graso linoleico, siendo este ácido el que se encuentra en mayor porcentaje comparándolo con el oleico y linolenico con un porcentaje de 0.79 y 0.82 respectivamente. La presencia de un mayor porcentaje de ácido linoleico puede ser por la materia prima del Tejuino que es el maíz.

Los alimentos artesanales, aportan grandes nutrientes para los consumidores, pero como ya se ha mencionado en la actualidad existe poca información de componentes de estos alimentos, para el caso del queso Adobera y Tejuino hay pocos estudios sobre el contenido y propiedades que los conforman, como se observó en los resultados anteriores en cuanto al contenido de ácidos grasos en la grasa de ambos productos tienen ácidos grasos esenciales, los cuales son de gran importancia para la dieta de los consumidores, los ácidos grasos omega y el CLA son ácidos grasos que últimamente ha sido estudiado por sus grandes beneficios para la salud de los consumidores. Por lo que podemos aportar es que el consumo de estos alimentos artesanales tiene grandes beneficios por su contenido de ácidos grasos esenciales.

CONCLUSIONES

Se identificó el perfil de ácidos grasos, la presencia de los isómeros CLA así como de ácidos grasos omega, en la grasa del queso Adobera y del Tejuino, por medio de la técnica de Cromatografía de gases a partir de esteres metílicos de ácidos grasos.

Los productos artesanales, queso Adobera y Tejuino ofrecen una fuente de ácidos grasos esenciales, los cuales se encontraron en la grasa de ambos productos.

El queso adobera además de tener algunos ácidos grasos esenciales también tiene un isómero de CLA (cis-9, trans-11), cuyas propiedades beneficiosas de la salud han sido reportados en estudios anteriores como anti-cáncer, anti-inflamatorios, anti-diabéticos y anti-obesidad, entre otros beneficios.

REFERENCIAS

[1] Andrade J.C., Ascencao K., Gullon P., Henriques S. M. S., Pinto J. M. S., Rocha-Santos T. A. P., Freitas A. C., Gomes A. M. (2012). “Production of conjugated linoleic acid by food-grade bacteria: A review”. Int. J. Dairy Technol. 65:467-481.

[2] Churruca I, Fernandez-Quintela A, Portillo MP (2009) Conjugated linoleic acid isomers: differences in metabolism and biological effects. Biofactors 35:105-111.

[3] Coronado, M. H., Vega, S. L., Gutiérrez, R. T., García, F. B., Díaz, G. G. (2006). “Los ácidos grasos omega-3 y omega-6: nutrición, bioquímica y salud. Departamento de producción agrícola y animal”. Departamento sistemas biológicos. Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco (UAM-X).REV. 25 (3): 72-79.

[4] Escamilla, M., y Escamilla, M.G. (2007). "Los alimentos fermentados que comían nuestros abuelos".En ciencia. Revista de la Academia Mexicana de la Ciencia. 58 (2):75-84.

[5] Masson, L. y Mella, M. (1985). "Materia grasa de consumo habitual y potencial en Chile: Composición de los ácidos grasos. Facultad de ciencias químicas y farmacéuticas". Universidad de Chile. Santiago, Chile. Pag. 31.

[6] NMX-F-089-S-1978. DETERMINACIÓN DE EXTRACTO ETÉREO (MÉTODO SOXHLET) EN ALIMENTOS. FOODSTUFF-DETERMINATION OF ETHER EXTRACT (SOXHLET). NORMAS MEXICANAS. DIRECCIÓN GENERAL DE NORMAS.

[7] Park Y., Pariza M. W. (2007). Mechanisms of body fat modulation by conjugated linoleic acid (CLA). Food Res. Int. Vol. 40: 311-323.

[8] Rocha Uribe, A. y Hernández, E. (2004). "Synthesis Of Linoleic Conjugated Acid By Alkali Isomerization Using Propylene Glycol As Solvent". Revista Mexicana de Ingeniería Química, Vol. 3. 193-200.

[9] Rodríguez Alcalá L. M., Braga T., Xavier Malcata F., Gomes A., Fontecha J. (2011). "Quantitative and qualitative determination of CLA produced by Bifidobacteriumand lactic acid bacteria by combining spectrophotometric and Ag+-HPLC techniques". Food Chem. Vol.125: Pág. 1373-1378.

[10] Shakow, A., Barnes, M. C. P., Bloom, B., Curlin T. G., Dirk, F., Hardy, R., Horne, F., Messer, E., Ruttan, V., Smerdon, E., Dinnen, G. P., Wyngaarden, J. (1992). "Application of biotechnology totraditional fermented foods". Nacional Academy Press. 64: 289–297.

[11] Simopoulos A. P. (1991). "Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development" . Am J Clin Nutr 54, 438-463.

[12] Sosa Castañeda Jesús, Hernández Mendoza Adrián, González Córdova, Aarón Fernando, Vallejo Cordoba Belinda. (2014). "Producción de Ácido Linoleico Conjugado (ALC) por Bacterias Ácido Lácticas (BAL) y su efecto benéfico para la salud". Interciencia. Vol. 39, Núm. 8: Pág. 540-546.

[13] Vargas, L., 1999. "Bebidas Mexicanas". En cuaderno de Nutrición 22 (3): 117-124.

[14] Villegas de Gante, A. (1993). Los Quesos Mexicanos. Universidad Autónoma Chapingo.

[15] Wong Janice, Kim Yoo, Park Yooheon, Lee Seong-Ho, Baek Seung J. y Park Yeonhwa. (2015). "Isomer specificity of conjugated linoleic acid on suppression of osteosarcomas". Journal of Nature and Science, No.4, e 67.

[16] ZILLER, S. 1996. Grasas y aceites alimentarios. Editorial Acribia. Zaragoza, España. Pág. 75.

(Formación de nanopartículas de Alginato-Quitosano cargadas con ácido fólico)

María de Jesús Mendoza-Sánchez[a], Sandra O. Mendoza-Díaz [a], María Guadalupe Flavia Loarca-Piña[a], Marcela Gaytán-Martínez[a], R. Campos-Vega[a], Alexandra del Socorro Cárdenas-Hernández[b], Héctor Paul Reyes Pool[c].

RESUMEN

Las nanopartículas se obtuvieron mediante gelificación iónica usando como agente reticulante cloruro de calcio ($CaCl_2$). Se realizó una caracterización de las nanopartículas formadas, en la cual se evaluó el tamaño de partícula, oscilando entre 20 y 50 nm. Se obtuvieron micrografías mediante microscopio electrónico de barrido para observar la formación de las nanopartículas y microscopía de fluorescencia para observar la presencia de ácido fólico en las nanopartículas. Se obtuvo un porcentaje de eficiencia de encapsulación del 95%, así como también se pudo observar que la matriz de alginato-quitosano logro mantener integra la molécula de acido fólico (AF), al ser expuestas las nanopartículas a la luz. A su vez se realizo una cinética de liberación donde a pH 6.8 y 7.4 se observaron los mayores % de liberación después de 16 horas.

INTRODUCCIÓN

La encapsulación ofrece una alternativa para desarrollar alimentos funcionales, ya sea en la producción de alimentos fortificados o enriquecidos según sea el caso. Los sistemas nanopartículados pueden describirse como sistemas de encapsulación que se obtienen por una variedad de métodos, entre estos se encuentra la gelificación iónica, mediante reticulación con algún agente policatiónico, siendo algunos de los más usados y aceptados para su uso en alimentos el cloruro de calcio ($CaCl_2$) y en tripolifosfato de sodio (TPP), esto por la accesibilidad del método. La matriz de alginato-quitosano ha sido ampliamente usada para encapsular fármacos, sin embargo ha mostrado propiedades que lo hacen atractivo como material de pared para su uso en alimentos. Es necesario conocer las interacciones químicas que se producen al formarse las partículas, ya que estas brindan información respecto a la naturaleza de los compuestos que pueden ser encapsulados [1]. Los sistemas nanopartículados primero deben ser caracterizados y posteriormente se evalúa su comportamiento en los alimentos. El ácido fólico es una vitamina sensible a degradación como la fotodegradación, por esta razón, este compuesto fue elegido para estudiar la protección que confiere el alginato-quitosano en la integridad de la molécula [2].

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la formación de las nanopartículas se emplearon los siguientes materiales: alginato de sodio, quitosano (grado de desacetilación media), Ácido fólico y ácido ascórbico (sensibles a la luz), todos adquiridos de Sigma-Aldrich, cloruro de calcio anhidro ($CaCl_2$), fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4), fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4) (Buffer de fosfatos 75 mM) adquiridos de J. T. Baker.

Formación de las nanopartículas

La metodología utilizada fue la descrita por Li *et al.,* 2008 con una serie de modificaciones. En 20 ml de una solución de alginato de sodio (3 mg / ml) bajo agitación en Ultra Turrax t18 basic® (a 1200 rpm se adicionan 4 ml de $CaCl_2$ (3.35 mg / ml) (en la solución de cloruro de calcio de adicionan 2 ml de una solución de ácido fólico a una concentración de 0.8333 mg / ml) gota a gota. Después de adicionar el cloruro de calcio con el activo, se mantiene esta solución bajo a agitación por 30 min, pasado este tiempo se adicionan 8 ml de una solución de quitosano (0.8 mg/ ml) para recubrir las nanopartículas de quitosano previamente formadas y

posteriormente se mantiene bajo agitación leve por una hora más. Al final se obtiene una solución opalescente que se deja reposar toda la noche para permitir que las nanopartículas se estabilicen homogenicen en tamaño y forma [3].

Caracterización de las nanopartículas cargadas con ácido fólico

Para observar la formación y morfología de las nanopartículas formadas, se tomaron micrografías mediante microscopía electrónica de barrido JEOL JXA-8530F. Para observar la presencia de ácido fólico dentro de las nanopartículas se hizo uso del microscopio de fluorescencia Zeiss filtro alexa fluor AF488 Absorbencia de emisión de 495 y exitación de 519 (verde). Para las pruebas de degradación por exposición a luz UV-vis, se utilizó una lámpara Exo Terra solar glo de 26 W con una mezcla de rayos UVB y UBA similar a la luz solar. para la cinética de liberación se utilizó buffer de fosfatos 75 mM (PBS) a tres diferentes pH´s: 2, 6.8 y 7.4 [3, 4,5]. Para la determinación de actividad antioxidante, eficiencia de encapsulación, cuantificación de ácido fólico y espectros de degradación, se empleó el espectrofotómetro Spectramax 180.

RESULTADOS

Eficiencia de encapsulación

Para calcular la eficiencia de encapsulación se liberó el ácido fólico encapsulado: se tomaron 4 mg de np´s y se adicionaron 5 ml de solución PBS (buffer de fosfatos) 75 mM y pH 7, mediante centrifugación a 9000 rpm por 15 min y posteriormente se cuantificó el contenido mediante espectrofotometría a 348 nm y con ayuda de una curva de calibración previamente desarrollada y mediante la ecuación: % EE = ([(cantidad total de AF-residuo de AF)/cantidad total de AF]*100) [6]. La eficiencia de encapsulación obtenida fue del 95%.

Morfología de las nanopartículas

Mediante microscopia electrónica de barrido se pudo observar la formación de las nanopartículas, pudiéndose observar un tamaño de partícula entre 20 y 50 nm. El ácido fólico tiene la propiedad de emitir fluorescencia natural, aprovechando esta característica y mediante microscopia de fluorescencia se observo la presencia de ácido fólico dentro de las nanopartículas de alginato-quitosano.

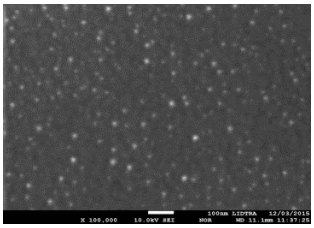


Fig. 1 Micrografías (SEM) de las nanopartículas de alginato-quitosano.

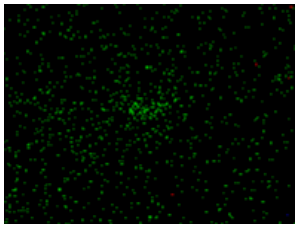


Fig. 2 Microscopía de fluorescencia de conglomerados de nanoparículas de alginato-quitosano.

Cinética de liberación

Para la cinética de liberación hizo uso de una solución de PBS a tres diferentes pH´s: 2, 6.8 y 7.4. se colocaron 4 mg de nanoparticulas cargadas con AF y se dejaron bajo agitación magnética a 300 rpm, se tomarón muestras a las 0, 0.2, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14 y 16 horas. En una cámara de cromatografía conectada a vacío se colocaron columnas de C18 por triplicado, se pipetearon 0.5 ml de la solución de np´s en la columna y posteriormente se eluyeron con 2 ml de solución PBS a los diferentes pH´s. De la solución final colectada, se tomaron 250 µl, se colocaron en una placa de 94 pozos y se leyeron las absorbancias a 348 nm, la cinética se realizó por duplicado con tres repeticiones cada una. Los mayores porcentajes de liberación fueron 50.214 a los 10 min, 48.858 a los 30 min y 33.07 a los 10 min a pH´s 6.8, 7.4 y 2 respectivamente.

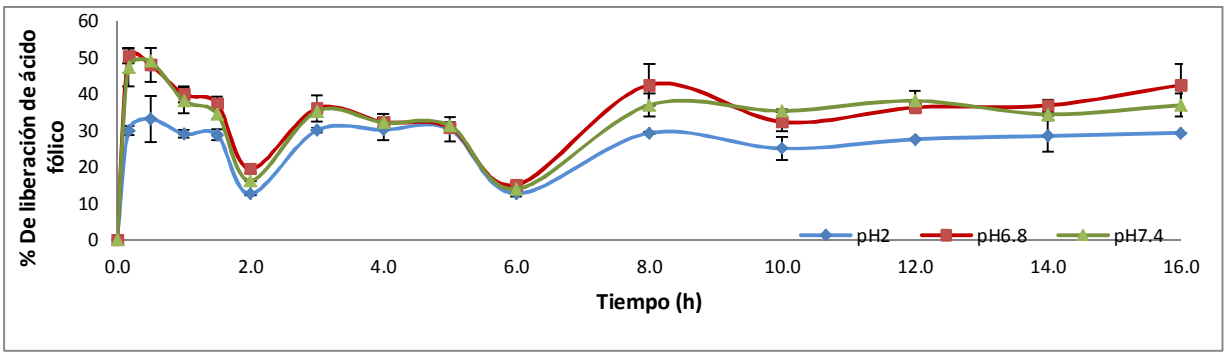


Fig.3 Cinética de liberación del ácido fólico a tres diferentes pH´s. los resultados se expresan como la media ± desviación estándar.

Prueba de protección por fotodegradación

Para la prueba de foto degradación se colocaron 2 mg de nanopartículas cargadas con AF en 5ml de solución PBS a pH 2, 6.8 y 7.4 y una solución de AF conocida y fueron expuestas a una mezcla de rayos UV similares a las de la luz solar durante 2 h y soluciones similares fuero resguardadas de la luz para ser usadas como testigos. Cuando el acido fólico es expuesto a la luz la molécula tiende a sufrir una ruptura entre el carbono 9 del anillo de pteridina y el nitrógeno 10 del ácido p-amino benzoico, en el espectro, esta ruptura puede observarse por un cambio en el pico máximo de absorción a 348 nm (espectros no mostrados). Cuando se presenta un cambio en el pico máximo de absorción a longitudes de onda menores, es porque la molécula ha sido degradada. En los espectros obtenidos se pudo observar que la matriz de alginato-quitosano protege al AF encapsulado una vez que estas fueron expuestas a la luz, esto dado que el ácido fólico no presento ningún cambio en su pico máximo de absorción.

CONCLUSIONES

Mediante el uso de alginato-quitosano como material de pared para la formación de nanopartículas cargadas con ácido fólico se obtuvo una eficiencia de encapsulación del % 95. Por otra parte se puede observar en el comportamiento de liberación del AF retenido en las partículas a diferentes pH´s es a pH 6.8 cuando se obtiene el mayor porcentaje de liberación y los menores porcentajes de liberación se presentan a pH 2; esto por un lado nos indica la posible tendencia de liberación del activo a los diferentes pH´s del tracto gastrointestinal, pero también cual podría ser la tendencia de liberación a diferentes pH´s en alimentos de diferente naturaleza. Ésta matriz mostró la capacidad que tiene de proteger a la molécula de AF de su posible

degradación al ser expuesto a la luz, lo que ofrece una ventaja como agente encapsulante para mantener la estabilidad de este compuesto. (otros análisis cuyos datos no se muestran en el presente escrito, fueron realizados en el presente estudio para la caracterización de las nanopartículas).

REFERENCIAS

[1] Mladenovska K. Cruaud O. Richomme P. Belamie E. Raicki R. S. M.C. Venier-Julienne, Popovski E. J.P. Benoit Goracinova K. (2007). " 5-ASA loaded chitosan-Ca-alginate microparticles: preparation and phisicochemical characterization". International Journal of pharmaceutics (59).

[2] Mrysol Aceituino Medina. (2011). "desarrollo y cracterización de nanoparticulas electroestiradas basadas en proteína aislada de amaranto como vehiculo para la encapsulación de compuestos antioxidantes". Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Querétaro. 80-89.

[3] Ping Li. Ya-Ni Dai, Jun-Ping Zhang, Ai-Qin Wang, Qin Wei. (2008). "Chitosan-Alginate nanoparticles as a novel Drug delivery system for Nifedipine". International Journal Of biomedical science. 4 (3). 221-227.

[4] Sanjay K. Motwani, Shruti Chopra, Sushma Telegaonkar, Kanchan Kohli, Farhan J. Ahmad, Roop K. Khar. (2007). " Chitosan-Sodium alginate nanoparticles as submicroscopic reservoirs for ocular delivery: formulation optimisation and in vitro catacterization". European Journal of pharmaceutics and Biopharmaceutics. (68) 513-521.

[5] Ratul Kumar Das, MSc, Naresh Kasoju, MSc, Utpal Bora, PhD. (2009). "Encapsulation of curcumin in alginate-chitosan-pluronic composite nanoparticles for delivery to cáncer cells". Nanomedicine: nanotechnology, Biology, and medicine (6). 153-160.

[6] Ramesh C. N, Rakesh Kumar, J. K. Pandit. (2012). "Chitosan coated sodium alginate-chitosan nanoparticles loaded with 5-FU for ocular delivery: in vitro characterization and in vivo study in rabbit eye". European Journal of pharmaceutical sciences (47), 679.

MICRO AND NANO-ENCAPSULATION OF BLACKBERRY *(Rubus spp.)* AND BLUEBERRY *(Vaccinium corymbosum)* ANTHOCYANINS

[Micro y nanoencapsulación de antocianinas de zarzamora (*Rubus spp.*) y arándano (*Vaccinium corymbosum*)]

María Alejandra Villaseñor López[a*], Jorge Alberto García Fajardo[a], Eugenia Lugo Cervantes[a+].

[a]Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ), departamento de Tecnología de Alimentos, Avenida Normalistas #800, Colinas de la Normal, C.P. 44270, Tel. (33) 33 45 52 00 Ext. 1241.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: elugo@ciatej.mx

Área del Conocimiento: Q. Alimentos.

ABSTRACT
Red strawberries, strawberry, raspberry, blackberry and blueberry, presented a large increase in its production in Mexico in the past decade with 25,000 cultivated hectares of which is the increased presence in the states of Michoacan (66%) and Jalisco (16%). It has been identified that these berries contain polyphenolic compounds with antioxidant activity including flavonoids, anthocyanins, phenolic acids, tannins, are among others. This has generated great interest due to the benefits they give to health by acting as antioxidants, anticholesterolemic, antimutagenic and anticarcinogenic. However they are only exported to comply the size and color, staying which do not meet these specifications but which are nutritious and contain anthocyanins phenolic compounds etc., therefore the aim of this study was to use of blackberries and cranberries that not comply that exportation specifications and micro ans nanoecapsulate, blackberry (*Rubus spp*.) and cranberry (*Vaccinium corymbosum*) to increase its value added. The content of anthocyanin content and antioxidant was evaluated, before and after the micro and nanoencapsulation which was realizazed by spray drying. Extraction was performed using acidified ethanol. Total phenolics, condensed tannins, antioxidant activity and total anthocyanins were quantified. The concentration of blueberry anthocyanins was 1306.30 ± 180.60 mg eq. cia-3-Glu / gp 100 fresh and 1169.84 ± 113.22 mg eq.cia-3-glu / 100g fresh weight for blackberry. Encapsulant as maltodextrin and gum arabic were used determine the best proportion of these encapsulants by measuring the zeta potential and particle size, with the best ratio 90:10 maltodextrin: gum arabic with a zeta potential (-21mV) and a particle size of 247 nm with 85% distribution.

Keywords: Berries; Anthocyanins; Spray drying, micro and nanoencapsulation.

RESUMEN
Las frutillas rojas -fresa, frambuesa, zarzamora y arándano- han presentado un gran incremento de su producción en México en los últimos diez años con 25 mil hectáreas cultivadas de las cuales la mayor presencia se encuentra en los Estados de Michoacán (66%) y Jalisco (16%) lo cual representa un fuerte potencial para la economía de nuestro país. Se ha identificado que estas frutillas contienen compuestos polifenólicos con actividad antioxidante entre los cuales se encuentran los flavonoides, ácidos fenólicos, taninos, entre otros. Esto ha generado gran interés debido al beneficio que otorgan a la salud actuando

como antioxidantes, anticolesterolémicos, antimutagénicos y anticarcinogénicos. Las antocianinas comprenden un grupo de pigmentos solubles en agua encontrándose principalmente en la epidermis de las frutillas en gran proporción. El objetivo de este trabajo fue micro y nano encapsular las antocianinas provenientes de dos frutillas, zarzamora (*Rubus spp*.) y arándano (*Vaccinium corymbosum*) cuantificando el contenido de antocianinas y la actividad antioxidante antes y después de la micro y nanoencapsulación por secado por aspersión. La extracción se realizó utilizando etanol acidificado con HCl al 0.1%. Se cuantificaron fenoles totales, taninos condensados, actividad antioxidante y antocianinas totales. La concentración de antocianinas de arándano fue 1306.30 ± 180.60 mg eq. cia-3-glú / 100 g pf y 1169.84 ± 113.22 mg eq.cia-3-glu/100g pf para zarzamora. Como agente encapsulante se utilizó maltodextrina y goma arábiga determinando la mejor proporción de estos agentes encapsulantes por medio de la medición del potencial zeta y tamaño de partícula, siendo la mejor relación 90:10 maltodextrina:goma arábiga con un potencial zeta de (-21mV) y un tamaño de partícula de 247 nm con un 85% de distribución.

Palabras Clave: Antocianinas; Secado por aspersión.

INTRODUCCIÓN

Frutillas rojas. En la nomenclatura pomológica el término "baya" se utiliza para describir cualquier tipo de pequeña fruta comestible, por lo general en forma redonda y jugosa, con semillas dentro. Poseen un sabor dulce hasta agrio y con una intensidad diferente en su coloración. Las frutillas rojas se caracterizan por encontrarse en ellas una gran diversidad y alto contenido de compuestos bioactivos [1], entre ellos se encuentran compuestos fenólicos, siendo el mayor grupo de fitoquímicos incluyendo flavonoides (antocianos, flavonoles, flavonas, flavanonas, flavanoles, e isoflavonoides), estilbenos, taninos, y ácidos fenólicos [2].

Antocianinas. Las antocianinas representan el grupo más importante de pigmentos hidrosolubles detectables en la región visible por el ojo humano. Forman parte de un gran grupo de pigmentos solubles en agua que pertenecen a la clase de flavonoides esta propiedad facilita su incorporación en numerosos sistemas alimenticios acuosos. Proporcionan los colores rojo, azul, morado y negro para muchas frutas, verduras y flores [3].

Extracción. La extracción de antocianinas es comúnmente llevada a cabo con metanol o etanol conteniendo una pequeña cantidad de ácido con el objetivo de obtener la forma del catión flavilio, el cual es estable en un medio altamente ácido. No hay diferencia significativa en lecturas de absorbancia o eficiencia de extracción entre el etanol y metanol [4].

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia prima. Se trabajó con frutillas que se adquirieron del Mercado de Abastos de Guadalajara. La zarzamora *(Rubus spp.)* fue variedad <<tupi>>, los arándanos *(Vaccinium corymbosum)* fueron de la variedad “biloxi”.

Extracción de antocianinas con etanol acidificado. La extracción se realizó con 100 g de cada una de las frutillas frescas utilizando etanol acidificado con HCl (0.1%) [4, 5, 6].

Cuantificación de fenoles totales, antocianinas, taninos condensados y actividad antioxidante. La determinación de fenoles totales fue medida por el procedimiento colorimétrico de Folin-Ciocalteu [6], las antocianinas totales fueron cuantificadas con el coeficiente de extinción molar de la cianidina-3-glucósido en su máxima absorción [4] y los taninos condensados con la formación de antocianidinas en un medio con sulfato de amonio férrico [7]. Para la determinación de la actividad antioxidante se utilizaron dos métodos, una modificación del método 2,2-difenil-1-picrilhidracil ($DPPH^+$) [8] y con el método radical $ABTS^+$ [9].

Microencapsulación por secado por aspersión. Para la microencapsulación del extracto de antocianinas se tomó el extracto que se obtuvo de la extracción de los 100 g de las frutillas frescas descrito anteriormente. Se utilizó una concentración de sólidos del 20 % p/p y el 10% p/p de extracto respecto a los sólidos [10]. Se evaluó como agente encapsulante maltodextrina con goma arábiga a diferentes proporciones. Las proporciones evaluadas de maltodextrina-goma arábiga fueron 60:40, 70:30, 80:20 y 90:10 respectivamente. Las matrices se dejaron en hidratación durante toda la noche y al día siguiente se homogenizarón durante 6 minutos a 17,400 RPM utilizando un ultra-turrax. Para seleccionar la proporción adecuada se midió el potencial zeta y el tamaño de partícula en cada una de las mezclas en un (Zetasizer nano-ZS90, Malvern). El secado por aspersión se realizó en un (Mini Spray Dryer B-191, BÜCHI) con una presión de 20,000 psi evaluando tres temperaturas de secado 130, 140 y 150°C y se cuantificaron las antocianianinas totales en cada una de las temperaturas para elegir la que conservara mejor las antocianinas.

Nanoencapsulación. Para la nanoencapsulación se utilizó la relación establecida en la microencapsulación (90:10) maltodextrina-goma arábiga con 20 % p/p de sólidos y 10 % p/p de extracto respecto a los sólidos. La mezcla antes de ser alimentada se homogenizó durante 6 min a 17,400 RPM con un ultra-turrax. Con el fin de reducir el tamaño de partícula aún más y para obtener partículas más uniformes, antes de introducir la mezcla al nano secador, después de haber homogenizado con el ultra-turrax se pasó la mezcla por un microfluidizador (Microfluidics M-110P) en donde se seleccionaron los pasos que hay que realizar a la mezcla para obtener una matriz estable para la nanoencapsulación. Esta selección se hizo en base al tamaño de partícula y al potencial zeta. Para el secado se utilizó un (Nano Spray Dryer B-90, BÜCHI) con una corriente de aire de 116 l/ min una capacidad de flujo de evaporación de 3.33 ml/min, la temperatura del aire fue T_e= 120°C con una T_s= 37°C y la presión fue de 34 bar.

Finalmente se cuantificaron las antocianinas totales, los fenoles totales y la actividad antioxidante por los métodos $ABTS^+$ y $DPPH^+$ de los micro y nanoencapsulados.

RESULTADOS

Tabla 1. Resultados de las cuantificaciones hechas al extracto extraído de las frutillas frescas

	Antocianinas totales	Fenoles totales	Act. antioxidante	TEAC DPPH⁺	Act. antioxidante	TEAC ABTS⁺	Taninos condensados
Frutilla	(mg eq. cia-3-glu/100 g pf) ± SD	(mg eq. ác. gálico/100 g pf)	(%) DPPH⁺	µmol eq. TROLOX/g pf	(%) ABTS⁺	µmol eq. TROLOX /g pf	(mg eq. catequina/100 g pf) ± SD
Arándano	1306.30 ± 180.60	4628.16 ± 10.96	62.46	90.93 ± 1.11	63.8	58.53 ± 0.89	233 ± 24.55
Zarzamora	1169.84 ± 113.22	4317.09 ± 10.21	65.57	95.64 ± 0.93	69.92	64.32 ± 0.55	197 ± 15.67

SD: desviación estándar

Antocianinas totales: expresado como mg eq. de cianidina-3-glucósido/100 g de peso fresco.
Fenoles totales: expresado como mg eq. de ácido gálico/ 100 g de peso fresco.
TEAC: capacidad antioxidante en eq. de TROLOX, expresado en µmol eq. de TROLOX/1 g de peso fresco.
Actividad antioxidante: expresada en porcentaje de act. antirradical.
Taninos condensados: expresado como mg eq. de catequina/100 g de peso fresco.

Selección del agente encapsulante

La relación maltodextrina–goma arábiga se determinó preparando las soluciones y se midió el potencial zeta en cada una de las mezclas de maltodextrina y goma arábiga, se dió como resultado que la mejor mezcla es 90:10 respectivamente obteniendo como un potencial zeta de -21.23 mV ± 0.26 y un tamaño de partícula de 377.71 ± 2.22 nm.

Selección de la temperatura de microencapsulación

Se probaron 3 temperaturas 130, 140 y 150 °C y se evaluó el contenido de antocianinas como variable de respuesta.

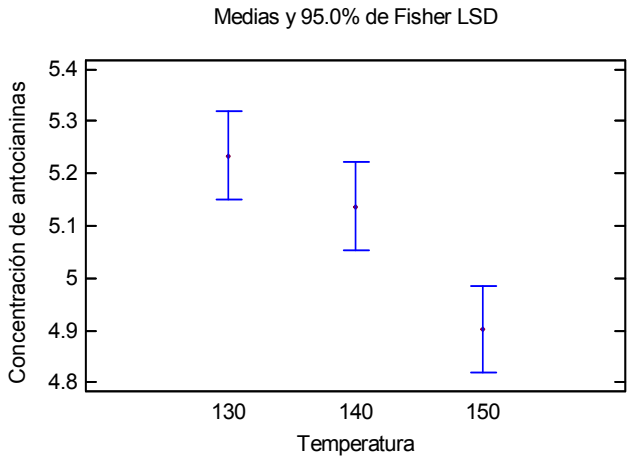


Figura 1. Concentración de antocianinas por temperatura (mg eq. cia-3-glu/100 g MC)

Rendimientos de la Microencapsulacion y Nanoencapsulación de los extractos de antocianinas

Se realizó la microencapsulación y nanoencapsulació de los extractos de arándano y zarzamora y los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Rendimiento de micro y nanoencapsulados

Microencapsulados					
Frutilla	**Volumen a encapsular (ml)**	**Temperatura de encapsulación (°C)**	**Sólidos en la mezcla (g)**	**Gramos obtenidos de MC**	**Rendimiento (%)**
Arándano	100	130	20	14.375 ± 1.31	71.85
Zarzamora	100	130	20	15.275 ± 1.48	76.35
Nanoencapsulados					
Frutilla	**Volumen a encapsular Diluido (1:10) (ml)**	**Temperatura de encapsulación (°C)**	**Sólidos en la mezcla (g)**	**Miligramos obtenidos de NC**	**Rendimiento (%)**
Arándano	50	120	1	689.3 ± 98.57	68.93
Zarzamora	50	120	1	773.9 ± 32.52	77.39

SD: desviación estándar

.

Determinación de antocianinas, fenoles totales, taninos y actividad antioxidante de los micro y nanoencapsulados

En la Tabla 3 se muestran los resultados de la cuantificación de antocianinas, fenoles totales, taninos y actividad antioxidante de los micro y nanoencapsulados. Como se puede observar si hay diferencias en el contenido de antocianinas y fenoles totales sin embargo la actividad antioxidante es muy semejante en los micro y nanoencapsulados.

Tabla 3. Cuantificaciones en los micro y nanoencapsulados de los extractos de frutillas rojas

	MICROENCAPSULADOS				NANOENCAPSULADOS			
FRUTILLA	Antocianinas totales	Fenoles totales	Act. antioxidante	Act. antioxidante	Antocianinas totales	Fenoles totales	Act. antioxidante	Act. antioxidante
	(mg eq. Cia-3-glú/ 100 g de MC) ± SD	(mg eq. ác. gál / 100 g MC) ± SD	ABTS^{+} (%)	DPPH^{+} (%)	(mg eq. Cia-3-glú/ 100 g de NC) ± SD	(mg eq. ác. gál / 100 g NC) ± SD	ABTS^{+} (%)	DPPH^{+} (%)
Arándano	5.23 ± 0.09	96.82 ± 6.96	37.48	47.67	3.66 ± 0.19	43.4 ± 3.5	31.1	45.65
Zarzamora	5.22 ± 0.19	87.4 ± 3.67	35.86	44.23	3.04 ± 0.13	31 ± 1.69	28.5	41.23

SD: desviación estándar

MC: microencapsulado.
NC: nanoencapsulado
Antocianinas totales: expresado como mg eq. de cianidina-3-glucósido/100 g de encapsulado.
Fenoles totales: expresado como mg eq. de ácido gálico/ 100 g de encapsulado.
Actividad antioxidante: expresada en porcentaje de act. antirradical.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La microencapsulación de antocianinas no es nueva, pero en este trabajo se adicionó la nano encapsulación, asimismo este trabajo abre una ventana para utilizar como materia prima frutas que no cumplen con las especificaciones de exportación pero que se encuentran en perfecto estado, solo el tamaño o la intensidad de color cambian. Por otro lado se seleccionaron condiciones para el secado que no afectarán a las antocianinas y como se observó condiciones extremas pueden dañarlas. Además presentaron una actividad antioxidante semejante a la reportada. Los taninos son muy importantes porque se miden en base a catequina que uno de los antioxidantes más importantes.

Agradecimientos: Al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ), donde se realizó este trabajo así como a la Dra. Eugenia Lugo y a al Dr. Jorge Alberto García Fajardo por el apoyo en el trayecto de la investigación.

REFERENCIAS

[1] Agnieszka Szajdek, E. J. Borowska. (2008), "Bioactive compounds and health-promoting properties of berry fruits: a review", Plant foods for human nutrition, 63 (4): 147-156.

[2] Tulipani S, Mezzetti B, Capocasa F, Bompadre S, Beekwilder J, de Vos CH, Capanoglu E, Bovy A, Battino M. (2008), "Antioxidants, phenolic compounds, and nutritional quality of different strawberry genotypes", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56 (3): 696–704.

[3] Petko Denev, Milan Ciz, Gabriela Ambrozova, Antonin Lojek, Irina Yanakieva, Maria Kratchanova. (2010), "Solid-phase extraction of berries anthocyanins and evaluation of their antioxidative properties", Food Chemistry, 123 (4): 1055–1061.

[4] E.-S. M. Abdel-Aal and Hucl PA. (1999), "A Rapid Method for Quantifying Total Anthocyanins in Blue Aleurone and Purple Pericarp Wheats", Cereal chemistry, 76 (3): 350-354.

[5] Araceli Castañeda-Ovando, Ma. de Lourdes Pacheco-Hernández, Ma. Elena Páez-Hernández, José A. Rodríguez, Carlos Andrés Galán-Vidal. (2009), "Chemical studies of anthocyanins: A review", Food chemistry, 113 (4): 859–871.

[6] Carmen María Pino Tinto. (2007) Descripción del desarrollo vegetativo y de las características físicas y químicas de los frutos de cuatro clones de arándano alto. (Tesis de licenciatura, Instituto de economía agraria): 21-23

[7] Rafael A. Ricco, Victoria M. Vai, Griselda A. Sena, Marcelo L. Wagner & Alberto A. Gurni.(2003), "Taninos Condensados de Ephedra ochreata Miers (Ephedraceae)", Acta Farmacéutica Bonaerense, 22 (1): 33-37.

[8] Nieves del Socorro Martínez-Cruz, Katiushka Arévalo-Niño, María Julia Verde-Star,Catalina Rivas-Morales, Azucena Oranday-Cárdenas, Ma. Adriana Núñez-González, Ma. Eufemia Morales-Rubio. (2011), "Antocianinas y actividad anti radicales libres de Rubus adenotrichus Schltdl (zarzamora)", Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, 42 (4): 66-71.

[9] Jimaima Lako, V. Craige Trenerry, Mark Wahlqvist, Naiyana Wattanapenpaiboon, Subramanium Sotheeswaran, Robert Premier. (2007), "Phytochemical flavonols, carotenoids and the antioxidant properties of a wide selection of Fijian fruit, vegetables and other readily available foods", Food Chemistry, 101 (4): 1727–1741.

[10] Sahar Akhavan Mahdavi, Seid Mahdi Jafari, Mohammad Ghorbani & Elham Assadpoor. (2014), "Spray-Drying Microencapsulation of Anthocyanins by Natural Biopolymers: A Review", Drying Technology: An International Journal, 32 (5): 509-518.

CONTENTS OF TOTALS PHENOLICS COMPOUNDS IN TOMATO VARIETY SALADETTE (*Solanum lycopersicum*)

(Contenido de compuestos fenólicos totales en jitomate variedad saladette *Solanum lycopersicum*)

Ismael Ramírez Flores[a,*+], M. del Socorro López Cortéz[a], María Soledad Vázquez Murrieta[a]

[a] Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-IPN. Prolongación de Carpio y Plan de Ayala s/n, Col. Santo Tomás. C.P. 11340. Delegación Miguel Hidalgo. México D.F

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: ismaelramirez12@yahoo.com.mx

Área del Conocimiento: Q. Alimentos.

ABSTRACT
Several studies have shown that tomato (*Solanum lycopersicum*) is an excellent source of antioxidant compounds such as lycopene and other carotenoids compounds. Recent studies have shown the existence of different polyphenolic compounds such as resveratrol, quercetin and routine in these fruits. There are reports on the health benefits provided by these compounds of both the appearance and severity of certain types of cáncer including colon, stomach and prostate. The objective of this study was to determinate and quantify totals phenolics compounds presents in tomato variety saladatte harvested in México.

Palabras Clave: Carotenoides, compuestos fenólicos, jitomate

INTRODUCCIÓN

El consumo de vegetales, constituye una parte importante de la dieta, se les considera generalmente como alimentos “buenos”, ya que las frutas son excelentes fuentes de Vitamina C, ácido fólico y fibra, entre otros, así como las hortalizas que aportan Vitamina A, tiamina, niacina, hierro y alrededor del 10% de las proteínas necesarias requeridas como parte de la energía en la dieta de la ingesta diaria recomendada. La cantidad y tipo de antioxidantes presentes en frutos y vegetales como es el caso del jitomate, el cual será objeto del presente estudio, depende de numerosos factores como variedad del fruto, clima, suelo, estrés salino, entre otros. Algunos autores han reportado que el tipo de suelo así como su composición química y el contenido de minerales influyen en gran medida en la cantidad de antioxidantes que se producen [1].

METODOLOGÍA

La materia prima empleada fue el fruto *Solanum lycopersicum* variedad saladette, proveniente de invernaderos del estado de San Luis Potosí así como de los municipios de Tultitlan y Cuautitlan Izcalli Estado de México. Las muestras del jitomate se seleccionaron de acuerdo a los parámetros establecidos por la norma mexicana NMX-FF-031-1997-SCFI la cual especifica un grado de madurez de color rojo de más del 90% de la superficie, consistencia firme, exentos de insectos, hongos y podredumbre.

Se llevó a cabo la preparación del extracto de las muestras lo cual se realizó por duplicado para la posterior determinación de fenoles solubles totales por medio del método que establece (Capanoglu *et al.,* 2008) [2] con algunas modificaciones:

Preparación del extracto metanólico de las muestras

- Se pesaron 1.0 g de muestra y se mezclaron con 10 ml de solución metanol-agua al 80% en frascos ámbar.
- Se sonicó por 10 minutos.
- Se dejó reposar en agitación por 2 horas a temperatura ambiente.
- Se filtró la solución con papel filtro Whatman No. 5.
- Se mantuvo en refrigeración (4ºC) hasta su uso.

Cuantificación de compuestos fenólicos totales

La cuantificación de compuestos fenólicos totales se realizó de acuerdo a la metodología empleada por (Singleton *et al.,*1999) [3] con algunas modificaciones.

1. Se mezclaron 200 µl del extracto polifenólico y 200 µl del reactivo Folin-Ciocalteau, se dejaron reposar por 4 minutos.
2. Pasado ese tiempo se adicionó 5 ml de una solución de carbonato de sodio al 3% (w/v) dejando reposar por 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente.
3. La absorbancia del color resultante se midió a 760 nm en un espectofotómetro UV-VIS.
4. Las concentraciones de fenoles totales se obtuvieron mediante una comparación con la curva tipo realizada con ácido gálico como estándar, expresándose los resultados como mg equivalentes de ácido gálico (EAG) por cada 100 g de muestra fresca.

RESULTADOS

Los resultados para la cuantificación de compuestos fenólicos totales de las muestras estudiadas se expresan como miligramos equivalentes de ácido gálico por cada 100 gramos de muestra fresca (mgEAG/100g bh).

En la figura 1 se presentan los resultados de los compuestos fenólicos totales ~~que fueron analizados~~ del fruto en estudio jitomate (*Solanum lycopersicum)* variedad saladette.

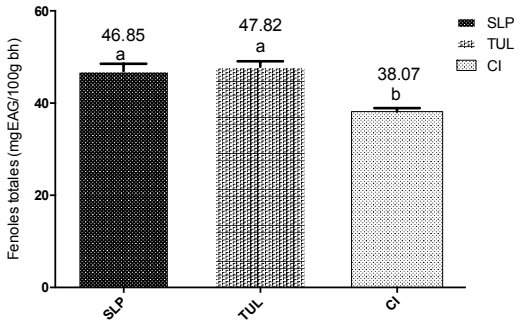


Figura 1. Compuestos fenólicos totales en el fruto fresco. SLP. San Luis Potosí, TUL. Tultitlan, CI. Cuautitlan Izcalli; Valores con diferencia significativa $P<0.05$, letras distintas en cada columna indican diferencia significativa. Promedio ± desviación estándar (n=6). Resultados expresados en base húmeda.

DISCUSIÓN

En la gráfica 1 se puede observar que no existe diferencia significativa entre las muestras de San Luis Potosí y Tultitlan mientras que estas dos muestras si se presentó diferencia significativa con respecto a las muestras de Cuautitlan Izcalli.

Comparando los resultados del fruto fresco con lo obtenido por (Toor & Savage, 2005) [4] y (Ruiz, 2015) [5], que obtuvieron datos entre 15.7 – 20.14 mg EAG/100g bh y 18.09 mg EAG/100g bh respectivamente, las concentraciones de compuestos fenoles totales para el presente estudio resultan significativamente más elevados en las tres regiones (SLP. 46.85 mg EAG/100g bh; TUL 47.82 mg EAG/100g bh; C.I. 38.07 mg EAG/100g bh). Estas diferencias pueden atribuirse a las condiciones climáticas y del suelo ya que la planta del jitomate se desarrolla mejor en climas cálidos y semiáridos cuyos suelos salinos generen mayores mecanismos de protección lo que conlleva a la generación de mayor cantidad de compuestos fenólicos [6].

La concentración de compuestos fenólicos totales en jitomate fresco y diversos productos a base de este fruto elaborados en la industria alimentaria varía de 10.0 a 50.0 mg EAG/100g bh, límites dentro del cual se encuentran los datos que se obtuvieron en el presente estudio [7].

CONCLUSIONES

La presente investigación demuestra que la cantidad de compuestos fenólicos totales presente en las muestras de jitomate mexicano de las tres regiones analizadas, resulto de valor mayor que la reportada en la bibliografía.

Estos resultados muestran que el tomate mexicano tiene una buena calidad respecto a su contenido de compuestos bioactivos.

REFERENCIAS

[1] Fox, G. A. (2008). Ciencia de los Alimentos, Nutrición y Salud (1ª ed.). México.

[2] Capanoglu, E., Beekwilder, J., Boyacioglu, D., Hall, R., & de Vos, R. (2008). Changes in antioxidant and metabolite profiles during production of tomato paste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(3), 964–73.

[3] Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Oxidants and Antioxidants Part A. Methods in Enzymology (Vol. 299).

[4] Toor, R. K., & Savage, G. P. (2005). Antioxidant activity in different fractions of tomatoes. *Food Research International*, *38*(5), 487–494.

[5] Ruiz, G. (2015). Aplicación de las microondas como método de conservación de puré de tomate elaborado con el fruto íntegro y evaluación de sus propiedades antioxidantes. Tesis Maestría. Maestría en Ciencias en Alimentos. Instituto Politécnico Nacional. ENCB.

[6] Senem Kamiloglu, Melek Demirci, Saniye Selen, Gamze Toydemir, D. B. andEsra C. (2014). Home processing of tomatoes (Solanum lycopersicum): effects on in vitro bioaccessibility of total lycopene, phenolics, flavonoids, and antioxidant capacity, *94*, 2225–2233.

[7] Lucio, M. S. (2005). Producción de jitomate en invernadero.



EXTRACTION OF FATTY ACIDS POLYUNSATURATED FROM *Rubus idaeus* PRODUCED IN MICHOACÁN

(Extracción de ácidos grasos polinsaturados de *Rubus idaeus* producido en Michoacán)

Rafael Ortíz-Alvarado[a+], Luis A. García de León Rodríguez[a*], César R. Solorio-Alvarado [b]

[a] Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, CA-211 de Fisiopatologias. Morelia, Michoacán, México. Calle Tzintzuntzan 173 Colonia Matamoros. Morelia, Michoacan, México.C.P. 58240.
[b] Universidad de Guanajuato, División de Ciencias Naturales y Exactas, Departamento de Química. Noria Alta S/N. Guanajuato, Guanajuato, México. 36050.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: rortizalvarado@gmail.com

Área del Conocimiento: (Alimentos funcionales).

ABSTRACT
A novel and green procedure to extract fatty acids form the seed of blackberry *Rubus idaeus* the ^{1}H and ^{13}C NMR analysis were carried out by the first time for this important fruit as well as the GC-FID study, are also described. Raspberry *Rubus idaeus* is broadly produced in Michoacán México. The state is an important world leader producer of this vegetable among others. Every year around six tons of *Rubus idaeus* seed is wasted considering only a surface of 25 Ha. As consequence, a lot of solid organic agro residues are generated only from this fruit. The situation becomes a problem not only because is an important source of soil acidification but also implies great monetary loses for this Mexican area. Based upon that we consider it could be possible to use these wasted seeds to obtain agrochemical compounds with high pharmacological or nutrimental value like fatty acids. Turned this procedure as such that starting from solid waste without nutrimental or commercial value is possible to obtain an important polyunsaturated oil source. Regarding to the extraction procedure herein we describe a green procedure involving a solvent-free microwave-assisted extraction using only water as extracting agent.

Keywords: *Rubus spp.* seed, fatty acid polyunsaturated.

Grant support: Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH proyecto 2014-2015 y Proyecto de Fortalecimiento de cuerpos académicos (PRODEP) proyecto IDCA 9305, CLAVE UMNSH-CA-211.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

STUDY OF THE MAILLARD REACTION

(Estudio de la reacción de Maillard)

Blas Flores Pérez[a], Margarita Romero Ávila[a], Dessire Gabriela Olivar Minjares[a], Ricardo Alberto Miranda Hernández[a].

[a] Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: blasflop@hotmail.com

Área del Conocimiento: Q. Alimentos.

ABSTRACT
The reactions occurring by heating sugars, named in general caramelization, are responsible for the flavor and the development of a brown coloration in cooked or baked products. In such transformations, the reaction rate and the variety of molecules that can be obtained are significantly increased if amino acids or proteins are present. With the idea of obtaining and isolating nitrogenated molecules of pyrrole or pyridine structure, we initiated a study to determine the best conditions to form hydroxymethylfurfural, HMF; with these conditions established, we added amines or amino acids in order to trap the reaction intermediate. The results show that it is highly likely that a furan type cyclic structure is formed before the amine derivative react with the carbohydrate.

Keywords: Maillard Reaction; HMF; heterocycles; pyrrole and pyridine.

RESUMEN
Las reacciones que se producen al calentar azucares son responsables del sabor a caramelo y el desarrollo de una coloración marrón. La velocidad de la reacción y la variedad de productos que se pueden formar aumentan significativamente cuando se encuentran presentes aminoácidos o proteínas, proceso conocido como la Reacción de Maillard. Con la idea de obtener y aislar moléculas derivadas de pirrol o piridina, iniciamos un estudio para determinar las mejores condiciones para formar HMF y, bajo éstas, añadir aminas y aminoácidos a fin de atrapar al intermedio de reacción. Los resultados obtenidos muestran que una estructura cíclica tipo furano se forma antes de que el derivado aminado ataque al carbohidrato.

Palabras Clave: Reacción de Maillard; HMF; heterociclos; pirrol y piridina.

INTRODUCCIÓN

La reacción de Maillard [1], responsable del oscurecimiento no enzimático en los alimentos, incluye la formación del grupo imina ente azúcares y aminoácidos; una posterior tautomería, transposición de Amadori, y eliminación del derivado aminado, degradación de Strecker, conduciendo a la formación de una gran cantidad de compuestos, incluyendo los de tipo heterocíclico [2,3], que en algunos casos pueden ser deseables (aromas cárnicos sintéticos o color caramelo) [4], Tabla 1, pero también conlleva a alteraciones organolépticas y pérdidas del valor nutritivo de los alimentos [5,6].

Tabla 1. Aromas generados por diferentes compuestos en alimentos tratados térmicamente.

Tipo de heteociclo	Aroma	Detectado en
Pirazinas	Tostado, cereales horneados	Alimentos calentados en general
Alquilpirazinas	Nuez, asado	Café
Alquilpiridinas	Amargo, astringente, quemado	Café, cebada, malta
Acil piridinas	Galleta salada	Cereales
Pirroles	Cereal	Cereales, café
Furanos, piranos	Dulce, quemado, caramelo, picante	Alimentos calentados en general
Oxazoles	Nuez, dulce	Cacao, café, carne
Tiofenos	Carne	Carne cocida

Por otro lado, el hidroximetilfurfural (HMF) es un compuesto intermedio en la reacción de Maillard que se produce cuando las hexosas se calientan en presencia de aminoácidos o proteínas. Una ruta alternativa consiste en la deshidratación térmica directa de fructosa, sacarosa y de glucosa. Esta reacción no requiere la presencia de grupos amino y está catalizada en condiciones ácidas.
El HMF se forma en la reacción de Maillard por degradación del producto de Amadori, a través de una enolización-1,2, siendo la 3-deoxiosona el intermedio clave en la reacción. El compuesto de Amadori es capaz de generar, en las mismas condiciones de reacción, aproximadamente 10 veces más HMF que el respectivo azúcar y aminoácido [7].

La caramelización requiere una mayor energía de activación y temperaturas más elevadas que la reacción de Maillard aunque, de manera similar, también se forma el intermedio 3-desoxiosona. La Figura 1 muestra la formación de HMF por deshidratación de los azúcares durante el calentamiento.

Los azúcares reductores durante la caramelización, a través de una enolización-1,2, sufren reacciones de deshidratación y ciclación para formar el HMF. En condiciones de baja humedad, se ha propuesto una vía alternativa de formación de HMF a partir de la transformación de sacarosa en fructosa, que conduce a la formación del catión reactivo fructofuranosil, el cual puede convertirse directamente en HMF.

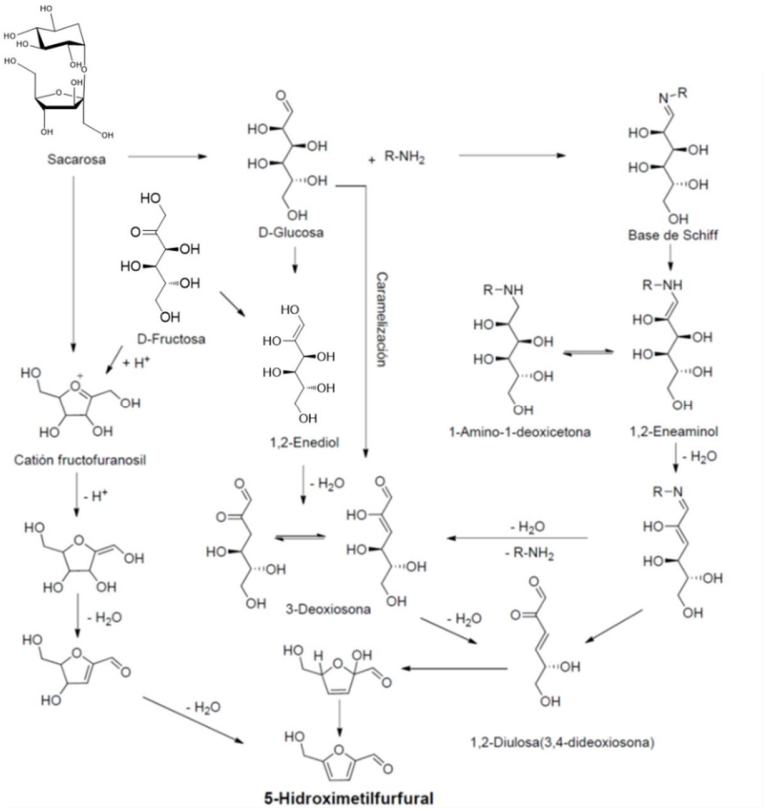


Figura 1. Algunas rutas de formación del 5-hidroximetilfurfural (HMF).

Teniendo estos antecedentes, consideramos que si se lograba determinar las condiciones óptimas de formación del HMF, podríamos atrapar al intermedio que conduce a éste por la adición de derivados aminados, incluidos aminoácidos. Con la finalidad de obtener compuestos que, toda vez caracterizados y evaluados, puedan en un futuro ser usados como aditivos alimentarios.

De la Figura 1, consideramos que teníamos dos posibilidades: un sistema abierto o uno cerrado tipo furano, Figura 2.

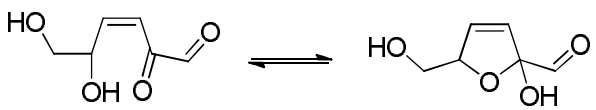


Figura 2. Equilibrio del intermedio que conduce a HMF

METODOLOGÍA

Nuestra primera aproximación fue el utilizar fructosa, diferentes disolventes, catalizadores ácidos, temperaturas y tiempos de reacción que se resumen en la Tabla 2. El mejor resultado fue el utilizar cloruro de amonio, isoprapanol como disolvente, 24 h de reacción y 120° C de temperatura.

Tabla 2. Resultados experimentales para la obtención de HMF

Catalizador	Condiciones de reacción	Resultado	Observaciones
Ácido cítrico, H_3BO_3, ácido glicólico	140°C, 2 h	No se encontró presencia de HMF por RMN-H	Metodología tomada de Matsumiya y Hara [8], con HPLC detectan el HMF
NH_4Cl	Etanol, 120°C, diferentes tiempos,	Presencia de HMF, rendimiento del 7%, 24 h	
NH_4Cl	Isopropanol, diferentes tiempos 120°C.	Presencia de HMF, rendimiento del 29%, 24 h	Mejor metodología encontrada hasta el momento
HCl (37%)	160°C, diferentes tiempos	Presencia de HMF, rendimiento del 23%, y otros productos de la reacción no caracterizados, 3 minutos.	
HCl (37 %)	110°C, diferentes tiempos	Presencia de HMF, rendimiento del 17%, y otros productos de la reacción no caracterizados, 3 minutos.	
Ácido acético	110°C, diferentes tiempos	Presencia de HMF, rendimiento 3%,	Antes de 15 minutos no se observó HMF, y pasada 1 hora se generaron subproductos
Ácido fórmico	110°C, diferentes tiempos	Entre 15 y 30 minutos de reacción se observa la presencia de HMF, rendimiento 27%	Al monitorear a 1 hora la reacción, se observaron subproductos
Ácido oxálico	110°C, diferentes tiempos	Presencia de HMF, 13% de rendimiento, y otros subproductos, 30 minutos.	

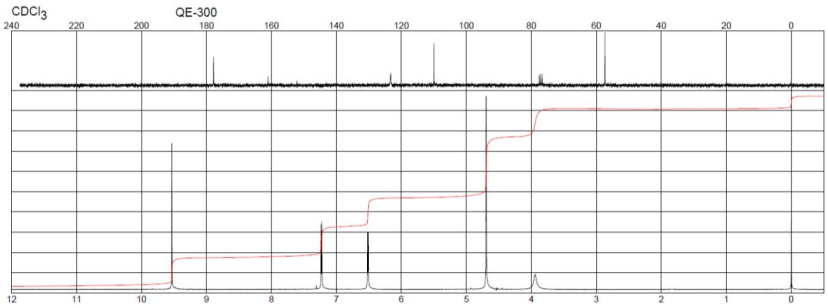


Figura 3. Espectro de RMN del HMF tomado de Aldrich

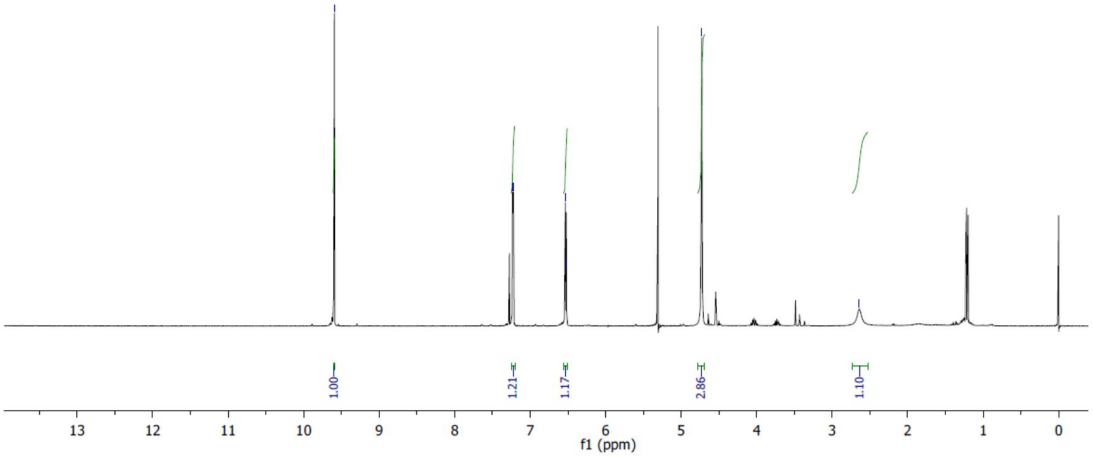


Figura 4. Espectro de RMN-^{1}H del HMF obtenido experimentalmente

Usamos estas condiciones de reacción con azúcar comercial (morena y refinada) para obtener HMF, pero el rendimiento fue menor, 19%, que el obtenido con la fructosa, 29%. Por lo que decidimos usar ésta en la reacción con los derivados aminados.

Los derivados aminados y la fructosa se colocaron en una misma relación molar en isopropanol, la mezcla se calentó a 120° C y fue monitoreada por cromatografía en capa fina hasta observar formación de un producto distinto a HMF.
Como derivados aminados se usaron anilina, fenilalanina, arginina y lisina, estos tres últimos de la familia L. Sólo con anilina y arginina se observó formación de la imina, en los otros casos se recuperó el aminoácido y se aisló HMF, no detectamos presencia de otros productos.

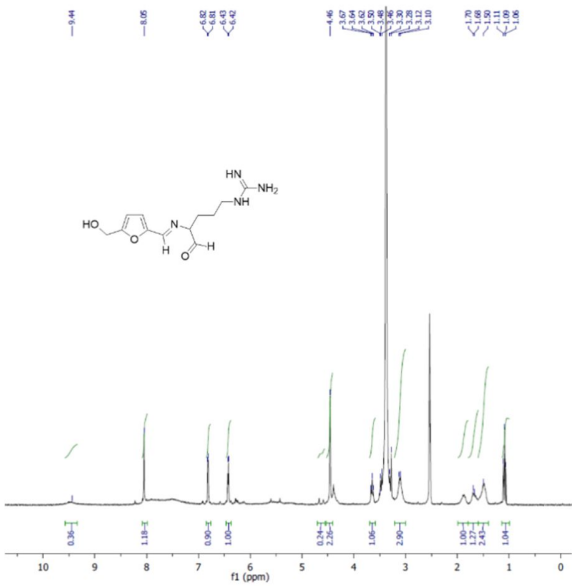


Figura 5. Espectro de RMN-^{1}H de la imina del HMF con arginina

DISCUSIONES

De los resultados experimentales anteriores, se puede decir que la deshidratación de la fructosa en HMF catalizada por cloruro de amonio en isopropanol es un proceso que se lleva a cabo en un sistema cerrado. Como se muestra en la Figura 6, la descomposición del catalizador genera amoniaco y ácido clorhídrico, éste cataliza la deshidratación y la posterior formación de la imina.

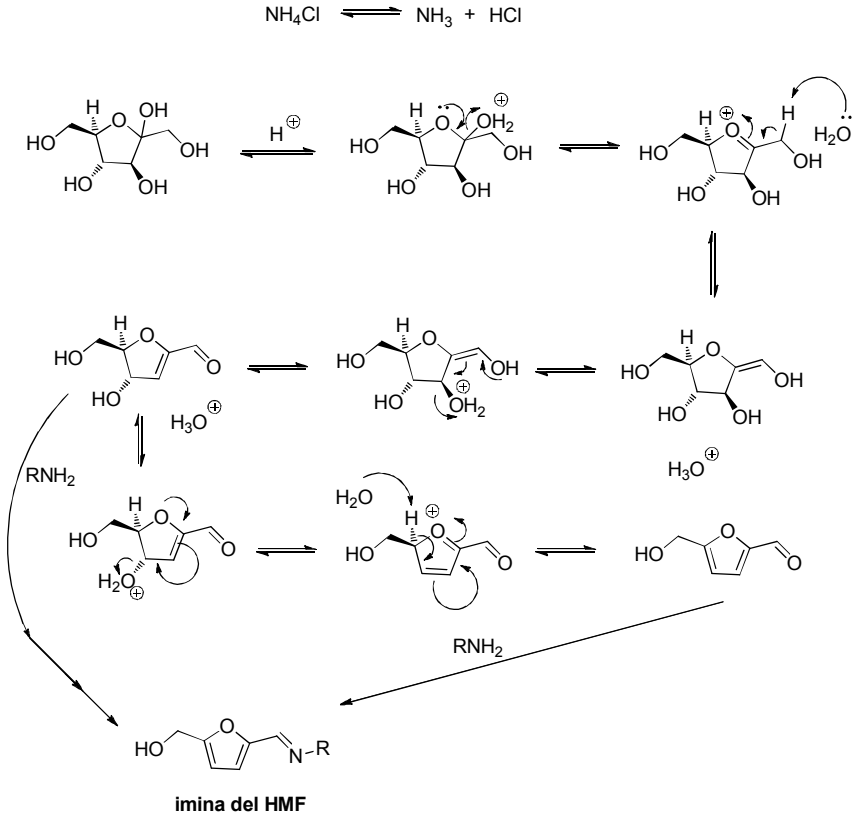


Figura 6. Mecanismo razonable para la formación de la imina

CONCLUSIONES

1) La obtención de HMF se obtiene con rendimientos regulares al calentar la fructosa en cloruro de amonio.
2) Estas condiciones no son las óptimas
3) La estructura cíclica de la fructosa es la que conduce a la formación del HMF
4) Se obtuvieron iminas, de la anilina y la arginina, bajo las condiciones de reacción de formación del HMF.

REFERENCIAS

[1] Maillard, L. C. (1912). “Action des acides amines sur les secres: formation des melanodines par voie Methodique”, Comptes rendus de l´Académie des sciences, 154: 66-68.

[2] Martins, S., Jongen, W., van Boekel, M. (2001). "A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling", Trends Food Sci. Technol., 11: 364-373.

[3] Murata, M., Totsuka, H., Ono, H. (2007). "Browning of furfural and amino acids, and a novel yellow compound, furpipate, formed from lysine and furfural", Biosci. Biotechnol. Biochem., 71(7): 1717-1723.

[4] Barham, P., et al. (2010). "Molecular gastronomy: a new emerging scientific discipline". Chem. Rev., 110: 2313–2365.

[5] Gerrard, J. A. (2002). "New aspects of an AGEing chemistry. Recent developments concerning the Maillard reaction". Aust. J. Chem., 55(5): 299-310.

[6] Meade, S. J., Reid, E. A., Gerrard, J. A. (2005). "The impact of processing on the nutritional quality of food proteins". J. AOAC Int., 88: 904-922.

[7] Perez-Locas, C., Yaylayan, V. A. (2008). "Isotope labeling studies on the formation of 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde (HMF) from sucrose by pyrolysis-GC/MS". J. Agric. Food Chem., 56: 6717-6723.

[8] Matsumiya, H., Hara, T. (2015). "Conversion of glucose into 5-hydroxymethylfurfural with boric acid in moltenmixtures of choline salts and carboxylic acids", biomass and bioenergy, 72: 227-232.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

OSMOTIC DEHYDRATION OF PEAR FRUIT USING AN EXPERIMENTAL DESIGN APPROACH

(Determinación de las condiciones óptimas para la deshidratación de peras por osmosis)

Sandra Sofía Ramírez Sánchez[a], María Fernanda Curiel Romero[a], Michelle Guadalupe Torres Castro[a], Allyson Téllez Martínez[a*], José Isael Gutiérrez Espinosa[a+].

[a] Universidad Autónoma de Guadalajara AC, Av. Patria 1201, Lomas del Valle, Zapopan, Jalisco 45129.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: jose_isael7@hotmail.com

Área del conocimiento: Q. Alimentos

ABSTRACT
Osmotic dehydration has recently been considered as an alternative for the conservation of fruits and vegetables, in order to improve the viability, reduce costs and to improve the dehydration processes. The present study was conducted in order to identify the conditions for which pears show the higher loss of weight. There were examined the effects of cutting thickness (0.5, 1.25, 2.0 cm), dehydration temperature (35, 45, 25 °C), weight/solution volume rate (12.5/50, 18.75/75, 25 g / 100mL) and dehydration time (2, 3, 4 hours). The concentration of the solution was kept constant at 65 °Brix, and the weight of fresh fruit/volume of solution rate was fixed as 1/4. A fractionated factorial design 2^{4-1} was used and it was added with central points. The statistical analysis was done using Statgraphics Centurion XVI and it was determined with 95% confidence that the most influencing factors on weight loss were thickness of cut and dehydration time. A regression equation able to predict weight loss was computed including thickness of the cut, dehydration time and weight/solution volume rate. It was estimated a maximum loss of weight of 70.71%. It can be concluded that the conditions of operation: 0.5 cm of thickness, at 25°C for 4 hours and a weight fresh fruit/solution volume rate of 25g of fruit/100 mL of osmotic solution lead to the higher weight loss.

Keywords: fractional factorial design, linear regression, weight loss, preservation of fruit.

APPLICATION TECHNOLOGY AND THERMAL-PHYSICAL CHARACTERISTICS SYSTEM ORANGE JUICE-INULIN SPRAY DRYING.

(Aplicación Tecnológica y características Físicas-Térmicas de un Sistema de Jugo de Naranja-Inulina secado por Aspersión)

María Zenaida Saavedra Leos[a], Rosa Eréndida Fosado Quiroz [a], César Leyva Porras[b], Ana Lourdes López Pablos[a-c], Sandra Berenice Araujo Díaz[c*].

[a] Coordinación Académica Región Altiplano. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Carretera Cedral Km. 5+600 Ejido San José de las Trojes Matehuala, S.L.P. C.P. 78700. México. Tel. 01 (488) 882-72-15.
[b] Centro de Investigación de Materiales Avanzados (CIMAV). Alianza Norte No 202, Parque de Investigación e Innovación Tecnológica, C.P. 66600, Apodaca Nuevo León, México. Tel. 01(81)11560802.
[c] Doctorado Institucional en Ingeniería y Ciencia de Materiales (DICIM). Sierra Leona No. 530 Col. Lomas 2da. Sección, Planta Baja, C.P. 78210 . San Luis Potosí, S.L.P., México. Tel. 01 (444) 8262300.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: sandra_berad@hotmail.com

Área del conocimiento: Q. Alimentos

ABSTRACT
In Mexico, lost from 15% to 40% of fresh fruit, this loss is mainly due to lack of suitable methods for conservation and can be decreased, obtaining a powder by drying process spray. However, one of the greatest problems arising during this process is sticking and agglomeration of material on the dryer surface. This is accentuated even more for foods that have high sugar content in their chemical composition, as in the case of fruit juices. However, most studies have only been performed with these additives and not with inulin, a prebiotic considered a very important property: the glass transition temperature of 125°C, which can avoid the problem of stuck. Therefore, the objective of this work was to obtain a powder of orange juice added with inulin (functional food). The powder was characterized MDSC to determine Tg; Thermogravimetry (TGA) coupled to a DSC to characterize the thermal degradation temperature (Td) and melting point (Tm); the structure analysis by X-ray diffraction (XRD). Tg for inulin was observed at 126◦C, while for inulin–orange juice was observed 90◦C. On the Non-reversible heat flow curves a single event is shown corresponding to the degradation temperature identified as Td peak.

Keywords: Inulin, Differential scanning calorimetry, Spray Drying.

RESUMEN
En México se han generado pérdidas desde 15% a 40% de fruta fresca, ésta pérdida se debe principalmente a la falta de métodos adecuados para su conservación, la cual puede ser disminuida obteniendo polvo por un proceso de secado por aspersión. Sin embargo, uno de los mayores problemas que se presentan durante este proceso es el apelmazamiento y pegado del material en la superficie de la cámara de secado; este problema se ve más acentuado en alimentos con alto contenido de azúcar en su composición química, como es el caso de los jugos de fruta. No obstante, se han realizado muchos estudios únicamente con estos aditivos y no con inulina, un prebiótico considerado con una propiedad importante: la temperatura de transición vítrea de 125°C, la cual puede evitar problemas de pegado. Por

lo anterior, el objetivo de este trabajo fue obtener un polvo de jugo de naranja adicionado con inulina (alimento funcional). El polvo fue caracterizado con MDSC para determinar temperatura de transición vítrea (T_g); Termogravimetría (TGA) acoplado a un DSC para caracterizar la temperatura de degradación térmica (T_d) y punto de fusión (T_m) y análisis de estructura por difracción de rayos X (XRD). La Tg de la inulina fue observada a 126◦C, mientras que para inulina-jugo de naranja se observó a 90◦C. Sobre la curva de flujo de calor no reversible se presentó un evento correspondiente a la degradación de la temperatura identificado como el pico de temperatura de degradación.

Palabras Clave: Inulina, Calorimetría Diferencial de Barrido, Secado por aspersión.

INTRODUCCIÓN

En el año 2010, México obtuvo una producción de 617 millones de toneladas de frutos entre los que destacan la naranja, la tuna, el mango, etc. El 70% fue consumido como fruta fresca, un 25% fue destinado para usos industriales, y solamente el 5% fue enviado a exportación. Sin embargo, la falta de métodos adecuados para su conservación, el mal manejo postcosecha y la disminución del costo del producto en el mercado, han provocado pérdidas desde un 15% hasta un 40% de fruta fresca. Es una cifra considerable, por lo que deben buscarse métodos de conservación para alargar la vida de anaquel, obtener mínimas pérdidas de componentes volátiles y mantener las cualidades nutritivas y organolépticas durante su procesamiento y almacenamiento. El secado por aspersión es uno de los métodos preferidos, ya que ofrece tiempos de residencia cortos y la retención de un alto porcentaje de los nutrientes del alimento. Debido a que en los jugos los principales componentes son azúcares de bajo peso molecular, el apelmazamiento y pegado son problemas comunes durante su procesamiento y almacenado. Para evitar este tipo de problemas se utiliza el concepto de temperatura de transición vítrea (T_g), con el fin de establecer las condiciones del secado por aspersión y predecir la estabilidad durante el almacenamiento. En la práctica se sabe que un producto es más estable cuando es almacenado a una temperatura por debajo de su T_g. Por lo anterior, en este trabajo se utilizó inulina como agente acarreador, ya que tiene una T_g de 125 °C, lo que evita problemas de pegado, además de ser considerada un prebiótico.

METODOLOGÍA

Preparación de las muestras por secado por aspersión

Inulina de Dalia (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., U.S.A., 99.9 % pureza) a una concentración de 30% w/w se utilizó como agente acarreador o coadyuvante para obtener Jugo de naranja-inulina. El deshidratado se realizó en un Mini Spray Dryer B290 (Buchi, Switzerland). Las condiciones de operación utilizadas fueron: temperatura de alimentación de 40°C, flujo de alimentación de 7cm^3/min, un flujo de aire caliente de 28 m^3/h, 70% de aspiración y una presión constante de 1.5 bar. La temperatura de entrada fue de 210°C y la de salida, 70°C; para obtener un producto seco. Aproximadamente 2 g de extracto seco de cada lote fueron colocados en desecadores individuales que contenían soluciones de sales saturadas (NaOH, $CaCl_2$, K_2CO_3, $MgCl_2$, $SrCl_2$ y NaCl) y se almacenaron en una incubadora a 35°C por un periodo de 30 días o hasta alcanzar el equilibrio [1]. Al término de este periodo se evaluó la actividad de agua (a_w) de cada muestra, empleando un equipo Aqualab (series3 Quick Start, Decagon Devices), y se determinó el contenido de humedad por duplicado según el método propuesto por la AOAC.

Estudios simultáneos de análisis termogravimétrico (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC)

El estudio TGA-DSC fue realizado con un equipo SDT Q600 (TA Instruments, Lukens Drive, New Castle, DE 19720, U.S.A.) provisto del software Análisis Universal 2000© para análisis termogravimétrico con DSC simultáneo, desde temperatura ambiente hasta 1500°C, con una sensibilidad en peso y precisión en temperatura de ± 0.1 µg y ± 0.001°C, respectivamente. La línea base fue calibrada con indio (156.60°C, 28.47 J/g). Se utilizaron muestras de 5 a 10 mg debidamente pesadas en crisoles de aluminio de 90 µL con una microbalanza electrónica (Mettler Toledo R-3769, XS205, ±0.01 mg). La rampa de calentamiento empleada fue de 5 °C/min, desde temperatura ambiente hasta 500°C. A partir de las curvas TGA-DSC, para cada una de las muestras evaluadas se determinó la evolución de la reducción en masa, así como los valores inicial, pico y final de la temperatura de fusión de la muestra ($T_{m\ onset}$, $T_{m\ peak}$ y $T_{m\ endset}$) y de la temperatura de degradación de la misma ($T_{d\ onset}$, $T_{d\ peak}$ y $T_{d\ endset}$).

Calorimetría Diferencial de Barrido Modulado (MDSC)

Se utilizó un DSC Q200 (TA Instruments, U.S.A.) equipado con un sistema de enfriamiento RCS90 para análisis, en un rango de temperatura de -90 a 550 °C, con precisión de ±0.1°C y sensibilidad de ±0.2 W. La línea base fue calibrada con indio (156.60 °C, 28.47 J/g), mientras que la calibración de la capacidad calorífica (Cp) se realizó utilizando zafiros. Las muestras de 5 a 10 mg, debidamente pesadas en celdas de aluminio Tzero® (TA Instruments), fueron herméticamente selladas, haciendo los experimentos por triplicado. La calorimetría diferencial de barrido modulado consistió en una rampa de -90°C a 250 °C, una velocidad de 5 °C/min, un periodo de modulación de 40 segundos y una amplitud de 1.5°C.

Difracción de Rayos X (XRD)

El estado amorfo o cristalino del jugo de naranja-inulina fue determinado analíticamente usando un difractómetro de rayos X (PANalytical model Empyrean) con radiación CuK_a (λ=1.5406 Å) operado a 45 kV y 40 mA y un detector X'Celerator en una geometría Bragg-Brentano. El barrido de las muestras fue realizado en un rango de 2θ de 10° a 100° con un paso de 0.016° y 20 segundos por paso en modo continuo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Isotermas de adsorción

La Figura 1 muestra el contenido de humedad en equilibrio del jugo de naranja-inulina a a_w desde 0.05 hasta 0.710 a 30 °C. El contenido de humedad del equilibrio se expresa como la cantidad de agua adsorbida en g por 100 g de muestra seca. La línea continua que une los puntos dispersos representa la regresión de acuerdo con el modelo de GAB. Se observan tres diferentes zonas. La zona I, con una a_w de 0 hasta 0.20, corresponde a la adsorción de una monocapa de moléculas de agua unidas por interacciones tipo puente de hidrógeno. Esta agua esta fija a los grupos polares de algunos compuestos, concretamente NH_3^+, COO^- y OH^-, por lo que se trata de agua fuertemente ligada, que no se puede eliminar por deshidratación y no es congelable. En la zona II, con una a_w de 0.20 a 0.60, se encuentran las capas de

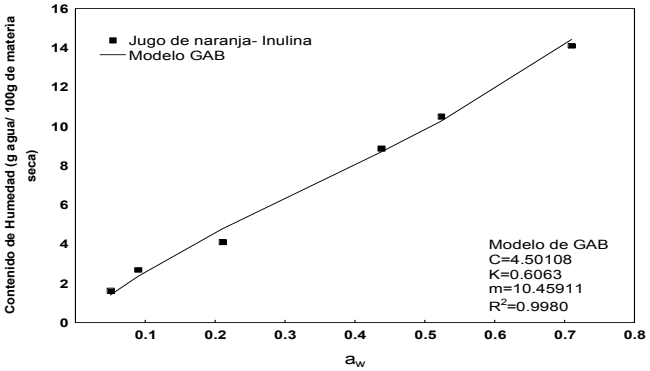


Figura 1. Isoterma de adsorción del sistema jugo de naranja-inulina a 30°C, ajustado con el modelo de GAB (línea continua).

agua suplementarias o capas multimoleculares con enlaces de hidrógeno de menor energía que representan el agua libre. En la zona III, que corresponde a a_w mayor a 0.60, está el agua que permite la disolución de los elementos solubles y puede servir de soporte a los agentes biológicos tales como enzimas y microorganismos. Para el jugo de naranja-inulina adsorbió 4 g de agua por 100 g de materia seca a una a_w de 0.20 en la zona I y 11 g de agua por 100 g de materia seca en la zona II. Según Sablani y colaboradores [2], un producto es más estable con contenido de agua en el nivel de monocapa. La absorción de agua en los alimentos es un fenómeno complejo, que varía con la composición química, la estructura y las condiciones ambientales [3].

Análisis térmico con calorimetría diferencial de barrido simultáneo (TGA - DSC)

En la Figura 2, se muestran los termogramas para a_w 0.050 y 0.710 que corresponden a un valor de a_w bajo y alto, respectivamente. Se observa un único endoterma a 220 ° C para ambos casos. Este endoterma está asociado a una transición de primer orden, que corresponde a la degradación térmica y a una pérdida de masa, aproximadamente del 30 %, para a_w 0.050 y de 55% para a_w 0.710. Esta pérdida de masa se atribuye a la descomposición de largas cadenas moleculares, los procesos de polimerización y reacciones de isomerización vinculados a la deshidratación [4]. Sin embargo, para a_w= 0.050 no se presenta la temperatura de fusión, debido a que a esta condición de humedad el sistema aún permanece en estado amorfo. De manera similar sucede para la muestra correspondiente a una a_w=0.710, donde no se observó la temperatura de fusión. Esto se atribuye a que la temperatura de fusión es muy pequeña o a una superposición de la evaporación de agua en el intervalo de temperatura de 50-150°C. Por otra parte, autores como: Saavedra-Leos y colaboradores [5] y Hurtta y colaboradores [6] han reportado que en sistemas ricos en azúcar, las transiciones de fusión y degradación térmica se llevan a cabo en un rango de temperatura muy estrecho. Esto sugiere que la fusión y degradación térmica ocurrieron a la misma temperatura para el sistema jugo de naranja-inulina. Por los objetivos establecidos en esta investigación, se identificaron los valores T_{inicio}, T_{pico} y T_{final} y valores de fusión y degradación térmica de ambas transiciones térmicas. Debido a la complejidad del sistema estudiado, estos resultados de TGA-DSC indican que las transiciones de fusión y cristalización se traslapan y no es posible determinar con precisión la T_g por DSC convencional. Por lo tanto, es necesario realizar un estudio más completo para este fin.

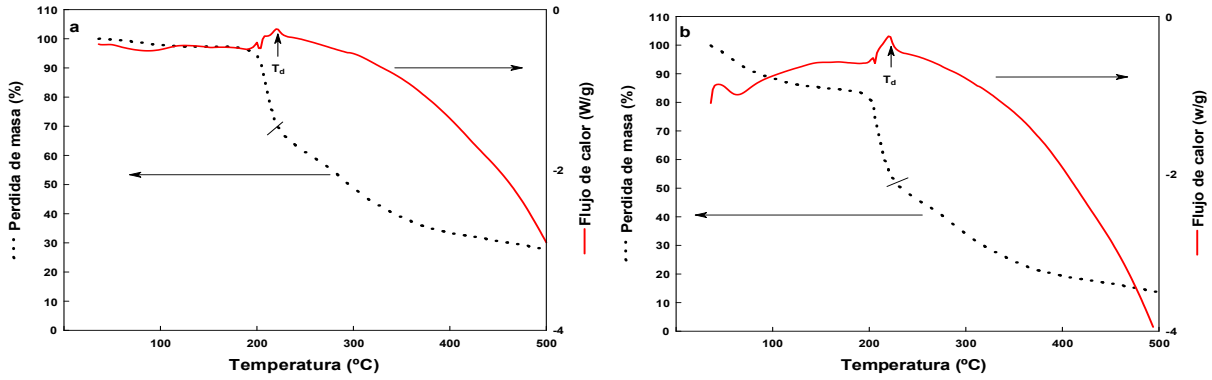


Figura 2. Termogramas TGA-DSC para el sistema jugo de naranja-inulina a) a_w=0.050; b) a_w=0.710.

Calorimetría Diferencial de Barrido Modulado (MDSC)

En la Figura 3, se muestra el flujo de calor total con respecto a la temperatura desde aw 0.050 hasta 0.710, donde el flujo de calor es la suma de los flujos de calor reversible y no reversible. En la figura, se observa una ligera variación que corresponde a un cambio endotérmico asociado a una transición de segundo orden (Tg), seguida de transiciones de primer orden como la fusión y la degradación térmica del sistema. A valores de aw de 0.050 y 0.090 no se presenta un endoterma de fusión, ya que los sistemas están aún en un estado amorfo, siendo los valores de Tg de 92.7°C y 77.4°C, respectivamente. Diversos autores como: Ronkart y colaboradores [7] y Zimeri y Kokini [8] han trabajado con sistemas puros como la inulina y no con sistemas tan complejos como una mezcla heterogénea: jugo de naranja-inulina. Dado que no hay resultados similares en la literatura, estos resultados se soportan con los obtenidos mediante las técnicas de Rayos X y TGA. La determinación precisa de la Tg se llevó a cabo calculando la primera derivada del flujo de calor con respecto a la temperatura.

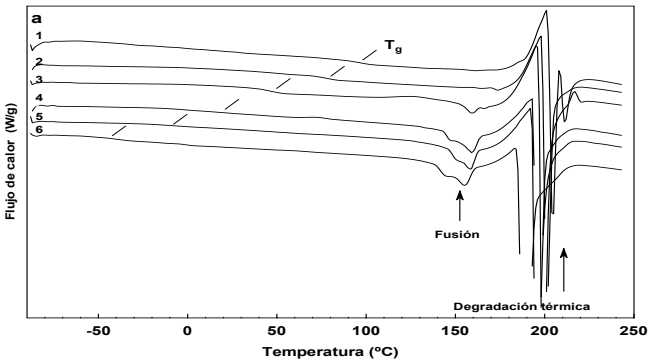


Figura 3. Termogramas de flujo de calor de MDSC para jugo de naranja-inulina a diferentes actividades de agua. Cada una de las curvas se identifica en las curvas por los números: (1)a_w =0.050, (2)a_w =0.090, (3)a_w =0.210, (4) a_w =0.432, (5)a_w =0.532, y (6)a_w =0.710.

Difracción de Rayos X

En la Figura 4 se muestran los difactogramas de rayos X para el sistema jugo de naranja-inulina a diferentes actividades de agua. A a_w bajas (0.050 y 0.090), se observó un único pico de difracción en una

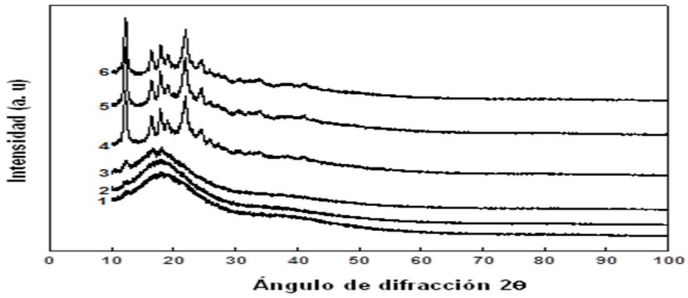


Figura 4. Difactograma de rayos X para jugo de naranja-Inulina a diferentes actividades de agua: (1)a_w=0.050, (2)a_w=0.090, (3)a_w=0.210, (4)a_w= 0.432, (5)a_w= 0.532 y (6)a_w=0.710.

banda amplia de difracción; esta banda indica el estado amorfo de los sistemas. Al incrementar la actividad de agua se observó la presencia de picos de difracción, los cuales indican la presencia de material cristalizado. El contenido de agua en el sistema produce una movilidad molecular que favorece la

reorganización estructural, provocando que el sistema pase de un estado metaestable a un estado cristalino. A una a_w de 0.437 se observó la formación de cristales; por encima de este valor, la cristalinidad se mantuvo sin cambios. Los azúcares de bajo peso molecular como la glucosa y fructosa, que contiene el zumo de jugo de naranja, contribuyen a alcanzar un estado más estable debido al movimiento molecular de estos componentes. Burnett y colaboradores [9], reportaron que la cristalinidad es más afectada en sistemas que contienen una gran cantidad de azúcares de bajo peso molecular. En general, estos resultados coinciden con los obtenidos mediante las técnicas de TGA-DSC Y MDSC.

CONCLUSIONES

Se obtuvo un alimento con un valor nutritivo (jugo de naranja- inulina) en estado amorfo sin problemas de pegado, basándose en conceptos de ciencia y tecnología como la T_g. Se elaboraron isotermas de adsorción donde se establece la evolución del contenido de agua en función de la humedad, como un parámetro indicativo para la conservación del sistema. Se determinaron, cuantitativamente y mediante rayos X, los cambios de estado amorfo a un estado de mayor ordenamiento cristalino.

REFERENCIAS

[1] Kiranoudis CT, Maroulis ZB, Tsami E, Marinos-Kouris D. (1993). "Equilibrium moisture content and heat of desorption of some vegetables", Journal of Food Engineering, 20: 55-74.

[2] Sablani SS, Kasapis S, Rahman MS. (2007). "Evaluating water activity and glasstransition concepts for food stability", Journal of Food Engineering, 78: 266–271.

[3] Roos YH. (2002). "Importance of glass transition and water activity to spray drying and stability of dairy powders", Lait 82: 475-484.

[4] Abd-Elrahman MI, Ahmed SM. (2009). "Thermal degradation kinetics and geometrical stability of D-sucrose", International Journal of Polymeric Materials, 58: 322–335.

[5] Saavedra-Leos MZ, A. Grajales-Lagunes, R. González-García, A. Toxqui-Terán, S.A Pérez-García, M.A. Ruiz-Cabrera. (2011). "Glass transition study in model food systems prepared with mixtures of fructose, glucose and sucrose", Journal of Food Science, 77(5): E118-E126.

[6] Hurtta M, Pitkänen I, Knuutinen J. (2004). "Melting behavior of D-sucrose, D-glucose and D-fructose", Carbohydrate Research, 339: 2267–2273.

[7] Ronkart NS, Paquot M, Fougnies C, Deroanne C, Blecker C. (2009). "Effect of water uptake on amorphous inulin properties", Food Hydrocolloids, 23: 922–927.

[8] Zimeri JE, Kokini JL. (2003). "Phase transitions of inulin–waxy maize starch systems in limited moisture environments", Carbohydrate Polymers, 51: 183–190.

[9] Burnett DJ, Thielmann F, Sokoloski T, Brum J. (2006). "Investigating the moisture-induced crystallization kinetics of spray-dried lactose", International Journal of Pharmaceutics, 313: 23–28.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

METHOD DEVELOPMENT FOR THE ANALYSIS OF A GROUP OF EMERGENT POLLUTANTS (PBDEs) IN SEWAGE SLUDGE USING (HSSPME-GC-MS)

[Desarrollo de la metodología para el análisis de un grupo de contaminantes emergentes (PBDEs) en lodos residuales usando (HSSPME-GC-MS)]

Brenda Mejía-Ortiz[a*+], Ana V. Reyes-Fierro[a], Beatriz A. Rocha-Gutiérrez[a], Luis de La Torre[b]

[a]Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Chihuahua, Campus Universitario #2, Circuito Universitario, Chihuahua, Chihuahua, México, C.P. 31125
[b] Centro de Investigación de Materiales Avanzados, Ave. Miguel de Cervantes 120
Complejo Industrial Chihuahua Chihuahua, Chihuahua, México, C.P. 3110

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: brendamejiaortiz@gmail.com

Área del conocimiento: Química Analítica.

ABSTRACT
A headspace solid-phase microextraction gas chromatography coupled with mass spectrometry (HSSPME-GC-MS) methodology for determination of a group of flame retardants named polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in sewage sludge samples is presented. PBDEs are considered emergent pollutants and they persist in the environment. Since they are not regulated, large amounts of these chemicals are dumped into the drainage and consequently they are released into aquifers, rivers or irrigation canals. To the authors' knowledge, this is the first time that SPME technique has been applied to analyze PBDEs coupled only with GC-MS in sewage sludge, most of the studies report GC-MS-MS for the detection of these compounds. The samples were collected from a wastewater treatment plant from Chihuahua, Mexico. The aim of this study is to development and implement an efficient and environmentally friendly sample preparation technique for the extraction and detection of PBDEs in sewage sludge samples. The target PBDEs analyzed were the most commonly detected in waste water and sewage sludge which are: 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47), 2,2',4,4',5-pentabromodiphenyl ether (BDE-99) and 2,2',4,4',6-pentabromodiphenyl ether (BDE-100).The hypothesis of this research is that high recoveries of target PBDEs present in sewage sludge can be reach using HSSPME-GC-MS. Analysis were performed using 5 mL of sewage sludge and SPME fibers coating of 7 µm PDMS, 75 carboxen/PDMS and 85µm polyacrylate (PA) were evaluated to determine the best recovery of target PBDEs, the one that provides better results was the coating of 85µm polyacrylate. The fibers were exposed to headspace at 100°C for 60 min, the desorption conditions were set at 280°C for 3 min. Other parameters evaluated were: adsorption and desorption time, it was observed that 60 minutes of adsorption and 3 minutes of desorption showed reliable results. The target congeners BDE-47, BDE-99 and BDE-100 were detected in the sewage sludge samples.

Keywords: polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), SPME, GC/MS, wastewater.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

COLORIMETRIC DETECTION OF Ba^{2+} IONS USING 11-MERCAPTOUNDECYLPHOSPHONIC ACID FUNCTIONALIZED GOLD NANOPARTICLES

(Detección colorimétrica de iones Ba^{2+} usando nanopartículas de oro funcionalizadas con el ácido 11-mercaptoundecilfosfónico)

Blanca Alicia García-Grajeda[a*+], Sergio A. Águila[b], Héctor Peinado-Guevara[a], Adriana Cruz-Enríquez[a], José de Jesús Campos-Gaxiola[a]

[a] 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
[b] Centro de Nanociencia y Nanotecnología (CNyN-UNAM), Grupo Bionanotecnología, Km. 107 Carretera Tijuana-Ensenada, Ensenada, B.C., C.P. 22800

*Blanca Alicia García-Grajeda.
+Autor para correspondencia: blank_aly@hotmail.com

Química Analítica.

ABSTRACT
Barium (Ba) is considered a highly toxic heavy metal, and his widely used in various industrial processes, such as corrosion protection films, scavenger in electronic tubes, etc. Ba^{2+} contaminates water and soil; it reacts violently with water, forming salts. All barium salts, specially the water and acid-soluble compounds are highly toxic (for example, barium chloride). Gold nanoparticles (AuNPs) have been widely used in the development of colorimetric probes for detecting metal ions and biomolecules because of their unique optical properties. AuNPs can be synthesized in a straightforward manner and remain highly stable after proper surface modification. In order to develop a sensitive colorimetric detection method for Ba^{2+}, was used 11-mercaptoundecylphosphonic acid functionalized gold nanoparticles (AuNPs-MPA). AuNPs were prepared by citrate reduction of $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$ in the aqueous solution to obtain a deep red. AuNPs-MPA were obtained by functionalized the AuNPs by MPA solution. Various concentration of Ba^{2+} (90-1000 µM) were prepared using colloidal solution at room temperature in order to evaluate the detection of Ba^{2+}. To evaluate the functionalized of AuNPs with MPA, IR spectroscopy were used to determine the formation of Au-S bond, these results indicate that MPA binds on the surface of the gold nanoparticles. The characteristic absorption band of AuNPs was measured by the technique of UV-vis, and the maximum absorption was located at 530 nm. Colorimetric detection of Ba^{2+} was also evaluated by UV-Vis and the TEM technique. The TEM is a precise technique because through micrographs is possible to observe if an aggregation between AuNPs and Ba^{2+} ions occurs. A linear relationship was found when the concentration of Ba^{2+} ions was between 70 and 100 µM. the limit of detection for Ba^{2+} was found to be 0.25 µM.

Keywords: gold nanoparticles, colorimetric detection, Ba^{2+} ions.

RESUMEN

El bario (Ba) es considerado un metal pesado altamente tóxico, y éste es usado en varios procesos industriales, tales como películas protectoras anticorrosivas, en tubos electrónicos, etc. Los iones de Ba^{2+} son contaminantes del agua y del suelo; ya que reaccionan violentamente con el agua formando sales con un alto grado de toxicidad (por ejemplo, cloruro de bario). Por otra parte, las nanopartículas de oro (AuNPS) han sido ampliamente utilizadas en el desarrollo de pruebas colorimétricas para detectar iones metálicos y biomoléculas, debido a sus únicas propiedades ópticas. Las AuNPs pueden funcionalizarse fácilmente y muestran gran estabilidad después de su modificación. Con la finalidad de desarrollar un método sensible para la detección colorimétrica de Ba^{2+}, se funcionalizaron AuNPs usando el ácido 11-mercaptoundecilfosfónico (AuNPs-MPA). Las nanopartículas de oro fueron obtenidas mediante la reducción de $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$ en solución acuosa, empleando citrato de sodio y, funcionalizadas con MPA obteniendo el sistema AuNPs-MPA. Se evaluó la detección de Ba^{2+} utilizando varias concentraciones (90-1000 µM) usando el sistema obtenido AuNPs-MPA. Mediante la técnica de espectroscopia de IR se evaluó la funcionalización de AuNPs con MPA mediante la formación del enlace Au-S, sugiriendo que MPA se une a la superficie de AuNPs. La banda de absorción de AuNPs se obtuvo mediante UV-vis, observando un máximo de absorción a 530 nm. La detección colorimétrica de Ba^{2+} fue evaluada por UV-vis, así como por la técnica de TEM, la cual es muy precisa, ya que mediante los resultados de las micrografías es posible observar si se produce la agregación entre AuNPs y los iones de Ba^{2+}. Se encontró una relación lineal al utilizar concentraciones de Ba^{2+} entre 70 y 100 µM. El límite de detección encontrado para Ba^{2+} fue de 0.25 µM.

Palabras Clave: nanopartículas de oro, detección colorimétrica, iones de Ba^{2+}.

INTRODUCCIÓN

Las nanopartículas de oro (AuNps) son definidas como partículas discretas entre 1 y 100 nm de tamaño. Éstas se pueden dispersar en agua (“hidrosoles”) o en disolventes orgánicos (“organosoles”), dependiendo de las condiciones de preparación y agentes que las rodean [1]. Las AuNps se han convertido en los últimos años en materiales muy estudiados por su amplia gama de aplicaciones en: sensores, la electrónica y en espectroscopia Raman mejorada de superficie [2]. La resonancia superficial de plasmón (SPR por sus siglás en inglés) de las AuNps es muy sensible y fuertemente afectada por parámetros estructurales como el tamaño, forma, espacio interpartícula, y el medio ambiente dieléctrico que las rodea; en particular, las propiedades ópticas de AuNPs se ven directamente influenciadas por dichos parámetros, permitiendo aplicaciones en la construcción de sensores colorimétricos para iones metálicos y otros análitos [3]. Los métodos colorimétricos son muy atractivos debido a que no requieren materiales de partida de alto costo, los procesos de detección son muy simples, y utiliza equipo de bajo costo [4]. Las nanopartículas de oro funcionalizadas son ampliamanete utilizadas para evaluar la sensibilidad colorimétrica de iones metálicos [5], ya que éstas presentan fuertes propiedades ópticas por la banda de absorción SPR, que produce la agregación de AuNps y el ion metálico, debido al acoplamiento de plasmón interpartícula [6]. En los métodos colorimétricos esta agregación del análito con las AuNps conduce a un desplazamiento hacia el rojo en la banda de absorción SPR reultando en un cambio de color de rojo a azul en el coloide.

METODOLOGÍA

Las nanopartículas de oro fueron obtenidas la reducción de citrato de $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$ [7]. Se realizó la disolución acuosa de la sal de $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$ a 70 °C. Después se adicionó una solución de citrato trisódico

hasta obtener un color rojizo en el coloide. Se incrementó la temperatura a 95 °C y se adicionó una solución de MPA, obteniendo Nps de oro funcionalizadas (AuNps-MPA).

Interacción de AuNPs con el ión metálico. Se realizaron dispersiones coloidales tomando 1 mL de la solución de AuNPs-MPA, variando la concentración del ion en estudio. Dichas muestras fueron preparadas a temperatura ambiente.

RESULTADOS

En este reporte se funcionalizaron nanopartículas de oro con MPA para la detección de Ba^{2+}. MPA fue adherido a la superficie de AuNps a través del enlace de azufre, y el resultado pudo ser usado para la detección de iones metálicos.

Caracterización de AuNps-MPA. En la

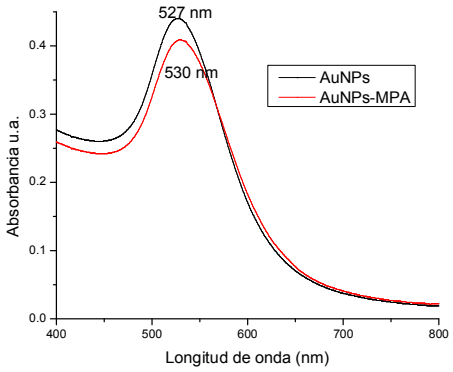


Figura 1 se muestran los espectros de absorción del coloide de oro antes y después de ser modificado por MPA (la solución buffer con la que fue preparada la solución fue de 4). La banda superficial de plasmón muestra un ligero desplazamiento hacia el rojo, de 527 nm a 530 nm asociado con la unión de MPA a AuNPs [3][8]. Este desplazamiento se debe al incremento que ocasiona dicha unión debido al índice de refracción que rodea al medio [9].

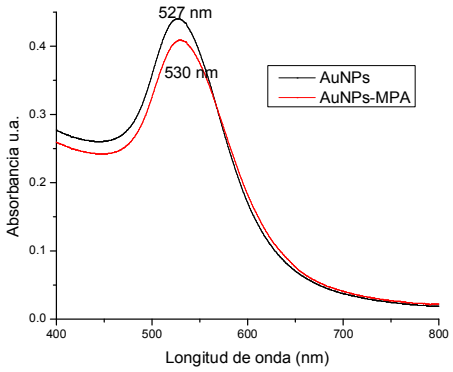


Figura 1. Espectros de UV-vis de AuNPs antes y después de funcionalizarse con MPA.

Espectroscopia de IR. AuNPs-MPA fueron caracterizadas por IR. Las señales de vibración características de MPA 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) (2)

[10]. Las señales características que aparecen en MPA a 2250-2400 cm-1 (S-H) desaparecen en el espectro correspondiente a AuNPs-MPA indicando la desprotonación de S-H , sugiriendo que MPA se une a la superficie de AuNPs mediante el enlace Au-S, llevándose a cabo la funcionalización del sistema AuNPs-MPA [5][11].

Para evaluar la selectividad de AuNps-MPA se probaron varios metales en solución acuosa, tales como: Na^{+}, Li^{+}, K^{+}, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Cd^{2+}, Hg^{2+}, Sr^{2+} y Ba^{2+}. La

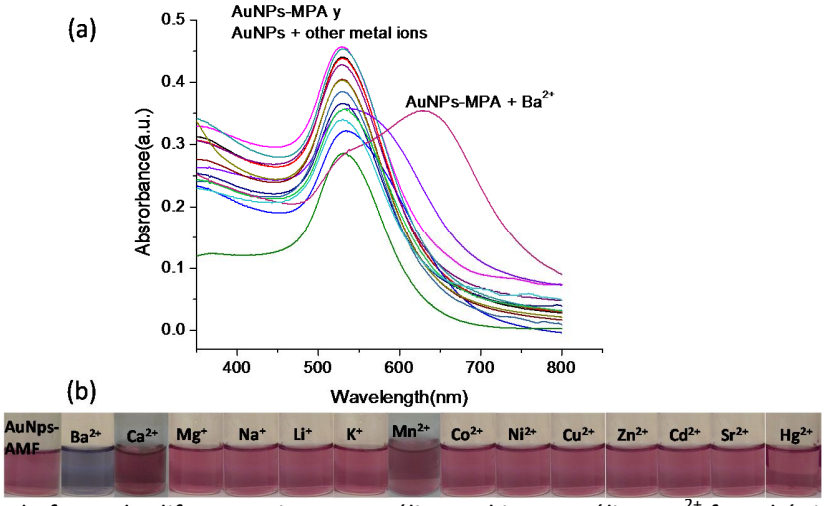


Figura 2 muestra el efecto de diferentes iones metálicos. El ion metálico Ba^{2+} fue el único ion que causa un desplazamiento en el pico de absorción de plasmón de 530 nm a 605 nm. Este desplazamiento hacia el rojo fue observado con un cambio en el color del coloide de rojo a azul. Otros iones metálicos no causan ninguna influencia en el espectro de absorción de AuNps-MPA indicando que no ocurre agregación a causa de éstos. El grado de agregación de AuNps-MPA depende de la concentración de los iones de Ba^{2+}; en la Figura 3a se observa el cambio de absorción SPR al adicionar diferentes concentraciones de Ba^{2+}. La absorbancia a 530 nm decrece con el incremento de las concentraciones de Ba^{2+}. Una nueva banda aparece a 605 nm después de añadir Ba^{2+} como resultado de la agregación inducida de AuNps-MPA. El color de AuNps-MPA con diferentes concentraciones de Ba^{2+} cambia de color de rojo a azul acompañado de un desplazamiento batocrómico en el espectro de UV-vis como se muestra en la Figura 3b. Se encontró una relación lineal cuando la concentración de los iones de Ba^{2+} se encuentran entre 70 y 100 µM. El límite de detección encontrado para Ba^{2+} fue de 0.25 µM (R^2=94.9 %) (Figura 3c).

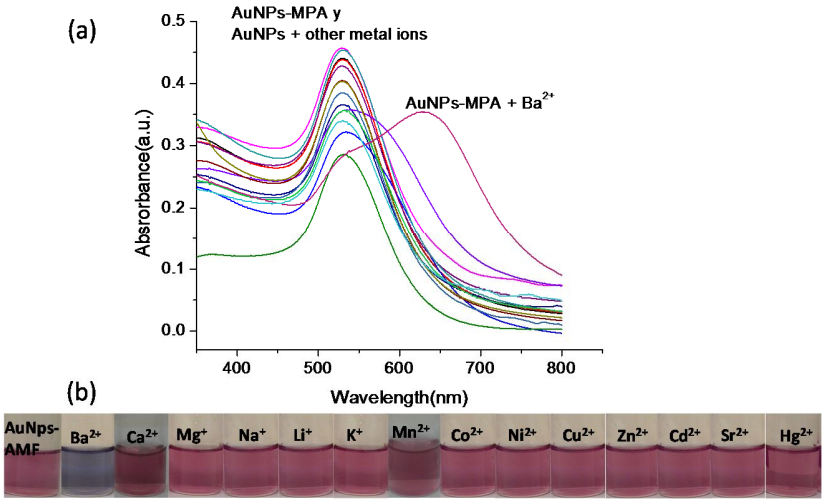


Figura 2. (a) Espectros de UV-vis de AuNps-MPA en presencia de diferentes iones metálicos (100 µM). (b) Imágenes fotográficas de AuNps-MPA en presencia de varios iones metálicos.

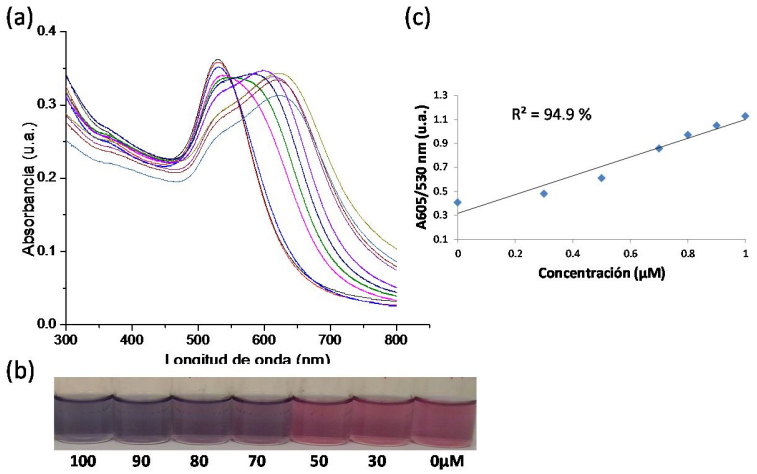


Figura 3. (a) Espectro de UV-vis de AuNps-MPA después de adicionar diferentes concentraciones de Ba^{2+}. (b) Imágenes de la detección de Ba^{2+}. (c) Curva de calibración: A605/530 contra concentraciones de Ba^{2+}.

Mediante las imágenes de TEM se confirmó la dispersión de AuNps-MPA (Figura 4a), y fueron comparadas con las obtenidas después de adicionar 100µM de Ba^{2+}. La Figura 4b muestra que el ion Ba^{2+} induce la agregación de AuNps-MPA.

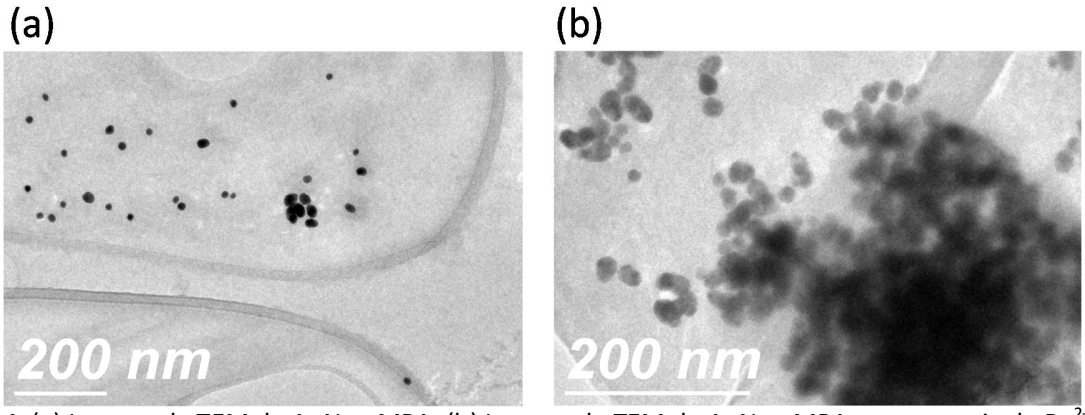


Figura 4. (a) Imagen de TEM de AuNps-MPA. (b) Imagen de TEM de AuNps-MPA en presencia de Ba^{2+}.

CONCLUSIONES

En este trabajo se desarrolló un sistema colorimétrico AuNps-MPA. Se demostró que AuNps-MPA puede ser usado para detectar iones de Ba^{2+} de manera efectiva. Ba2+ fue el metal que indujo la agregación de AuNps-MPA, observándose también en un cambio en el color del coloide de rojo a azul, así como un desplazamiento en la banda superficial de plasmón de 530nm a 605 nm. El sistema colorimétrico es un método que permite monitorear iones de Ba^{2+} a un bajo costo y de manera rápida a bajas concentraciones tales como: 0.25µM.

REFERENCIAS

[1] Zhou, J., Ralston, J., Sedev, R., Beattie, D. (2009) "Functionalized gold nanoparticles: Synthesis, structure and colloid stability". Journal of Colloid and Interface Science, 331: 251-262.

[2] Wu, S., Chen, Y. and Sung, Y. (2011) "Colorimetric detection of Fe3+ ions using pyrophosphate functionalized gold nanoparticles". The Royal Society of Chemistry, 136: 1887-1891.

[3] Su, D., Yang, X., Xia, Q., Chai, F., Wang, C. and Qu, F. (2013) "Colorimetric detection of Hg2+ using thioctic acid functionalized gold nanoparticles". The Royal Society of Chemistry, 3: 24618-24624.

[4] Chen, L., Lou, T., Yu, C., Kang, Q. and Chen, L. (2011) "N-1-(2-Mercaptoethyl)thymine modification of gold nanoparticles: a highly selective and sensitive colorimetric chemosensor for Hg2+". The Royal Society of Chemistry, 136: 4770-4773.

[5] Gunupuru, R., Maity, D., Bhadu, G.R., Chakraborty, A., Srivastava, D.N. and Paul. (2014) "Colorimetric detection of Cu2+ and Pb2+ ions using calix[4]arene functionalized gold nanoparticles". J. Chem. Sci, 126 (3): 627-635.

[6] Sung, Y-M., Wu, S-P. (2014) "Highly selective and sensitive colorimetric detection of Ag(I) u singN-1-(2-mercaptoethyl)adenine functionalized gold nanoparticles". Sensors and Actuators, 197: 172–176.

[7] Kimling, J., Maier, M., Okenve, B., Kotaidis, V., Ballot, H. and Plech, A. (2006) "Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited". J. Phys. Chem. B, 110: 15700-15707.

[8] Sung, Y.M., Wu, S.P. (2014) "Colorimetric detection of Cd(II) ions based ondi-(1H-pyrrol-2-yl)methanethione functionalized gold nanoparticles". Sensors and Actuators B, 201: 86–91.

[9] Xuen, D., Wang, H., Zhang, Y. (2014) "Specific and sensitive colorimetric detection of Al3+ using 5-mercaptomethyltetrazole capped gold nanoparticles in aqueous solution" Talanta, 119: 306–311.

[10] Sergio A. Paniagua, et al. (2008) "Phosphonic Acid Modification of Indium-Tin Oxide Electrodes: Combined XPS/UPS/ Contact Angle Studies". J. Phys. Chem., 112: 7809-7817.

[11] Cruz Enriquez, A., Rivero Espejel, I. A., García, E., Díaz-García, M. E. (2008) "Enhanced resonance light scattering properties of gold nanoparticles due to cooperative binding".Anal Bioanal Chem, 1-9.

INFOCHEMICALS OF GUAVA WEEVIL: CHROMATOGRAPHIC PROFILE

(Infoquímicos del picudo de la guayaba: Perfil cromatográfico)

Ma. de la Paz Elizalde González[a], Esmeralda García Díaz[a*+], Hilda Mota Nava[a], Rodolfo Trejo Vázquez[b].

[a] Centro de Química, Instituto de Ciencias, Universidad Autónoma de Puebla, Edif. 103H, Ciudad Universitaria, Av. San Claudio s/n, Puebla, Pue. 72570 México.
[b] Departamento de Ingeniería Química, Instituto Tecnológico de Aguascalientes, Av. López Mateos 1801, Fracc. Bonagens, Aguascalientes, Ags. 20256 México.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: esmeralda.garcia.uap@gmail.com

Área del Conocimiento: Química Analítica.

ABSTRACT
Conotrachelus dimidiatus Champion or guava weevil is a major pest affecting the guava crops in Mexico, especially in the region of Calvillo, Aguascalientes. Females of guava weevils make a hole in the immature fruit and lay an egg. The single oviposition per fruit is characteristic of this specie. The newly hatched larvae grow inside the fruit and causes destruction and blackening of the pulp and seeds. The attacked fruits ripen and harden prematurely. Furthermore, larval excrement ferments the fruit making it unfit for industry, human or animal consumption. Like other insects of Curculionidae family, *dimidiatus* use chemical communication by secreting infochemicals that determine their behavior. In the field of pest control, the study of pheromones represents an opportunity of non-chemical control with significant achievements worldwide. In this work we studied extracts from females and males in order to obtain a chromatographic profile of the substances that can be used in the chemical communication of the species. Extracts of different parts of the insect were prepared in hexane and dichloromethane. Extraction was tested by immersion into the solvent and using ultrasonic pulses. Samples were analyzed by FID gas-chromatography with a capillary column of medium polarity. The results showed significant differences between the extraction method, body segments and sex of the insect. The Kóvats indexes were determined for the major compounds under gradient regime.

Keywords: guava weevils; infochemicals; gas chromatography, Kóvats indexes.

QUANTIFICATION OF CYCLOPHOSPHAMIDE INCORPORATED INTO LAYERED DOUBLE HIDROXIDES, USING HIGH PERFORMANCE LIQUID CHOMATOGRAPHY (HPLC)

[Cuantificación de ciclofosfamida incorporada en hidróxidos dobles laminares, mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)]

Karina Jeanette Parra Saavedra[a*+], Adriana Macaria Macías Lamas[a], Ana María Puebla Pérez[a] Gregorio Guadalupe Carbajal[b]

[a]Departamento de Farmacobiología. Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías. Universidad de Guadalajara. Blvd. Marcelino García Barragán #1421, col. Olímpica, Guadalajara, Jalisco, México.
[b]Departamento de Química. Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías. Universidad de Guadalajara. Blvd. Marcelino García Barragán #1421, col. Olímpica, Guadalajara, Jalisco, México.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: karina_ps21@hotmail.com

Área del Conocimiento: Química Analítica.

ABSTRACT
The layered double hydroxides (LDH) are synthetic compounds with structures analogous to hydrotalcite, they have high adsorption capacity, functionalization, great chemical and thermal stability, simple and economic synthesis, excellent biocompatibility, and therefore a wide range of applications, among which is the application in cancer therapy. Within the most commonly used chemotherapy drugs is cyclophosphamide, it is a prodrug, which is activated by hepatic enzymes. In the pharmaceutical area, binding of LDH nanoparticle with this kind of drug can be an option of improvement the dissolution processes and controlled release. In order to quantify the amount of drug in LDH, analytical techniques as HPLC represent a tool with high efficiency and sensitivity. The objective of this study was to determine the concentration of cyclophosphamide, which was incorporated into LDH and to have a validated analytical tool to quantify the analyte of interest. The LDH samples with incorporated cyclophosphamide were obtained through synthesis by the coprecipitation method; they were subsequently subjected to an extraction of the analyte with HCl 0.1 M for analysis by HPLC. It was used an Agilent 1260 equipment with quaternary pump, diode array detection (DAD) and a Zorbax SB C18 5µ (150 mm x 4.6 mm) column. The elution was performed using as mobile phase water: acetonitrile 60:40 respectively, a flow of 1 mL/min and a run time of 3.5 min. As a result, the analytical method was validated obtaining a coefficient of variation <2%, as well as a recovery between 98% -102 %.
Therefore, it was possible the obtaining of an analytical HPLC method with diode array detection, this technique is suitable for quantification of the amount of cyclophosphamide loaded into LDH samples, complying the parameters of accuracy and reproducibility to the effective determination.

Keywords: Layered double hydroxides, cyclophosphamide, quantification, HPLC.

CHEMOMETRIC MODEL FOR DETECTION OF ADULTERANTS IN OILS BY MID-FTIR SPECTROSCOPY AND MULTIVARIATE ANALYSIS

(Modelo quimiométrico para la detección de adulterantes en aceites por medio de espectroscopia MIR-FTIR y análisis multivariante)

Nayeli Sarahí Quiñones-Islas[a*+], Tzayhrí Gallardo-Velázquez[b], Guillermo Osorio-Revilla[c], Juan Fabricio Lazcano-Escobar[c].

[a] Campo Experimental Tecomán, Centro de Investigación Regional Pacífico Centro del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.
[b] Departamento de Biofísica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN.
[c] Departamento de Ingeniería Bioquímica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: quinones.nayeli@inifap.gob.mx

Área del Conocimiento: Química Analítica.

ABSTRACT
Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) coupled to multivariate analysis was used to detect and quantify the adulteration of olive and avocado oil with different edible oils (sunflower, canola and soybean). A SIMCA (Soft Independent Modeling Class Analogy) method was also developed to discriminate between adulterated and unadulterated samples. Olive oil, avocado oil and adulterants (sunflower, canola and soybean oils) were characterized based upon their chemical analysis (peroxide and iodine value). In order to build the quantitative calibration model for each adulterant, mixtures of olive oil, avocado oil and each adulterant were prepared in a range of 2–50% (vol/vol). Partial Least Square (PLS) algorithm was tested to model each system (olive oil+adulterant and avocado oil+adulterant) and the chemical analysis of the mixture. The SIMCA model developed showed 100% correct classification rate of adulterated samples from unadulterated ones. The PLS model shows values of R^2 greater than 0.98, standard errors of calibration (SEC) in the range of 0.04–1.47 and standard errors of prediction (SEP estimated) between 0.09 and 2.81 for both the adulterant and chemical analyses. Chemometric models represent a rapid and attractive option for olive and avocado oil quality screening without sample pretreatments.

Keywords: Adulteration, spectroscopy, chemometric , SIMCA.

RESUMEN
La espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) acoplada al análisis multivariante fue utilizada para detectar y cuantificar las adulteraciones del aceite de oliva y aceite de aguacate con diferentes aceites comestibles (girasol, canola y soya). El método SIMCA (Modelado independiente de analogía de clases), fue desarrollado para discriminar las muestras adulteradas y las no adulteradas. El aceite de oliva, aceite de aguacate y aceites adulterantes (girasol, canola y soya), se caracterizaron en base a su análisis químico (índice de yodo e índice de peróxido). Con el fin de construir el modelo de calibración cuantitativa para cada adulterante, se prepararon mezclas de aceite de oliva y de aceite de

aguacate en una gama de 2-50% (vol/vol). El algoritmo de mínimos cuadrados parciales (PLS), se puso a prueba para modelar cada uno de los sistemas de adulteración (aceite de oliva + adulterante y aceite de aguacate + adulterante) y los resultados del análisis químico de la mezcla. El modelo SIMCA desarrollado mostró un 100% de clasificación correcta para las muestras adulteradas y las no adulteradas. El modelo construido con el algoritmo PLS mostro los valores de R^2 mayores a 0.98, errores estándar de calibración (SEC) en el intervalo de 0.04 a 1.47 y los errores estándar de predicción (SEP estimado) entre 0.09 y 2.81, tanto para los sistemas de adulteración como para los análisis químicos. Los modelos quimiométricos representan una opción rápida y atractiva para la determinación de calidad en los aceites de oliva y aguacate sin necesidad de pretratamientos de la muestra como los análisis convencionales.

Palabras Clave: Adulteración, espectroscopia, quimiometría, SIMCA.

INTRODUCCIÓN

En el mercado nacional e internacional existen diversos tipos de aceites comestibles, donde destacan el aceite de oliva debido a sus propiedades nutricionales y fisicoquímicas consideradas benéficas para la salud, y muy recientemente el aceite de aguacate, que posee un alto punto de humo, característica que permite utilizarlo más de una vez sin que se afecten sus propiedades [4]. Se sabe que las adulteraciones en este tipo de aceites son muy lucrativas y frecuentes, lo cual ha afectado el desarrollo de este mercado en nuestro país, por lo que se requiere de métodos de análisis que permitan detectar estos fraudes a tiempo y de manera práctica [2]. Considerando que los análisis tradicionales son en la mayoría destructivos, costosos y requieren mucho tiempo para ser efectuados, es importante el contar con métodos de análisis más rápidos que los tradicionales. En los últimos años, la espectroscopia infrarroja con reflectancia total atenuada por transformada de Fourier (FTIR-HATR) se ha utilizado con excelentes resultados en análisis de adulteraciones, cuenta con la ventaja de ser versátil y que permite realizar las determinaciones de manera sencilla [1]. Por ello en la presente investigación se desarrollaron dos métodos quimiométricos basados en FTIR-MIR-HATR y análisis multivariante, uno que predice el tipo de adulterante (soya, canola y girasol) y otro para predecir las cantidades de adulterante (2-50%) presentes en el aceite de aguacate y aceite de oliva, así como otras características de calidad (índice de yodo e índice de peróxido). Estos modelos permiten determinar de una forma sencilla, rápida y confiable la calidad de los mismos.

METODOLOGÍA

Se utilizó aceite de oliva extra virgen y aceite puro de aguacate, comercialmente disponibles. Y se emplearon como aceites adulterantes muestras comerciales de aceites comestibles de soya, canola y girasol. La verificación de calidad en aceites se llevó a cabo mediante la determinación de índices de yodo y peróxido de acuerdo a las normas mexicanas NMX-F-152-SCFI-2005 y NMX-F-154-SCFI-2005, respectivamente. La serie de calibración de aceite de oliva, aceite de aguacate y aceite adulterante consistió en 25 muestras con concentraciones del 2-50% con aumentos del 2% en cada una de las series. Las medidas espectrales se realizaron con el espectrofotómetro MID-FTIR modelo 1600, acoplados al accesorio de HATR marca Perkin Elmer. El modelo quimiométrico cuantitativo se realizó mediante el programa multivariante Quant+ utilizando los algoritmos de regresión parcial de mínimos cuadrados (por sus siglas en inglés PLS). El modelo quimiométrico cualitativo SIMCA (soft independent modeling

class analogy) se llevó a cabo con el programa AssureID que permite clasificar materiales semejantes en grupos definidos y discriminar muestras desconocidas.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

La verificación de calidad determinada se realizó con base a la normatividad, mostrando valores permisibles de acuerdo a los parámetros especificados tanto para índice de yodo como para valores de peróxido. En los espectros FTIR-HATR obtenidos de las muestras adulteradas en la región de 4000-550 cm^{-1} se observó un aumento de intensidad en las bandas de esta región conforme aumentaba el porcentaje de aceite adulterante (canola, girasol y soya). Los mejores modelos quimiométricos cuantitativos se obtuvieron con el algoritmo PLS (Tabla 1), presentando valores de R^2 (coeficiente de determinación) muy cercanos a 1, valores de error estándar de predicción (SEP) y error estándar de calibración (SEC) menores a 3, considerando siempre que fueran lo más bajos posible.

Tabla 1. Datos de calibración de los modelos desarrollados para predecir la adulteración del aceite de aguacate y aceite de oliva con el algoritmo PLS.

Sistema de adulteración aceite de aguacate						**Sistema de adulteración aceite de oliva**					
Adulteración	**Propiedad**	**# PC**	**R^2**	**SEC**	**SEP**	**Adulteración**	**Propiedad**	**# PC**	**R^2**	**SEC**	**SEP**
Aguacate-Canola	Adulteración	9	0.9995	0.357	1.050	Oliva-Canola	Adulteración	6	0.9971	0.834	1.244
	Peróxido	9	0.9989	0.043	0.093		Peróxido	6	0.9971	0.217	0.327
	Yodo	9	0.9994	0.066	0.172		Yodo	6	0.9971	0.151	0.224
Aguacate-Girasol	Adulteración	8	0.9921	1.478	2.814	Oliva-Girasol	Adulteración	7	0.9946	1.116	2.188
	Peróxido	8	0.9914	0.122	0.228		Peróxido	7	0.9939	0.144	0.273
	Yodo	8	0.9878	0.050	0.081		Yodo	7	0.9948	0.196	0.389
Aguacate-Soya	Adulteración	7	0.9982	0.678	1.199	Oliva-Soya	Adulteración	10	0.9999	0.161	0.494
	Peróxido	7	0.9979	0.059	0.098		Peróxido	10	0.9999	0.087	0.247
	Yodo	7	0.9962	0.518	0.839		Yodo	10	0.9999	0.030	0.088

Para verificar la exactitud de las predicciones en las muestras desconocidas de los modelos quimiométricos desarrollados se realizó una validación externa (Tabla 2), con muestras distintas a las utilizadas en la calibración, mostrando una gran cercanía entre valores reales y los estimados por el modelo, obteniendo distancias de Mahalanobis menores a 1, errores residuales menores de 3 y R^2 cercanas a 1.

Tabla 2. Datos de validación de los modelos desarrollados para predecir la adulteración del aceite de oliva y aceite de aguacate con el algoritmo PLS

Sistema de adulteración aceite de aguacate						
Adulteración	**Propiedad**	**Concentración Real**	**Concentración Predicha**	**Distancia de Mahalanobis**	**Error Residual**	**R^2**
Aguacate-Canola	Adulteración	29	28.89	0.4976	0.6755	0.9366
	Peróxido	7.7	7.718	0.4976	0.0812	0.9773
	Yodo	94.9	94.81	0.4976	0.1262	0.9961
Aguacate-Girasol	Adulteración	9	9.048	0.4775	2.777	0.9922
	Peróxido	9.3	9.285	0.4775	0.2306	0.9918
	Yodo	90.3	90.34	0.4775	0.0941	0.9878
Aguacate-Soya	Adulteración	45	45.09	0.6392	1.278	0.9963
	Peróxido	6.4	6.415	0.6392	0.1113	0.9993
	Yodo	108.1	108.8	0.6392	0.9768	0.9934
Sistema de adulteración aceite de oliva						
Adulteración	**Propiedad**	**Concentración Real**	**Concentración Predicha**	**Distancia de Mahalanobis**	**Error Residual**	**R^2**
Oliva-Canola	Adulteración	27	27.21	0.7231	0.751	0.9997
	Peróxido	15.1	15.11	0.7231	0.3169	0.9897
	Yodo	87.5	87.6	0.7231	0.4571	0.9751
Oliva-Girasol	Adulteración	15	15.44	0.5461	2.101	0.9998
	Peróxido	17.3	17.23	0.5461	0.3692	0.9853
	Yodo	82.4	82.45	0.5461	0.2727	0.9864
Oliva-Soya	Adulteración	39	39.68	0.7283	0.3266	0.9997
	Peróxido	13	12.86	0.7283	0.06273	0.9996
	Yodo	99.99	100.2	0.7283	0.1768	0.9811

Los modelos cualitativos SIMCA seleccionados (Figura 1) para los tres sistemas de adulteración de aceite de aguacate tuvieron distancias interclase de 7 para canola, 4.1 para girasol y 19.2 para soya. Los modelos SIMCA seleccionados para los tres sistemas de adulteración de aceite de oliva tuvieron distancias interclase de 25.2 para canola, 3.5 para girasol y 19.2 para soya. Dichos valores deben ser mayores a 3 [3]; teniendo para los tres modelos 100% de reconocimiento y rechazo.

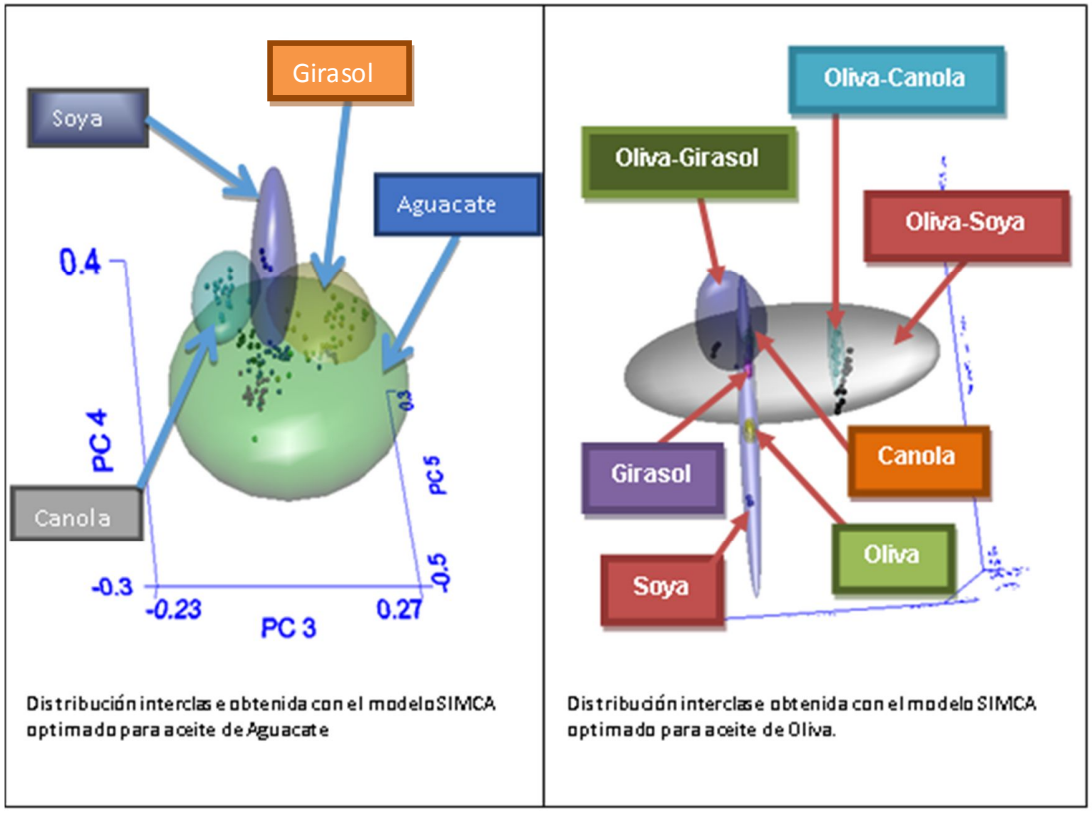


Figura 1. Distribución espacial de las poblaciones obtenidas con el modelo SIMCA optimado.

La validación del modelo SIMCA se llevó a cabo utilizando muestras distintas a las empleadas en la calibración del modelo, teniendo la capacidad de identificar y clasificar un total de 21 muestras incluidas las adulteradas y las no adulteradas.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos demuestran la factibilidad de usar la espectroscopía infrarroja media por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada horizontal acoplada al análisis multivariable como una herramienta útil para la identificación y cuantificación de adulterantes en aceite de oliva y aceite de aguacate.

REFERENCIAS

[1] Gallardo-Velázquez T, Osorio-Revilla G, Zuñiga-de Loa M, Rivera-Espinoza Y. 2009. Application of FTIR-HATR spectroscopy and multivariate analysis to the quantification of adulterants in Mexicans honeys. Food Res Int, 42(3): 313-318.

[2] Jiménez & Morgan-Evans. 2008. El mercado del Aceite de Oliva. Instituto Español de Comercio Exterior (ICEX).

[3] Meza-Márquez, O.G., Gallardo-Velázquez T, Osorio-Revilla G. 2010. Application of MID spectroscopy with multivariate analysis and SIMCA for the detection of adulterants in minced beef. Meat Science. 86, 511-519.

[4] Olaeta J.A. 2003. Industrialización del aguacate: Estado actual y perspectivas Futuras. Proceedings V World Avocado Congress (Actas V Congreso Mundial del Aguacate) 2003. pp. 749-754.

LOW COST MANUFACTURING METHOD OF MICROFLUIDICS SYSTEMS USING ACRYLIC SHEETS AND LASER ENGRAVING, AS BASIS FOR A CELL SEPARATION SYSTEM

(Método de fabricación de sistemas microfluídicos de bajo costo con lámina de acrílico y grabado láser como base de un sistema de separación de células)

Germán Godínez Cardoza[a *+], Celerino Reséndiz Rosas[a]

[a]División de Estudios de Posgrado, Instituto Tecnológico de Pachuca. Carr. México–Pachuca km. 87.5 Venta Prieta, C.P. 42080, Pachuca, Hidalgo, México.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: ger_1509@hotmail.com

Área del Conocimiento: Química Analítica.

ABSTRACT.
Nowadays, due to the globalization phenomenon, there is a growing need for low-cost analysis systems, capable of being easily transported to places where they are required to carry out the determination of detection molecules of interest. Microfluidics is the science and technology of systems that process or manipulate small amounts of fluids, using channels with dimensions from tenths to hundredths of micrometers. The first applications of microfluidic technologies have been in analysis due to their ability to use very small quantities of samples and reagents. The first technics for manufacturing microfluidics systems were very expensive, but recently several low-cost techniques have been developed and published. This paper presents a method for manufacturing microfluidic systems with very inexpensive materials that can be obtained in stationer's and graphic arts shops, together with the employment of freeware tools to perform the design process. A laser machine is used to engrave the microchannels to subsequently evaluate the flow with yeast cells and a dye as tracer. Successful manufacture of microchannels has been achieved for subsequent manufacturing of a more complex system.

Palabras Clave: Microfluidics, laser engraving, microchannels, low cost manufacturing.

STRUCTURAL ELUCIDATION OF POLYMYXIN B-PHOSPHATE COMPLEXES

(Elucidación estructural de complejos polimixina B-fosfato)

Verónica Gisela López-Martínez[a*], Miguel Ángel Claudio-Catalán[a], Felipe Medrano-Valenzuela[a], Carolina Godoy-Alcántar[a+]

[a] Centro de Investigaciones Químicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad 1001, C.P. 62209 Cuernavaca, México

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: cga@uaem.mx

Área del Conocimiento: Química Bioorgánica.

ABSTRACT
Polymyxin B sulfate (PMB) is a natural antibiotic comprising a N-terminal chain of fatty acid and amino acids, which chain are leucine, phenylalanine, threonine and, α,γ-diaminobutyric acid. This antibiotic is effective towards gram-negatives bacterias, since it is fixed to the layer of phospholipids found in cell wall of these kind of microorganisms, thus increasing the permeability of the bacterial membranes, and resulting in cell death. The aim of this work is to explore the ability of PMB to work as host molecule for phosphates in water at neutral pH, simulating biological processes and carry out the structural elucidation of PMB-phosphate complexes. Spectroscopic techniques such as UV/VIS, potentiometry, MASS, NMR and circular dichroism were used to obtain quantitative and qualitative information on the interactions of the antibiotic with inorganic and biological phosphates. At pH 7 PMB is in tetracationic form, allowing hydrogen bonding interactions between the macromolecule and phosphate anions. The binding constants obtained by UV/VIS were 2,811 M^{-1} and 10,127 M^{-1} for diphenyl phosphate and monobasic phosphate, respectively. While by potentiometry the association constants with ATP (10^6 M^{-1}), ADP (10^2 M^{-1}) and tetrabasic pyrophosphate (10^2 M^{-1}) were determinate. Through mass spectrometry using ESI it was possible to obtain information on the stability of PMB-phosphate complexes. Circular dichroism experiments show that PMB forms the complex with phosphates with slight conformation changes. Finally, the total assignation of ^{1}H and ^{13}C of the PMB is performed by NMR experiments, through DEPT, COSY, HSQC and HMBC experiments and the binding sites between the antibiotic and phosphates were determinate through ^{1}H and ^{31}P NMR experiments.

Keywords: PMB, gram-negatives bacterias, anions phosphates, recognition molecular, association constants, spectroscopy techniques.

RESUMEN
Polimixina B sulfato (PMB) es un antibiótico natural que comprende una cadena N-terminal de ácido graso y aminoácidos, cuales cadenas son leucina, fenilalanina, treonina y α,γ–ácido diaminobutírico. Este antibiótico es efectivo hacia las bacterias gram-negativas, ya que ésta se fija a la capa de fosfolípidos que se encuentra en la pared celular de esta clase de microorganismos, entonces incrementa la permeabilidad de las membranas bacterianas, resultando en muerte celular. El objetivo de este trabajo es explorar la habilidad de PMB para trabajar como molécula anfitrión para fosfatos en

agua a pH neutro, simulando procesos biológicos y llevar a cabo la elucidación estructural de los complejos PMB-fosfato. Técnicas espectroscópicas tal como UV/VIS, potenciometría, masas, RMN y dicroísmo circular fueron usadas para obtener información cualitativa y cuantitativa sobre las interacciones del antibiótico con fosfatos inorgánicos y biológicos. A pH 7 PMB está en su forma tetracatiónica, permitiendo interacciones por puente de hidrógeno entre la macromolécula y los aniones fosfato. Las constantes de enlace obtenidas por UV/VIS fueron 2,811 M^{-1} y 10,127 M^{-1} para difenil fosfatos y fosfato monobásico, respectivamente. Mientras por potenciometría las constantes de asociación con ATP (10^6 M^{-1}), ADP (10^2 M^{-1}) y pirofosfato tetrabásico (10^2 M^{-1}) fueron determinadas. A través de espectroscopia de masas usando ESI fue posible obtener información sobre la estabilidad de los complejos PMB-fosfato. Experimentos de dicroísmo circular muestran que PMB forma los complejos con fosfatos con pequeños cambios conformacionales. Finalmente, la total asignación de ^{1}H y ^{13}C de PMB es realizados por experimentos de RMN, a través de experimentos DEPT, COSY, HSQC y HMBC y los sitios de enlace entre el antibiótico y fosfatos fueron determinados a través de experimentos de RMN ^{1}H y ^{31}P.

Palabras Clave: PMB, bacterias gram-negativas, aniones fosfato, reconocimiento molecular, constantes de asociación, técnicas espectroscópicas.

INTRODUCCIÓN

Las polimixinas son moléculas tipo éteres lariat que se fijan en la capa de fosfolípidos que se encuentran en las bacterias gram-negativas aumentando la permeabilidad de las membranas bacterianas, lo que se traduce en la muerte celular. En este trabajo se empleó la polimixina B "PMB", la cual es una mezcla de PMB 2 (**Figura 1 a**) y PMB 1 (**Figura 1 b**) que se encuentran en porcentajes del 30 Y 70%, respectivamente. PMB es de origen natural y es producida por el crecimiento de *bacillus polymyxa* [1].

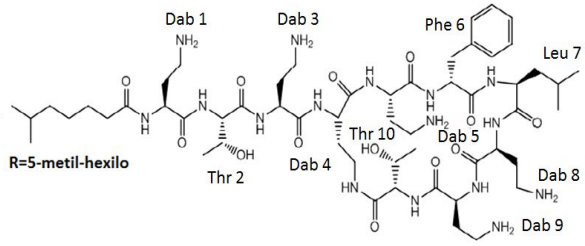


Figura 1 a Estructura molecular de la Polimixina B2.

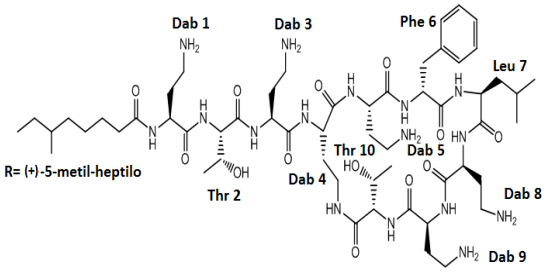


Figura 1 b Estructura molecular de la Polimixina B1.

Figura 1 Molécula anfitrión PMB: 30 % PMB 2 (**Figura 1 a**) y 70 % PMB 1 (**Figura 1 b**). Donde **Dab**= 2-4-ácido diaminobutírico, **Thr**= Treonina, **Leu**= Leucina y **Phe**=Fenilalanina. PMB se representa con la estructura de PMB 1, debido a que se encuentra en mayor proporción. La única diferencia entre PMB 1 y PMB 2 es un CH_3 en la cadena N-terminal de ácido graso.

MÉTODOS

Todos los compuestos utilizados en el desarrollo de este trabajo se compraron a reactivos *Aldrich* y fueron utilizados sin purificación previa. En PMB (macromolécula) están presentes 2.5 moles de sulfato y tiene un peso molecular de 1450 g/mol. Los huéspedes fosfatos utilizados son: fosfato monobásico de

sodio (**FMS**) 100%, pirofosfato tetrabásico de sodio (**PTS**) 95%, trifosfato pentabásico de sodio (**TPS**) 99%, fenil fosfato de sodio (**FF**) 98%, difenil fosfato de sodio (**DFF**) 99%, Monofosfato de adenosina (**AMP**) 97 %, difosfato de adenosina (**ADP**) 95% y trifosfato de adenosina (**ATP**) 99%.

Los experimentos de espectroscopía UV/Vis, Dicroismo circular (DC) y espectroscopía de masas se realizaron a pH7 utilizando una solución amortiguadora de trizma [2-amino-2(hidroximetilo)-1,3-propanodiol] 0.032 M y NaCl 0.1 M para fijar la fuerza iónica. Para potenciometría se empleó agua con NaCl 0.1 M, y para Resonancia Magnética Nuclear (RMN) A 400 MHz se utilizó una mezcla D_2O:H_2O, 60:40 respectivamente a pH 4 y para 700 MHz se utilizó H_2O a pH 4 con un tubo de referencia interno de D_2O. En todos los experimentos se utilizó H_2O desionizada.

Los equipos empleados fueron: Espectrofotometro Agilent 8453, titulador automático marca Scott TITRONIC Basic, espectrómetro de dicroismo circular JASSCO 1500 CD SPECTROMETER, espectrómetro de masas ORBITRAP LTQ XL de ThermoFisher scientific, espectrómetros de RMN Mercury Plus 400 MHz y 700 MHz y potenciómetros modelo Orion 420 A y 920Aplus.

Titulaciones espectrofotométricas UV/VIS: En cada experimento se emplearon 2 celdas de cuarzo de 3 ml y 1 cm de paso óptico. En una de ellas se vertían 2500 μl de la disolución de PMB ($1x10^{-3}$M) y en la otra 2500 μl de solución amortiguadora (blanco). Se obtenían el espectro del blanco que actúa como línea base y el espectro inicial de PMB. A continuación a ambas celdas se les realizaba adiciones en cantidades de microlitros de los fosfatos con concentración de 0.1 M; ejemplo: 5 de 1 μl , 7 de 2 μl y 5 de 5 μl . Posteriormente se graficaban las abosorbancias observadas corregidas por dilución y absorción del blanco *vs* la concentración del fosfato para obtener isotermas de enlace que permitieran calcular constantes de asociación. Los datos así obtenidos se ajustaron a través de la **ecuación 1** [2]: $A_{obs} = A_0 + A_\infty * K * X / 1 + K * X$ que corresponde a la formación del complejo de estequiometria 1:1 con exceso de concentración del huésped. Donde: A_{obs} es la absorbancia observada, A_0 es la absorbancia inicial del compuesto, A_∞ es la absorbancia de saturación del compuesto, *K* es la constante de asociación, *X* es la concentración molar del huésped.

Titulaciones Potenciométricas: Se realizaron titulaciones agregando adiciones de ácido valorado (HCl 0.03 M) y base valorada (NaOH o KOH 0.1 M) a PMB, los fosfatos o a la mezcla de PMB-Fosfato. Se prepararó un volumen de 5 ml para PMB, 9 ml para la mezcla y 10 ó 20 ml para el fosfato con una concentración de 2 mM. Inyectando N_2 durante el proceso de titulación y con ayuda del ácido valorado se ajustaba el pH a 2.5, después se iban agregando adiciones de 1 μl de la base valorada anotando en cada adición el cambio de pH hasta llegar a un pH de 9.8 . Se exportaron los datos obtenidos durante la titulación potenciometrica al programa Hyperquad 2006, en el cual a través de ajustes se obtenian los p*K*a´s tanto de los huéspedes fosfato como de la PMB y las constantes de asociación (*K*) de los complejos PMB-fosfato.

Espectros de dicroismo circular: Se registraron los espectros de soluciones de PMB, del fosfato y de la mezcla PMB-fosfato a una concentración de $2.5x10^{-5}$ M.

Espectrometría de Masas: Se registraron los espectros de masas por la técnica ESI de PMB y sus mezclas con fosfatos, realizadas de la siguiente manera: se preparó 2.9 ml de PMB con concentración $1x10^{-3}$ M,

de ésta solución se tomaron 500 μl y se mezclaron con 500 μl de FMS (1x10^{-3} M) y de igual forma para DFF, PTS, ADP y ATP, y por último se analizó los 400 μl restantes de la disolución de la PMB.

Espectros de RMN: Se registraron los espectros de ^{13}C, ^{1}H, COSY, HSQC de una solución de PMB 10 mM y los espectros de DEPT 135 y HMBC de PMB 20 mM a 400 MHz. También se obtuvieron los espectros de ^{31}P y ^{1}H para las mezclas PMB-fosfato con una relación estequiométrica 1:1 y una concentración 20 mM, empleando los fosfatos DFF, FMS, ATP, ADP y PTS a 400 MHz. Adicionalmente fueron registrados a 700 MHz los espectros de ^{1}H, ^{13}C, DEPT, TOCSY, NOESY, HSQC, HMBC y ^{15}N-HSQC para PMB 20 mM.

RESULTADOS

A través de titulaciones potenciométricas y empleando el programa *Hyperquad 2006* se determinaron los 5 pK_a's de la PMB (LH_1=9.81±0.06, LH_2=9.69±0.03, LH_3=8.94±0.05, LH_4=8.23±0.05 y LH_5=2.94±0.05; donde L=PMB y H=protón) y los pK_a's de los huéspedes (ATP: AH=6.49±0.01 y AH_2=3.94±0.01, ADP: AH=6.39±0.07 y AH_2=3.91±0.09, AMP: AH=6.21±0.005 y AH_2=3.73±0.006, PTS: AH=8.48±0.008 y 5.99±0.01, FF: AH=5.84±0.006, FMS: AH=6.82±0.026, TPS: AH=8.13±0.008 y AH_2=5.71±0.01, para DFF no fue posible la determinación de pK_a's; donde A=fosfato y H=protón). También se calcularon las constantes de asociación de los complejos formados entre PMB y los fosfatos de ATP, ADP y PTS (PMB-ATP: LH_2A= 42,568±0.06, LH_3A=61969±0.08, LH_4A=928,662±0.05, LH_4AH=949,829±0.09 y LH_4AH_2=478,630±0.1, PMB-ADP: LH_4A=968±0.07, PMB-PTS: LH_3AH=7,636±0.08; donde L=PMB, A=fosfato y H=protón). A través del programa *Hyss 2009* fueron construidos los diagramas de abundancia de especies en función del pH de éstos; ejemplo **Figura 2 a**. Debido a que se detectaron complejos con diferentes grados de protonación, para los valores de los tres complejos obtenidos a través de esta metodología se determinaron constantes efectivas en función del pH (**Figura 2 b**) el ajuste se realizó a través de la **ecuación 2** [3]: $K_{eff}=\sum[H_{i+j}AL]/(\sum[H_iA]*\sum[H_jL])$; donde $\sum[H_{i+j}AL]$=complejo formado, $\sum[H_iA]$=huésped libre y $\sum[H_jL]$=anfitrión libre**,** encontrándose que el complejo PMB-ATP (10^6 M^{-1}) es más estable que los de PMB-ADP (10^2 M^{-1}) y PMB-PTS (10^2 M^{-1}) por cuatro órdenes de magnitud. De estos tres complejos se realizaron simulaciones por mecánica molecular, con un campo de fuerza OPLS a través del programa *Macromodel*. Las estructuras de los complejos sugieren que las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas son las responsables de su formación.

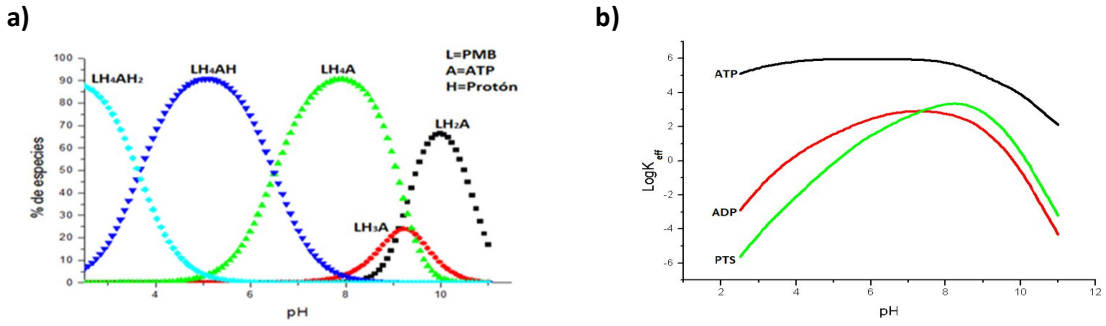
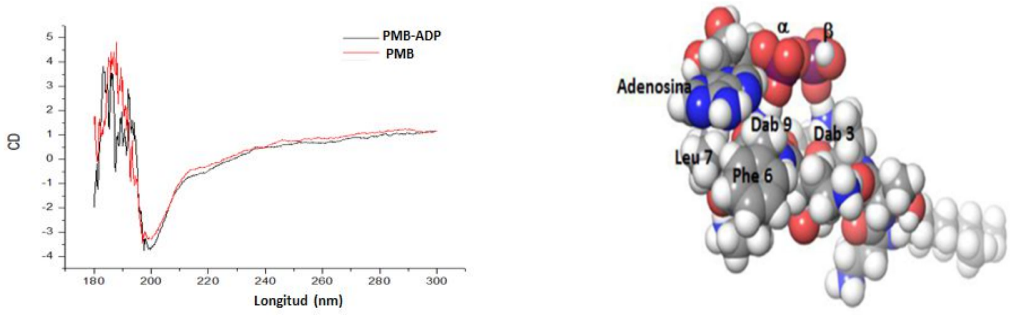


Figura 2 a) Diagramas de especies para la mezcla PMB-ATP y **b)** Gráfica de las constantes efectivas.

Por espectroscopía UV/Vis fue calculado el coeficiente de absortividad molar de la PMB λ=258 nm: 277 ± 13.54 cm^{-1} M^{1}, así como constantes de asociación para dos complejos: PMB-DFF (2,811 M^{-1}±495) y PMB-FMS (10,127 M^{-1}±1,047).

Cada aminoácido que constituye a PMB así como la cadena de ácido graso N-terminal presenta un centro quiral, lo cual nos da un total de 11 centros quirales en la estructura, debido a esto PMB podría adoptar distintas conformaciones al interactuar con aniones específicos como lo son los fosfatos. Para conocer más sobre la forma en que el receptor PMB y los fosfatos interactúan se utilizó la técnica del dicroísmo circular. Los espectros de PMB libre y de PMB-ADP se muestra en la **Figura 3 a.** Los fosfatos carecen de centros quirales y en consecuencia de espectro DC; sin embargo su presencia si altera el espectro de PMB.



a) **b)**

Figura 3 a Espectro de DC de PMB libre comparado con el espectro de DC de PMB con ADP. **3 b** Modelado molecular del complejo PMB-ADP.

Un ejemplo de estas mediciones es la comparación de los espectros de DC de PMB libre y PMB-ADP (**Figura 3 a**) se puede observar que la señal de éste último es más intensa debido a la probable formación del complejo. En la **Figura 3 b** se muestra el modelo molecular de PMB-ADP.

Utilizando la técnica de ESI se obtuvieron los siguientes iones moleculares, así como el porcentaje de formación de cada uno de ellos. En virtud de la composición de la PMB utilizada se presentan los datos para ambas polimixinas B: para la molécula anfitrión PMB 1= 1203.77 (22%) y PMB 2= 1189.76 (28%), y para los complejos PMB 1-ATP= 1711.94 (48%) y PMB 2-ATP 1697.05(45%), PMB 1-ADP 1629.49 (55%) y PMB 2-ADP 1616.23(54%), PMB 1-DFF 1453.41(80%) y PMB 2-DFF 1439.10 (80%), PMB 1-PTS 1469.16 (100%) y PMB 2-PTS 1455.57(85%), PMB 1-FMS 1341.17(80%) Y PMB 2-FMS 1327.44 (70%).

La asignación total de los espectros de ^{1}H y ^{13}C de PMB, así como la determinación de las zonas de interacción en el espectro de ^{1}H y ^{31}P de PMB al agregar los fosfatos de PTS, FMS, DFF, ATP y ADP se encuentran en proceso; sin embargo algunas señales ya han sido identificadas en ^{1}H (**Figura 4**) y ^{13}C, debido a la información obtenida de COSY ^{1}H-^{1}H, HSQC ^{1}H-^{13}C y, DEPT 135 y 90.

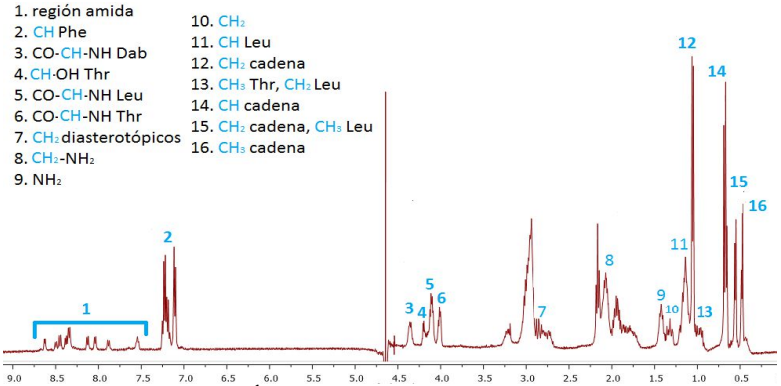


Figura 4 Espectro de ^{1}H de PMB a 400 MHz, 60:40, D_2O:H_20 a pH 4.

DISCUSIÓN

Inicialmente tanto para PMB como para los huéspedes fosfato fueron determinados sus pK_a's en agua y construidos sus diagramas de especies para conocer su abundancia en función del pH. Por titulaciones potenciométricas se determinaron las contantes de asociación; detectándose complejos con diferentes grados de protonación para PMB-ATP, PMB-ADP y PMB-PTS, por lo que posteriormente se calcularon las constantes efectivas para dichos complejos en función del pH, encontrándose que el complejo PMB-ATP es más estable que los complejos PMB-ADP y PMB-PTS por cuatro órdenes de magnitud a pH 7 del orden 10^6 M^{-1} para ATP y del orden 10^2 M^{-1} para ADP y PTS. Para los complejos PMB-DFF, PMB-FF, PMB-AMP, PMB-FMS y PMB-TPS no fue posible calcular *K,* debido a que probablemente la interacción es muy débil.

Fijando el pH 7, pH al cual las moléculas huésped se encontraban cargadas negativamente y PMB está en su forma tetracatiónica, favoreciendo las interacciones electrostáticas o por puente de hidrógeno se estudió la formación de los complejos PMB-fosfato por espectroscopía UV/Vis. Sin embargo, sólo fue posible obtener dos *K* promedio una para el complejo PMB-DFF y otra para PMB-FMS siendo ésta última 3.5 veces mayor. Estos hallazgos podrían explicarse considerando que el cromóforo que absorbe no sea suficientemente sensible para monitorear la interacción con los restantes aniones seleccionados.

Aunque no hay evidencia de que exista un sólo sitio al cual los fosfatos puedan unirse a PMB, con el modelado molecular se puede sugerir que PMB puede tener ligeros cambios conformacionales para interactuar con fosfatos. En la **Figura 3 b** se muestra el modelo molecular de PMB-ADP, el cual brinda información de que Dab 9 y Dab 3 son los fragmentos de la PMB que interactúan con ADP a través de interacciones por puente de hidrógeno, además existen interacciones hidrofóbicas, ya que el fragmento de adenosina de ADP queda enfrente de los residuos de Phe y Leu que pertenecen a PMB. Lo que permite sugerir que por esta razón los fosfatos con el fragmento de adenosina (ATP, ADP y AMP) al formar el complejo con PMB muestran un espectro de DC más intenso que aquellos fosfatos que carecen de éste (TPS, PTS y FMS), ya que existen interacciones por puente de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. Para DFF se muestra una señal más intensa en el espectro de DC que para FF, esto puede deberse a que a diferencia de FF, el DFF cuenta con un grupo fenilo adicional, lo cual podría permitir diferentes interacciones intermoleculares a las mencionadas.

Si comparamos los valores de los iones moleculares *m/z* esperados *vs* los obtenidos por espectrometría de masas ESI, tenemos para la macromolécula: PMB 1=1203.49 *vs* 1203.77 y PMB 2=1189.47 *vs* 1189.76, por lo tanto los iones moleculares para las mezclas son PMB 1-ATP= 1710.67 *vs* 1711.94, PMB 1-ADP=1630.69 *vs* 1629.49, PMB 1-PTS=1469.39 *vs* 1469.16, PMB 1-DFF=1453.68 *vs* 1453.41 , PMB 1-FMS=1341.48 *vs* 1341.17, PMB 2-ATP= 1696.65 *vs* 1697.05 , PMB 2-ADP=1616.67 *vs* 1616.23, PMB 2-PTS=1455.37 *vs* 1455.57, PMB 2-DFF=1439.66 *vs* 1439.10, PMB 2-FMS=1327.46 *vs* 1327.44, como se puede observar la diferencia es pequeña entre los valores esperados y los obtenidos a través de ESI, lo que evidencia que efectivamente se tiene la formación de los complejos PMB-fosfato. El porcentaje de formación revela la estabilidad de dichos complejos de la siguiente manera: PMB 1-PTS (100%)>PMB 2-PTS (85%)>[PMB 1-FMS (80%), PMB 1-DFF (80%) y PMB 2-DFF (80%)> PMB 2-FMS (70%)>PMB 1-ADP (55%)>PMB 2-ADP (54%)>PMB 1-ATP (48%)> PMB 2-ATP (45%).

En el análisis de los espectros de RMN utilizando la técnica de DEPT se logra evidenciar la mezcla de PMB 1 y PMB 2 en PMB, ya que a pesar de que hay 19 señales que corresponden a los CH, se puede observar

que tres de éstas se encuentran a campo alto cuando sólo se esperaría 2 en esta región, que deberían corresponder al CH que está unido a los 2 CH_3 en el fragmento de Leu y el CH en la cadena N-terminal [PMB consta de 6 CH_3, 19 CH_2, 19 CH, 1 C y 11 CO]. En la **Figura 4** se puede observar la asignación de algunas señales para la macromolécula PMB obtenidas a través de COSY y HSQC. En los experimentos de ^{31}P se observaron mayores cambios para ATP y ADP en la mezcla con PMB a comparación de las mezclas con FMS, PTS y DFF.

CONCLUSIÓN

PMB, un ciclopéptido de origen natural fue estudiada como anfitrión de huéspedes fosfato de diversa estructura por técnicas espectroscópicas como UV/VIS, potenciometría, dicroísmo circular, masas y RMN. En las primeras 4 metodologías se utilizó agua desionizada como disolvente para simular los procesos biológicos y en RMN se utilizó un sistema 60:40, D_2O:H_2O respectivamente o H_2O con un tubo de referencia interno de D_2O. Por las 5 metodologías fue posible obtener información cuantitativa y cualitativa para evidenciar que PMB forma complejos con los fosfatos de ATP, ADP, PTS, DFF y FMS, a través de interacciones por puente de hidrógeno e hidrofóbicas.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se desarrolló con los recursos proporcionados a través del proyecto ***CONACyT: CB-2011/ 168952*** y la beca ***No. 336931***.

REFERENCIAS

[1] Hoover, J. (1975). Pharceutical Sciences Marck, 50, Easton Pensylvania, 1136-1137.

[2] Schneider, H.-J., Yatsimirsky, A. (2000), Principles and Methods in Supramolecular Chemistry, John Wiley & Sons: England.

[3] Aguilar, J. A.; Celda, B.;Fusi, V.; García-España, E.; Luis, S. V.; Martínez, M. C.; Ramírez J. A.; Soriano, C.; Tejero, R. (2014), Structural characterization in solution of multifuntional nucleotide coordination systems, J. Chem. Soc. Perkins Trans. 2, 1323-1328.

EVALUATION IN HUMANS TOTAL ANTIOXIDANT CAPACITY BY CONSUMING A DRINK OF RICE BRAN

(Evaluación en humanos de la capacidad antioxidante total por el consumo de una bebida de salvado de arroz)

Guillermina González Rosendo[a], Javier Villanueva Sánchez[a*+] Iker Rodríguez García[a], Guadalupe Bravo Rivera[a], Gybran Eduardo Reyes Navarrete[a], Adrián Guillermo Quintero Gutiérrez[a]

[a] Instituto Politécnico Nacional. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Departamento de Nutrición y Alimentos Funcionales.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: jvillanuevas@gmail.com

Área del conocimiento: Química Clínica.

ABSTRACT
The rice bran is a byproduct little used for human consumption, although it is very nutritious and contains antioxidants such as γ-oryzanol, vitamin E and phenolic compounds. It is unknown whether the amount of these antioxidants in the food is reflected as total antioxidant capacity (TAC) in human when the food is consumed. The objective was to evaluate in human plasma the total antioxidant capacity of an instant drink made from rice bran by photochemiluminescence. Acceptance criteria for volunteers were: age between 20 and 40 years old, BMI between 23 and 24.9 kg/m^2 and clinically unaffected by dietary and medical history. Two days before the evaluation were provided with a list of foods that they should not eat. At once measurements were made in blood samples with Photochem (Analytik-Jena, Germany) equipment, at time zero (after an overnight fast of 10 hours). Immediately a dose of 35.5 g of the diluted formulation rice bran in 240 ml of water was ingested, and a second blood collection was performed at 2 hours. After 4 hours a second dose of the drink was ingested and a third blood collection was performed. Finally, fourth blood sampling at 6 hours was performed. Averages and standard deviation units Trolox equivalent (TE / g) were used in ANOVA simple for trend assessment and post - hoc Tukey test to establish differences in measurements. TAC in vivo remained constant (no significant differences were observed) during the complete assay (51.78-48.09 μg/ml). Of components, in the lipid fraction, there was a trend on the rise. The results in μg/ml at 0, 2, 4 and 6 hours were 37.4 ± 1.54, 37.0 ± 1.5, 37.5 ± 1.6 and 39.7 ± 3.2 respectively (the differences were significant); while the hydrophilic fraction in μmol TE/ml reported constant values.

Keywords: Rice bran, total antioxidant capacity, photochemiluminescence, evaluation in humans.

RESUMEN
El salvado de arroz es un subproducto poco aprovechado para el consumo humano, a pesar de que es muy nutritivo y contiene antioxidantes como γ-oryzanol, vitamina E y compuestos fenólicos. Se desconoce si la cantidad de estos antioxidantes medida en el alimento se ve reflejada como capacidad antioxidante total (CAT) en el ser humano al consumirlo. El objetivo fue evaluar en plasma humano por fotoquimioluminiscencia, la capacidad antioxidante total de una bebida instantánea a base de salvado de arroz (SA). Los criterios de aceptación para los voluntarios fueron entre otros: edad entre 20 y 40

años, índice de masa corporal entre 23 y 24.9 kg/m2 y clínicamente sanos por historia dietética y clínica. Dos días previos a la evaluación se les proporcionó una lista de alimentos que no debían consumir. Las mediciones se realizaron con el equipo Photochem (Jena, Alemania), al tiempo cero (después de un ayuno nocturno de 10 horas). Inmediatamente se ingirió una dosis de 35.5 g de la formulación de salvado de arroz diluida en 240 ml de agua, a las 2 horas se realizó una segunda extracción de sangre. A las 4 horas se ingirió una segunda dosis de la bebida y se realizó una tercera extracción de sangre. A las 6 horas se realizó una cuarta extracción de sangre. Se emplearon promedios y desviación estándar de las unidades de equivalentes de trolox (TE/g); ANOVA simple para evaluación de tendencia y pruebas pos-hoc de Tukey para establecer diferencias en las mediciones. La CAT in vivo se mantuvo constante (no se observaron diferencias significativas) durante el ensayo completo (51.78 - 48.09 µg/ml). La CAT in vivo de menor valor se presentó a las 4 horas (47.41 µg/ml). En la fracción lipídica, se observó una tendencia en ascenso. Los resultados en µg/ml a las 0, 2, 4 y 6 h fueron de 37.4±1.54, 37.0±1.5, 37.5±1.6 y 39.7±3.2 respectivamente (las diferencias fueron significativas); mientras que la fracción hidrofílica en µmol TE/ml reportó valores constantes.

Palabras Clave: Salvado de arroz, capacidad antioxidante total, fotoquimioluminiscencia, evaluación en humanos.

INTRODUCCIÓN

El salvado de arroz es un subproducto poco aprovechado para el consumo humano, es de bajo costo y obtenido en grandes volúmenes a nivel mundial; contiene antioxidantes como gama-oryzanol, vitamina E y compuestos fenólicos, que han sido estudiados por su potencial antioxidante [1]. Sin embargo, estos compuestos no son el grupo de antioxidantes mayormente biodisponibles *in vivo*. Hay una gran controversia respecto a si la cantidad de este tipo de antioxidantes medida *in vitro*, se ve reflejada en plasma u otros tejidos. Por lo que en este trabajo se midió la capacidad antioxidante total (CAT) en humanos para elucidar si los alimentos a base de salvado de arroz tienen un efecto en humanos y con ello validar los métodos empleados al medir antioxidantes *in vitro*, lo que será de utilidad para el desarrollo de nuevos productos benéficos para la salud humana [2].

METODOLOGÍA

La evaluación de la CAT en humanos se llevó a cabo en 3 etapas: La primera etapa consistió en seleccionar sujetos sanos en base a diversos criterios de inclusión [3]. Se determinó un intervalo de índice de masa corporal (IMC) entre 23 a 24. 9 kg/m^2; se aplicó una historia clínico-dietética y una encuesta alimentaria con la técnica de recordatorio de 24 horas. En muestras de sangre, obtenidas de los sujetos en ayuno, se determinaron parámetros de laboratorio clínico: biometría hemática y química clínica (glucosa, triglicéridos, lipoproteínas de alta densidad y colesterol total). A partir de estos resultados, los sujetos que alcanzaron los criterios de inclusión, firmaron una carta de consentimiento informado, previamente el protocolo fue aprobado por el Colegio de Profesores del CeProBi y se cumple con la Declaración de Helsinki. En la segunda etapa, dos días previos al consumo de la bebida, se proporcionó a los participantes una lista de alimentos ricos en antioxidantes que debían evitar, esto con el fin de estandarizar el consumo de antioxidantes. Aun así, el consumo fue controlado con la aplicación de otra encuesta de recordatorio de 24 h; finalmente en la tercera etapa, se realizó una primera extracción de sangre a los voluntarios (con ayuno mínimo de 10 horas); los valores obtenidos fueron utilizados como línea basal. Inmediatamente ingirieron una dosis de 35.5 g de la formulación en polvo de bebida de salvado de arroz diluida en 240 ml de agua para romper el ayuno, a las 2 horas de la

ingesta se realizó una segunda extracción de sangre. A las 4 horas se ingirió una segunda dosis y se realizó una tercera extracción de sangre. Finalmente a las 6 horas, se realizó una cuarta extracción de sangre. Las muestras se tomaron por medio de sistema Vacutainer en tubo con anticoagulante (EDTA-K3) para extracción de plasma [4]. La muestra de plasma fue diluida 1:5 para análisis de CAT *in vivo* por el método de fotoquimioluminiscencia [5]. Para el análisis estadístico se presentan promedios y desviación estándar de la unidades de equivalentes de los antioxidantes en muestras analizadas por duplicado.

RESULTADOS

Se determinó el efecto de la bebida en humanos, evaluando su CAT *in vivo* y obteniendo los siguientes resultados: Se reclutaron 75 candidatos, de los cuales sólo 15 cumplieron con el IMC adecuado y finalmente se seleccionaron 5 voluntarios que cumplieron con los criterios para el estudio (dos hombres y tres mujeres). Mediante la técnica de recordatorio de 24 horas, se confirmó que los sujetos cumplieron con la solicitud de no consumir alimentos ricos en antioxidantes. En la figura 1, se muestran las curvas de la evaluación de la capacidad antioxidante soluble en agua (ACW). Se observa una tendencia similar, los valores fueron disminuyendo con el tiempo. Los resultados promedio de la ACW en µg/ml durante los tiempos 0 h, 2 h, 4 h y 6 h fueron de 14.39 ±3.4, 13.70 ±3.37, 9.95 ±3.97 y 8.38 ±2.63, respectivamente; mientras que la ACW en µmol EAA/ml reportó valores de 0.08 ±0.01, 0.07 ±0.01, 0.06 ±0.02 y 0.05 ±0.01, respectivamente.

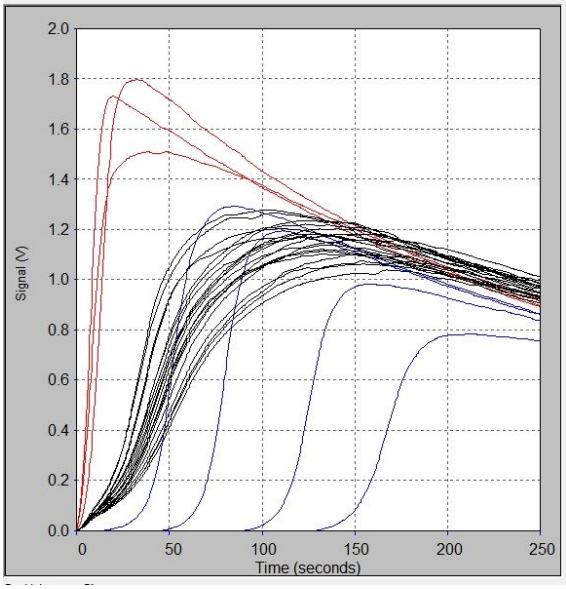


Figura 1. Curvas de emisión de luminiscencia de la ACW-PCL en muestras de Sangre de sujetos sanos post-consumo de la bebida con SA (líneas negras). Las líneas en rojo representan los blancos, las líneas en azul corresponden a las muestras de calibración.

En la figura 2 se muestran las curvas de la evaluación de la capacidad antioxidante soluble en lípidos (ACL). En la ACL se observaron pequeños cambios de las primeras tres mediciones. Sin embargo, se puede apreciar que los resultados de ACL aumentan ligeramente a partir de la ingesta de la bebida y claramente se aprecia un aumento en la última medición. Los resultados promedio de la ACL en µg/ml durante los tiempos 0 h, 2 h, 4 h y 6 h fueron de 37.39±1.54, 37.02 ±1.51, 37.45 ±1.55 y 39.70 ±3.22,

respectivamente; mientras que la ACL en µmol TE/ml reportó valores de 0.15 ±0.00, 0.15 ±0.00, 0.15 ±0.00 y 0.16 ±0.00, respectivamente.

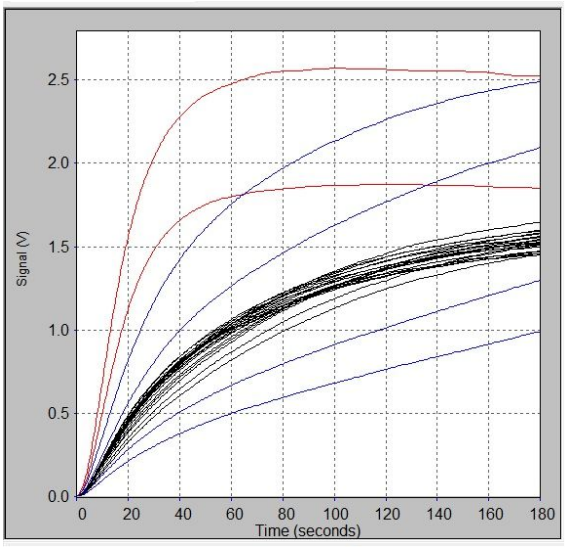


Figura 2. Curvas de emisión de luminiscencia de la ACL-PCL en muestras de Sangre de sujetos sanos post-consumo de la bebida con SA (líneas negras). Las líneas en rojo representan los blancos, las líneas en azul corresponden a las muestras de calibración.

La CAT *in vivo* se muestra en la Tabla 1, donde se expresa como la suma de ACW y ACL en microgramos de antioxidantes por mililitro de plasma (µg/ml). La CAT *in vivo* se mantuvo prácticamente constante durante el estudio en un intervalo de 51.78 - 48.09 µg/ml desde la primer toma de muestra o control, hasta las seis horas del estudio. La CAT *in vivo* de menor valor se observó a las 4 horas del estudio con un valor de 47.41 µg/ml.

Tabla 1. Capacidad antioxidante total in vivo de la bebida de salvado de arroz

VOLUNTARIO	CAT $_{0h}$ (µg/ml)	CAT $_{2h}$ (µg/ml)	CAT $_{4h}$ (µg/ml)	CAT $_{6h}$ (µg/ml)
1	44.45	43.48	40.65	42.96
2	51.58	55.57	53.49	42.95
3	56.03	53.28	46.92	49.20
4	53.02	52.00	45.14	54.07
5	53.84	49.31	50.83	51.25
Media (± DT)	**51.78 ± 4.40**	**50.73 ± 4.64**	**47.41 ± 4.99**	**48.09 ± 4.99**

DISCUSIÓN

Se observó una disminución de la actividad antioxidante hidrofílica respecto al tiempo, lo cual podría indicar un proceso de estrés oxidativo en plasma, que podría estar relacionado directamente con la alimentación. Lutz *et al.,* [6] han reportado que la mayor biodisponibilidad de antioxidantes hidrofílicos se alcanza a la hora y media después de la ingesta; no obstante, dichas concentraciones dependen de la estructura química, la cantidad ingerida y la matriz alimentaria. Prior *et al.,* [7] estudiaron la CAT en plasma humano después de la ingesta de antioxidantes de moras azules en los tiempos 1, 2, y 4 horas, observando que la ACW disminuye respecto al tiempo y la ACL tiene un comportamiento inverso. En los

resultados obtenidos, existe una secuencia lógica de la disminución de ACW, misma que no se observa en la ACL, donde se presenta un incremento visible en la última toma de muestra. Prior *et al.*, [8] han reportado que la CAT en plasma es un ensayo útil; sin embargo, mencionan que para tener un análisis completo del estatus antioxidante medido en humanos, es necesario tener un panorama completo de la evaluación del estrés oxidativo. El fabricante del equipo (Analitik Jena) [5] ha reportado valores de ACW de plasma humano de 0.119 µmol EAA/ml, hasta 0.425 µmol EAA/ml mediante el método PCL. En base a los resultados obtenidos de ACW que van de 0.087 µmol EAA/ml, hasta 0.0476 µmol EAA/ml, se puede observar claramente que existe un decremento del 58% de la ACW a las 6 h de estudio, además de que la ACW basal es 31 % menor al valor mínimo reportado, lo cual podría ser un indicio de estrés oxidativo probablemente ocasionado por la estandarización de los sujetos en cuanto al consumo de antioxidantes. *Lai et al.,* [4] realizaron un estudio del efecto causado por la contaminación ambiental sobre la CAT de sujetos fumadores y no fumadores; en este estudio se observó que el grupo expuesto a los agentes químicos de la contaminación ambiental, tuvo una CAT menor comparada con el grupo de referencia. La CAT del grupo de estudio expuesto a contaminantes para fumadores y no fumadores, fue de 44.1 µg/ml y 45.5 µg/ml respectivamente, ligeramente cercana a la CAT determinada en el estudio; la cual se reportó entre 51.78-47.41 µg/ml.

CONCLUSIONES

Se determinó el efecto de la bebida de salvado de arroz en humanos evaluando su CAT, la cual no mostró un incremento visible en sus concentraciones plasmáticas a las 2, 4 y 6 horas, hecho que pudo haber ocurrido por la excesiva disminución previa del consumo de antioxidantes por parte de los participantes, cuya avidez por antioxidantes, al momento del estudio provocó la utilización inmediata de los que se suministraron con la bebida, impidiendo su aparición en torrente sanguíneo. Se recomienda ampliar el estudio a un mayor número de individuos y contrastar con controles, siguiendo una dieta normal, pero controlada para hacer los ajustes estadísticos correspondientes.

REFERENCIAS

[1] Goufo P., Pereira J., Figueiredo N., Oliveira M. B., Carranca C., Rosa E. y Trindade H. 2014. Effect of elevated carbon dioxide (CO_2) on phenolic acids, flavonoids, tocopherols, tocotrienols, γ-oryzanol and antioxidant of rice (Oryza sativa L.). Journal of Cereal Science. 59: 15-24.

[2] Fardet A., Rock E., Rémésy C., 2008. Is the in vitro antioxidant potential of whole-grain cereals and cereal products well reflected in vivo?. Journal of Cereal Science.48: 258-276.

[3] Brand-Miller J.C., Liu V., Petocz P. y Baxter R.C. 2005. The glycemic index of foods influences postprandial insulin like growth factor binding protein responses in lean young subjects. American Journal of clinical nutrition. 82: 350-354.

[4] Lai C. H., Liou S. H., Jaakkola J. K., Huang H. B., Su T. Y. y Strickland P.T. 2012. Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Associated with Traffic Exhaust: The Increase of Lipid Peroxidation and Reduction of Antioxidant Capacity. Aerosol and Air Quality Research. 12: 941–950.

[5] Analytik Jena AG 2008. Determination of water (ACW) soluble antioxidative capacity in blood plasma. Analytik Jena AG. 7: 1-4.

[6] Lutz M. W., Menius J. A., Choi T. D., Laskody R. G., Domanico P. L., Goetz A. S. y Saussy D. L. 2013. Experimental design for high-throughput screening. Drug Discovery Today.1: 277-286.

[7] Prior R. L., Hoang H., Gu L., Wu X., Bacchiocca M., Howard L., Hampsch-Woodill M., Huang D., Ou B. y Jacob R. 2003. Assays for Hydrophilic and Lipophilic Antioxidant Capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of Plasma and Other Biological and Food Samples. J Agric Food Chem. 51: 3273−3279.

[8] Prior R.L., Wu X. y Schaich K. 2005. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. J Agric Food Chem. 53: 4290-4302.

TOXICITY EVALUATION OF *Raphanus sativus* L. *var niger* IN TWO EXPERIMENTAL MODELS

(Evaluación de la toxicidad de *Raphanus sativus* L. *var niger* en dos modelos experimentales)

Guillermo Castro-Torres Ibrahim[a,*+], María Angelina Torres-Ledesma[a], María de Lourdes García-Jiménez[a], María Guadalupe Azpeitia-Galaviz[a], Elia Brosla Naranjo-Rodríguez[b]

[a] Colegio de Ciencias y Humanidades, Plantel Sur, Universidad Nacional Autónoma de México. Cataratas y Llanura S/N, Colonia Jardines del Pedregal, C.P. 04500, Delegación Coyoacán, D.F., México
[b] Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. Avenida Universidad 3000, Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, C.P. 04510, México, D.F., México.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: ibrahim1002@hotmail.com

Área del Conocimiento: Química Clínica.

ABSTRACT
Raphanus sativus L. *var niger* is a medicinal plant known as black radish and has important ethnobotanical uses for the treatment of gallstones. Toxicity studies of natural products are very important as an antecedent for conducting others biological studies; for this reason, the aim of our experimental work, was to evaluate the toxicity of a black radish extract in two experimental models: *Artemia salina* and CD1 mice. The artemia model was used according to a standardized protocol. Female CD1 mice were stored under standard conditions of temperature, humidity and light/dark. In the artemia model, the extract was dissolved in water and prepared in three different concentrations (10, 100 and 1000 parts per million) and each concentration was triplicate. Artemias were deposited in test tubes with these concentrations to assess toxicity. Moreover, the extract was administered under a standardized protocol of oral acute toxicity in mice (175, 550, 1750 and 2000 mg / kg). Our results showed that the extract is not toxic in the *Artemia salina* bioassay, the median lethal dose obtained was LD50=645.65 µg/mL. In the mice model, no signs of toxicity at the macroscopic and microscopic levels were observed. The DL_{50} of the extract is over 2000 mg/kg, this finding indicate this extract is not toxic in an acute treatment. Our data represent a contribution on the toxicity studies of an important medicinal plant, these results may be a scientific reference for conducting other biological studies.

Keywords: black radish, *Artemia salina*, mice, toxicity.

RESUMEN
Raphanus sativus L. *var niger* es una planta medicinal conocida como rábano negro y tiene importantes usos etnobotánicos para el tratamiento de los cálculos biliares. Los estudios de toxicidad de productos naturales son muy importantes como una premisa para efectuar otros estudios biológicos; por esta razón, el objetivo de nuestro trabajo fue evaluar la toxicidad de un extracto del rábano negro en dos modelos experimentales: en *Artemia salina* y en el ratón CD1. El modelo de artemia fue utilizado de acuerdo con un protocolo estandarizado. Los ratones hembra CD1 fueron almacenados en condiciones estándares de temperatura, humedad y ciclo luz/oscuridad. En el modelo de artemia, el extracto fue disuelto en agua y preparado en tres diferentes concentraciones (10, 100 y 1000 partes por millón), cada

concentración se preparó por triplicado. Las artemas fueron depositadas en tubos de ensayo, los cuales contuvieron las concentraciones preparadas. Por otro lado, el extracto fue administrado de acuerdo con un protocolo estandarizado para toxicidad aguda en ratones (175, 550, 1750 y 2000 mg/kg). Nuestros resultados demostraron que el extracto no es tóxico en el modelo de *Artemia salina*. La dosis letal media fue de LD_{50}=645.65 µg/mL. En el modelo de los ratones, no se observaron signos de toxicidad en los niveles macroscópicos y microscópicos. La DL_{50} del extracto tiene un valor superior a los 2000 mg/kg; estos hallazgos indican que el extracto no es tóxico en un tratamiento agudo. Nuestros datos representan una contribución dentro de los estudios de toxicidad de una importante planta medicinal.

Palabras Clave: rábano negro, *Artemia salina*, ratón, toxicidad.

INTRODUCCIÓN

Raphanus sativus L. *var niger* es conocido en la medicina tradicional como rábano negro y referenciado en la etnobotánica para el tratamiento de cálculos en la vesícula biliar (litiasis biliar) [1]. El rábano negro es una planta que pertenece a la familia crucífera o brasicácea, misma de la que son miembros otros vegetales populares, tales como las espinacas, brócoli, coliflor, col, nabicol y mostaza [2]; esta planta es herbácea bianual, con hojas ásperas, flores blancas que se agrupan en racimos, su fruto característico representa una vaina que envuelve las semillas; la superficie del rábano es áspera, rugosa, de color negro y generalmente voluminosa; sin embargo, su interior es blanco [3]. No se conoce con precisión el origen del rábano negro, porque se cultiva en diferentes partes del mundo, pero se tiene la hipótesis de su origen en el continente asiático. A diferencia de otras crucíferas, el rábano negro es resistente a diferentes tipos de plaga, crece en climas fríos y sus mecanismos de defensa están asociados con su alto contenido de glucosinolatos, metabolitos secundarios que lo protegen de la depredación de organismos herbívoros y que le atribuyen su sabor picante característico [4]. La clasificación taxonómica del rábano negro fue descrita por el botánico alemán Johann Simon von Kerner (1755-1830).

El rábano negro se utiliza en diferentes partes de México para el tratamiento de la litiasis biliar (piedras en la vesícula) y en la actualidad esta planta cuenta con reportes científicos en animales de experimentación, que sustentan estas propiedades [5, 6]; sin embargo, los datos sobre toxicidad son escasos. La toxicidad de productos naturales es un aspecto importante que debe de tratarse y para ello existen diferentes protocolos en animales de experimentación y en otros modelos biológicos. La *Artemia salina* es un crustáceo que habita los ecosistemas acuáticos y ha sido empleado para crear un bioensayo de toxicidad aguda en el cual se puede estimar la concentración letal media (DL_{50}) de extractos vegetales [7]. Este bioensayo ha sido descrito como simple, barato y conveniente [8]; se han obtenido resultados en diferentes países sobre la toxicidad de plantas empleadas en la gastroenteritis, que tienen acciones biológicas de protección relacionadas con los estudios farmacológicos de sus compuestos químicos [9]. El bioensayo con artemia se utiliza en los países desarrollados, donde el 85% de la población utiliza las plantas medicinales en su terapia tradicional. Otras pruebas de toxicidad están fundamentadas en el uso de animales de experimentación y las especies más utilizadas son los roedores. En la actualidad existe una concientización sobre reducir el uso de animales de experimentación, a través de pruebas que te permitan tener resultados confiables, reproducibles y empleando un número mínimo de animales. En el protocolo de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) se establece el uso de un solo animal de experimentación por dosis evaluada y en la actualidad se ha convertido en una metodología ampliamente utilizada [10]. Por lo tanto, el objetivo de nuestro trabajo fue evaluar la toxicidad aguda de un extracto orgánico del rábano negro en dos modelos experimentales.

METODOLOGÍA

Material vegetal y extracción

Los tubérculos frescos del rábano negro fueron colectados en la comunidad de Cuautla, Morelos en agosto de 2014, su clasificación taxonómica fue realizada en el Herbario de la Facultad de Ciencias, UNAM (número de registro en proceso de obtención). Se utilizó el material vegetal seco (250 g) y se puso a macerar en etanol (500 mL), posteriormente el disolvente fue retirado con la técnica de destilación y el extracto fue concentrado (10.2 g).

Animales de experimentación y tratamientos

Se utilizaron 6 ratones hembra CD1 comprados en Laboratorios Harlan de México, con peso de 30±2 g y 10 semanas de edad; fueron divididos aleatoriamente en 6 grupos experimentales (n=1), siguiendo el protocolo estandarizado de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE), que sustenta una reducción en el uso de animales de experimentación. Los ratones se almacenaron en cajas de policarbonato, bajo condiciones estándares de temperatura, humedad y luz-oscuridad (12x12 horas). El experimento se llevó a cabo bajo los preceptos éticos de la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) "Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio". Un ratón constituyó nuestro control (sin tratamiento) a otro se le administró agua por vía oral (0.1 mL/10 g peso) y a los otros 4 ratones se les administró por la misma vía las dosis de 175, 550, 1750 y 2000 mg/kg del extracto etanólico disuelto en agua. Las administraciones se realizaron a las 09:00 AM y posteriormente, se observó el comportamiento de los ratones, para registrar cualquier signo de toxicidad.

Modelo de *Artemia salina*

A partir de huevecillos liofilizados, las artemias fueron cultivadas en un medio estandarizado, cuyos componentes pueden observarse en la tabla 1. El medio de cultivo fue esterilizado por ebullición durante 30 minutos y filtrado a través de un embudo; la pérdida de agua se recompensó agregando agua destilada, ajustando el pH entre 7-8 con bicarbonato de sodio. Todas las sales empleadas fueron en grado reactivo adquiridas en Laboratorios Sigma-Aldrich, Merck y J.T. Baker.

SALES	**GRAMOS/LITRO**
NaCl	24.0
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1.5
KBr	0.1
KCl	0.7
Na_2SO_4	4.0
$NaHCO_3$	0.2
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	11.0
TOTAL DE SALES	**41.5**

Se utilizó una pecera de vidrio transparente con dimensiones de 25 cm de base por 14 cm de altura, la cual se dividió en dos compartimentos (de 20 cm y 5 cm de largo), teniendo como separación una placa de vidrio de 12 cm de altura, colocada a 2 cm de distancia entre el fondo de la pecera, permitiendo el

paso de agua; se empleó una lámpara con un foco de 60 W de intensidad, un dispositivo aereador con manguera, termómetro de -20 a 150 °C, matraz aforado de 1 L, matraz Erlenmeyer de 1 L, balanzas granataria y analítica, pipetas de 1, 5 y 10 mL, 9 frascos viales de 7 mL de capacidad, espátulas y pisetas de plástico.

Se vertió 1 L del medio salino en la pecera, la cual previamente se cubrió con papel aluminio para conservar la temperatura. Se pesaron 10 mg de huevecillos liofilizados de Artemia salina para dispersarlos en el compartimento de menor área. La pecera fue iluminada con el foco para mantener una temperatura constante de 25 °C que favoreció la embriogénesis y finalmente, se cubrió con una porción de gasa estéril para evitar la contaminación del medio. Los primeros nauplios de artemia aparecieron después de 48 horas. Se prepararon 3 concentraciones del extracto etanólico del rábano negro a 1000, 100 y 10 partes por millón (ppm). Se midió 1 mL de cada concentración en los frascos y con ayuda de la pipeta Pasteur se depositaron 10 artemias, completando a un volumen de 5 mL con el medio salino donde crecieron. Los frascos se dejaron expuestos a la luz durante 24 horas. Al finalizar el período de exposición, se contabilizaron las artemias vivas, considerando las siguientes especificaciones:

1. Las artemias que presentaron movimiento, por más mínimo que fuera, se consideraron como vivas.
2. Aquéllas que permanecieron inmóviles, se consideraron muertas

Finalmente, los datos obtenidos se tabularon y se presentaron como se puede encontrar en la sección de resultados. Para el análisis de esta prueba y la determinación de DL_{50}, se utilizó la tabla de conversión de probabilidad a unidades Probit

RESULTADOS

Toxicidad en artemias

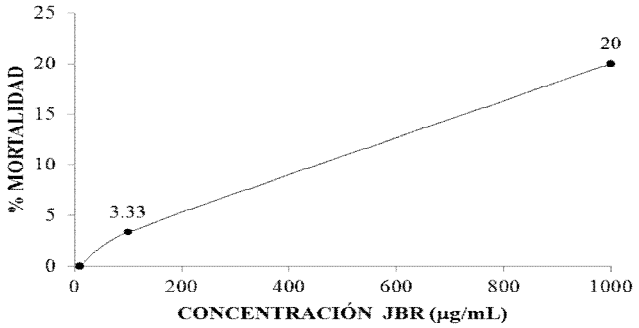
En la tabla 2 se presentan los datos obtenidos en el bioensayo toxicológico de extracto etanólico. Cada concentración se realizó por triplicado incluyendo el control. La mortalidad de artemias fue proporcional a la concentración del extracto de rábano negro, mostrando un mayor índice de mortalidad en la concentración alta (1000 ppm), descendiendo el índice para la concentración de 100 ppm y mostrando nula mortalidad a la concentración 10 ppm. La viabilidad en el grupo control fue del 100% y no se observaron alteraciones en el comportamiento

CONCENTRACIÓN (ppm)	**REPETICIONES DEL EXPERIMENTO**						**DATOS FINALES**			
	1		**2**		**3**					
	n_i	r_i	n_i	r_i	n_i	r_i	$\sum n_i$	$\sum r_i$	p_i	y_i
CONTROL	10	0	10	0	10	0	30	0	0	---
10	10	0	10	0	10	0	30	0	0	---
100	10	1	10	0	10	0	30	1	0.03	3.119
1000	10	2	10	3	10	1	30	6	0.2	4.156

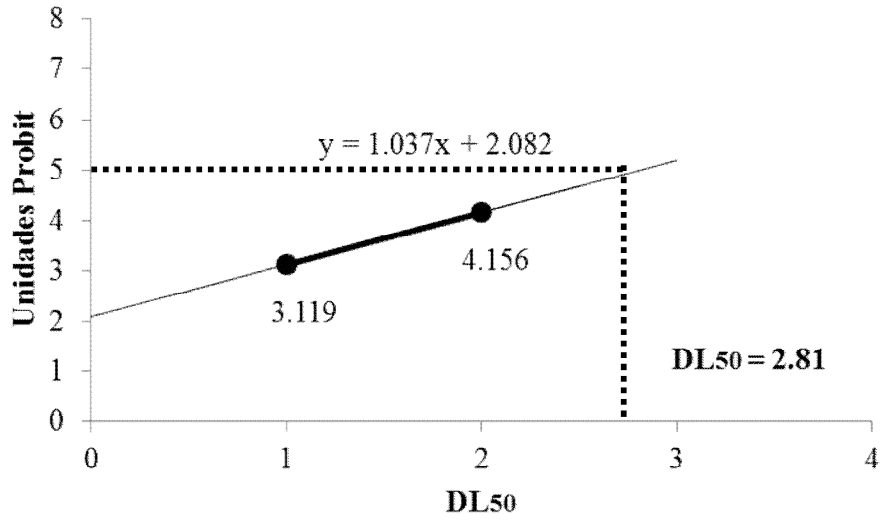
n_i = número de artemias utilizadas por concentración por cada repetición

r_i = número de artemias muertas por concentración por cada repetición
$\sum n_i$ = número de artemias totales utilizadas por concentración
$\sum r_i$ = número de artemias totales muertas por concentración
p_i = probalilidad por concentración ($\sum r_i / \sum n_i$)
y_i = unidad Probit calculada por tablas a partir de p_i

En el extracto de rábano negro, en concentración de 1000 ppm, hubo el mayor índice de mortalidad para las artemias; sin embargo, esta mortalidad no fue significativa para considerar tóxico el producto natural, dado el valor de DL_{50}. En la concentración 100 ppm fue escaso el número de larvas muertas y fue nulo para la concentración de 1000 ppm, en donde todas vivieron después de la lectura realizada a las 24 horas (figura 1).



(Falta el Pié de la Figura)
La determinación de la DL_{50} consideró el uso de dos concentraciones del extracto de rábano negro donde las artemias presentaron mortalidad: 100 y 1000 ppm. Para el caso de la concentración 10 ppm y el control, hubo viabilidad total de las artemias. Se presentó linealidad en el índice de mortalidad, obteniendo un valor de la concentración letal media de 2.82 ppm o 645.65 µg/mL (figura 2).



La ecuación de la recta que se obtuvo fue:

$$y = 1.037x + 2.082$$
$$5 = 1.037(DL_{50}) + 2.082$$
$$5 - 2.082 = 1.037(DL_{50})$$
$$2.918 = 1.037(DL_{50})$$
$$DL_{50} = 2.918 / 1.037$$
$$DL_{50} = 2.8138$$
$$DL_{50} = 645.65 \text{ ppm}$$

DL_{50} = 645.65 g/mL

Cuando en el bioensayo de toxicidad con *Artemia salina* L., obtenemos un valor de DL_{50} inferior a 1000 g/mL se consideran los productos naturales evaluados como sustancias bioactivas no tóxicas [8]; por lo tanto, el extracto del rábano negro contiene bioactivos no tóxicos:

Toxicidad en el modelo de ratón

Demostramos que no hubo signos de toxicidad en los ratones, durante la observación que realizamos en las horas posteriores a la administración del extracto. En los 3 días posteriores a la prueba, tampoco se observaron cambios macroscópicos aparentes en los ratones. Los resultados nos indicaron que la DL_{50} debe de encontrarse en un valor superior a los 2000 mg/kg, valor que no es necesario buscar. Los resultados se encuentran reportados en la tabla 3.

Dosis del extracto (mg/kg) vía oral	**% Mortalidad**	**Signos de toxicidad**	**% Supervivencia**
Control (sin tratamiento)	0	0/1	100
Vehículo (agua)	0	0/1	100
175	0	0/1	100
550	0	0/1	100
1750	0	0/1	100
2000	0	0/1	100

Con respecto a posibles cambios o alteraciones en el principal órgano del metabolismo (hígado), no observamos efectos negativos tras la administración del extracto, las muestras de cortes hepáticos pueden compararse con nuestro grupo control (que no recibió tratamiento) (figura 3)

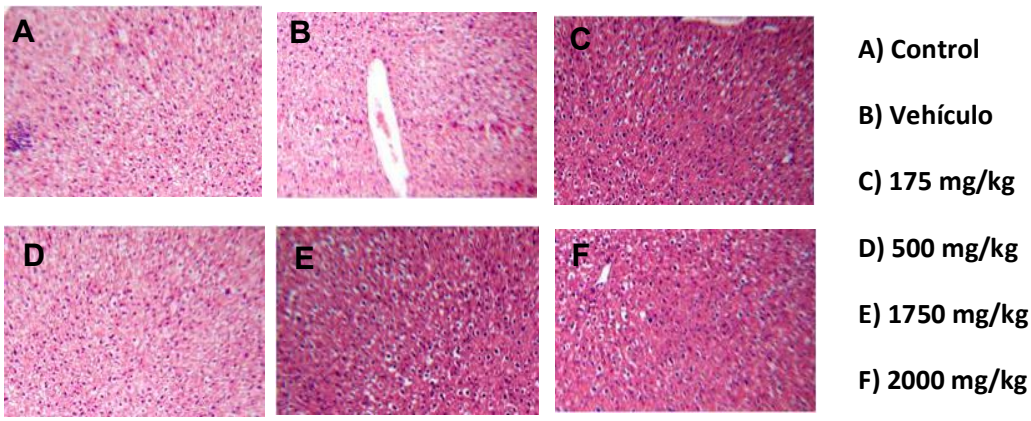


Tabla 1. Componentes químicos del medio de cultivo para *Artemia salina*. El crustáceo logra un desarrollo óptimo con la concentración adecuada de todas las sales citadas; sin embargo, algunos autores han reportado medios enriquecidos con cloruro de sodio, exclusivamente.
Tabla 2. Resultados de la prueba de toxicidad en *Artemia salina*.
Tabla 3. Toxicidad aguda en el ratón CD1. Se observó la conducta de los animales durante las primeras horas, con la finalidad de registrar cualquier signo de toxicidad.
Figura 1. La relación en la concentración del producto natural evaluado es directamente proporcional: al aumentar la concentración del extracto, se propicia la muerte del mayor número de artemias.
Figura 2. Concentración letal media (DL_{50}), obtenida mediante extrapolación en la línea de tendencia. Su valor se comprobó con la DL_{50} obtenida en la ecuación de la recta.
Figura 3. Estudios histopatológicos de los ratones tratados. Se observan cortes histológicos del hígado, teñidos con hematoxilina-eosina

DISCUSIONES

Los bioensayos con agentes tóxicos en seres vivos bajo condiciones de laboratorio, se han incrementado debido a la brevedad con que se obtiene la información sobre las dosis letales (DL_{50}) que afectan negativamente a los organismos. Pero la variabilidad en la aplicación experimental para el mantenimiento de organismos afecta la interpretación de los resultados en laboratorios, por lo que se desarrollan metodologías estandarizadas para establecer condiciones controladas. Utilizar organismos provenientes directamente del medio natural puede distorsionar los resultados obtenidos por fuentes de variabilidad no previstas, como nutrición, dinámica de la población, estrés, etc. La evaluación de la acción tóxica de plantas es indispensable para considerar un tratamiento seguro que permita la definición de la toxicidad intrínseca de la planta y los efectos sobre la dosis aguda, ya que los ratones de laboratorio son sensibles a sustancias tóxicas presentes en vegetales [11]. Debido a que en la actualidad existe una tendencia a limitar el uso de animales de laboratorio en las pruebas toxicológicas [13], en

este trabajo se utilizó la *Artemia salina* y el protocolo de toxicidad de la OCDE. El extracto etanólico de rábano fue evaluado en el bioensayo de artemia, obteniendo la DL_{50} igual 645.65 □g/mL. En los estudios de toxicidad con *Artemia salina*, un valor de DL_{50} menor a 1000 □g/mL indica que el extracto o producto natural evaluado presenta compuestos bioactivos no tóxicos [8]; es por ello que, comparando el valor reportado con el obtenido en este trabajo, se demostró que los activos del extracto no son tóxicos. Ciertos autores estipulan que no existe correlación entre la prueba toxicológica de artemia con los efectos toxicológicos en especies como los ratones [12], pero ante ello, se reportó que 20 extractos de plantas evaluados en ensayos toxicológicos in vivo (ratones) e in vitro (artemias) mostraron resultados de muy buena correlación ($r = 0.85$ $p<0.05$), lo que sugiere que el bioensayo de artemia es un modelo alternativo de utilidad. En general, Artemia salina es un modelo útil para predecir la toxicidad de compuestos de origen natural; sin embargo, aunque el método ofrece ventajas como rapidez, sencillez, sustitución de uso de animales y bajo costo, no se omite la posibilidad de ser objeto de validación adecuada entre diferentes laboratorios. Los resultados que obtuvimos con nuestros ratones, nos indican que en un organismo con un sistema anatómico mucho más complejo, no se presentaron signos de toxicidad y que la bioseguridad del producto natural está más respaldada.

CONCLUSIONES

El rábano negro es una planta medicinal que no provocó efectos tóxicos agudos en dos modelos experimentales, sus propiedades son benéficas, por lo tanto no hay efectos negros (malos) sino blancos (muy buenos).

Los modelos de toxicidad aguda reducen al máximo el uso de animales de experimentación.

Nuestros resultados representan un aporte a la investigación de la Medicina Tradicional Mexicana

REFERENCIAS

[1] Castro-Torres, I.G., De la O-Arciniega, M., Gallegos-Estudillo, J., Naranjo-Rodríguez, E.B., Domínguez-Ortíz, M.A. (2014). Raphanus sativus L. var niger as a source of phytochemicals for the prevention of cholesterol gallstones. Phytother Res 2014; 28: 167-171.

[2] Lugasi, A., Dworschák, E., Blazovics, A., Kéri, A. (1998). Antioxidant and free radical scavenging properties of squeezed juice from black radish (Raphanus sativus L. var niger) root. Phytother Res, 12: 502-506.

[3] Bruneton, J. 1995. Pharmacognosy Phytochemistry Medicinal Plants, second edition. Lavoisier, Paris.

[4] Müller, C. (2009). Interactions between glucosinolate- and myrosinase-containing plants and the sawfly Athalia rosae. Phytochem Rev, 8(1): 121-134.

[5] Castro-Torres, I.G., Naranjo-Rodríguez, E.B., Domínguez-Ortíz, M.A., Gallegos-Estudillo, J., Saavedra-Vélez, M.V. (2012). Antilithiasic and hypolipidaemic effects of Raphanus sativus L. var niger on mice fed with a lithogenic diet. J Biomed Biotechnol, PMID: 23093836.

[6] Castro-Torres, I.G., López-Velázquez, J.A., Sánchez-Valle, V., Martínez-Vázquez, M., Uribe, M., Méndez-Sánchez, N. (2013). Prevention of cholesterol gallstones by two extracts of Raphanus sativus L. var niger in mice. J Hepatol, 58: S281.

[7] Lewan, L., Andersson, M., Morales, P. (1992). The use of Artemia salina in toxicity testing. Alternativ Lab Anim, 20: 297-301.

[8] Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobson, L.B., Nichols, D.E., McLaughlin, J.L. (1982). Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. J Med Plant Res, 45: 31-4.

[9] Mathews, R.S. (1995). *Artemia salina* as a test organism for measuring superoxide-mediated toxicity. Free Radia Biol Med, 18: 919-922.

[10] Arts, J.H., Zwart, A., Schoen, E.D., Klokman-Houweling, J.M. (1989). Determination of concentration-time-mortality relationships versus LC50s according to OECD guideline 403. Exp Pathol, 37: 62-66.

[11] Cáceres A. 1996. Plantas de uso medicinal en Guatemala. 1ª Edición. Editoria Universitaria: San Carlos de Guatemala. pp. 61-7.

[12] Sánchez, C., Gupta, M., Vásquez, M., Noriega, Y., Montenegro, G. Bioensayo con *Artemia salina* para predecir la actividad antibacteriana y farmacológica. Rev Med de Panamá, 18: 62-69.

[13] Yajes R. 1997. Animal ethics committees and the implementation of the Three Rs. Animal Alternatives, Welfare and Ethics. Ed LFM Van Zutphen and M. Balls Elsevier Developments in Animal Veterinary Sciences: 367-71.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

GENOTOXICITY EVALUATION AFTER TOPICAL CORTICOSTEROID APPLICATION IN MICE PERIPHERAL BLOOD

(Evaluación de genotoxicidad de cuatro corticosteroides de uso tópico en sangre periférica de ratón)

Penélope Valdez Aburto[a]*, Leonardo Daniel Molina Noyola[a], María Guadalupe Zavala Cerna[a], Ana Cristina Lara Acevedo[b], Jorge Alfonso Herrera Figueroa[b], Aurelio Flores García[b], Olivia Torres Bugarín[a+].

[a] Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Guadalajara, Av. Juan Palomar Arias 44670, Guadalajara, JAL. CP45100.
[b] Universidad Autónoma de Nayarit, Universidad de la Cultura Amado Nervo S/N, Tepic, NAY. C.P. 63001.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: oliviatorres@hotmail.com

Área del Conocimiento: Química Clínica.

ABSTRACT
Skin is a barrier that is exposed to mutagens and carcinogens, like drugs. Topical corticosteroids are frequently prescribed by doctors and once applied to the skin, they adhere to the keratinocytes and are released in a 24 hour period, acting on the cytosolic and nuclear receptor and inducing lipocortins that act on the antifosfolipasa A2 which inhibit cytokines that are responsible for the vasoconstrictor, anti-proliferative, anti-inflammatory and immunosuppressive properties; not without side effects. The objective is to evaluate the genotoxic effect of four topical corticosteroids since its not well documented. *Methodology:* We created 13 groups with 6 male mice on each (Balb-C), 1) petrolate, 300mg, 2-13) where exposed to hydrocortisone topical cream 300, 150 and 75mg. 2-4) hydrocortisone 1%, 5-7) betamethasone,8-10 methylprednisolone and,11-13 clobetasol. The back of each mouse was shaved (2cm^2) and exposed to the test substance every 24 hours for a 5 day period. A blood test was taken from their tail on the 9th day,and do a smear (alcohol at 80% for 10 minutes), dying it with acridine orange and analyzing it under the microscope (100x). On each sample the micronucleated erythrocytes (EMN)/10,000, erythrocytes, polychromatic erythrocytes (EPC) and micronucleated EPC in a 1000 cells.
Results: In every simple we detected a higher frequency of EMN after the second or third day of skin exposure to the topical compound ($p<0.01$) and greater genotoxicity. Conclusion: There genotoxicity statistically significant difference between the control and study groups. Methylprednisolone was associated with greater genotoxicicidad.

Keywords: Corticosteroids, erythrocytes, genotoxicity, micronucleates.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

AGAVE FRUCTANS AS FUNCTIONAL PHARMACEUTICAL EXCIPIENT IN A GASTRORETENTIVE SUSTAINED-RELEASE CRYOGEL

(Fructanos de agave como excipiente farmacéutico funcional en un criogel de liberación sostenida de retención gástrica)

PatriciaSalazar Carrasco [a]*, Lorena Moreno Vilet[b], Rosa María Camacho Ruiz[b], Alba Adriana Vallejo Cardona[a], José Luis Flores Montaño[c], Marisela González Ávila[a], Blanca Elizabeth Ruiz Álvarez[a], Miguel Ángel Teposte Andrade[a], Zaira Y. García Carvajal [a+].

[a] Unidad de Biotecnología Medica y Farmacéutica, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.
[b] Unidad de Biotecnología Industrial, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.
[c] Dirección Adjunta de Vinculación y Transferencia de Tecnología, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: zgarcia@ciatej.mx

Área del Conocimiento: Química Farmacéutica.

ABSTRACT
In a pharmaceutical oral dosage form, excipients are often characterized as inactive or inert ingredients. The agave fructan powder (from *Agave tequiliana* var. azul) has been tested for this role as a binder or filler in tablets. However, some excipients can also affect the pH of the gastrointestinal fluid and/or microenvironmental pH of gastro-resistant dosage forms, both of which can affect drug release. For this reason, this research work has focused on the preparation of cryogels using Poly(vinyl)alcohol (PVA), fructan powder (Olifructine ®) and Ciprofloxacin hydrochloride (CFX-HCl) in order to evaluate its release profile in an ex-vivo intestinal system (IS) adapted to adult physiological conditions. Olifructine ® as raw material was characterized as follows: 1) fructose, sucrose and glucose content by High Performance Liquid Chromatography-(HPLC), crystallinity by X-ray diffraction (XRD), saccharides chemical identification by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and polymerization degree (PD) by MALDI-TOF mass spectrometry. ***Results:*** Carbohydrates content in Olifructine ® was 6.7% (w/v) fructose, 1.012% (w/v) glucose with sucrose absence. Olifructine ® presented an amorphous structure by XRD. FTIR showed characteristic bands of fructose (1061-1063 cm^{-1}) and glucose (1033-1034 cm^{-1}). MALDI-TOF spectra showed peaks with a mass separation of 162 which corresponds to one fructose unit with a 25 DP. The cryogenic process has been shown to be a versatile methodology for the homogeneous incorporation of CFX-HCl throughout its entire macrostructure. The is a powerful tool for estimating release profiles from of pharmaceutical oral dosage forms. Cryogel with Olifructine ® showed maximum CFX-HCL release at 2h (100% release) with cryogel dissolution while formulation without Olifructine ® showed CFX-HCL maximum release at 3h (100%) with cryogel erosion (cryogel fragments in the medium) suggesting Olifructine ® acted as a disagregant.

Keywords: Olifructine ®, controlled release, human digestive tract simulator, cryogel.

RESUMEN
En una forma de dosificación farmacéutica oral, los excipientes se caracterizan a menudo como ingredientes inactivos o inertes. El polvo de fructanos de agave (de agave tequiliana var. Azul) ha sido probado para este papel como un aglutinante o la carga en tabletas. Sin embargo, algunos excipientes también pueden afectar el pH de la pH fluido y / o pH microambientales de formas de dosificación gastrorresistentes, ambos de los cuales pueden afectar a la liberación del fármaco. Por esta razón, este trabajo de investigación se ha centrado en la preparación de criogeles utilizando alcohol polivinilico (PVA), polvo de fructanos (Olifructine ®) y ciprofloxacina clorhidrato (CFX-HCl) con el fin de evaluar su perfil de liberación de un simulador tracto digestivo humano (STDH) ex-vivo adaptado a las condiciones fisiológicas de los adultos. Olifructine ® como materia prima se caracterizó de la siguiente manera: 1) el contenido de fructosa y sacarosa por Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), la cristalinidad por difracción de rayos X (XRD), identificación química por espectroscopia infrarroja por transformada de fourier (FTIR) y grado de polimerización (DP) por espectrometría de masas MALDI-TOF. Resultados: El contenido de hidratos de carbono en Olifructine ® fue 6,7% (w / v) de fructosa, 1.012% (w / v) de glucosa con la ausencia de sacarosa. Olifructine ® presenta una estructura amorfa por XRD. FTIR mostró bandas características de fructosa (1061-1063 cm-1) y glucosa (1033-1034 cm-1). MALDI-TOF espectros mostraron picos con una separación de masa de 162 que corresponde a una unidad de fructosa con un DP 25. El proceso criogénico ha demostrado ser una metodología versátil para la incorporación homogénea de CFX-HCl largo de toda su macroestructura. Este es una poderosa herramienta para la estimación de los perfiles de liberación a partir de formas de dosificación orales farmacéuticas. Criogel con Olifructine ® mostró liberación máxima CFX-HCL en 2h (liberación del 100%) con la disolución del criogel mientras formulación sin Olifructine ® mostró CFX-HCL liberación máxima a 3h (100%) con la erosión del criogel (fragmentos criogel en el medio) que sugieren Olifructine ® actuado como un desintegrante.

Palabras Clave: Olifructine ®, liberación controlada, simulador tracto digestivo humano, criogel.

INTRODUCCIÓN

Para hacer frente a los nuevos desafíos, la industria farmacéutica se encuentra actualmente reinventándose a sí misma. Al mismo tiempo, existen oportunidades para la industria farmacéutica, como por ejemplo, la evaluación de nuevos excipientes farmacéuticos. Los excipientes pueden agregar funcionalidad a los productos farmacéuticos y ofrecen un abanico de posibilidades para introducir nuevas formas de dosificación, facilitando la extensión de vida de la patente, e innovaciones prácticas [1]. Entre las principales clases de formas de dosificación sólidas orales se incluyen los comprimidos y/o tabletas de liberación inmediata y controlada (extendida, retardada, etc.) y las formulaciones de disolución oral (como por ejemplo, los polvos). Los excipientes, junto con sus procesos de fabricación, juegan un papel crítico en la fabricación de estas formas farmacéuticas [2].

Según la firma de investigación de mercado Frost & Sullivan, las compañías farmacéuticas están reconociendo cada vez más el valor agregado de los excipientes farmacéuticos [3]. Los excipientes farmacéuticos de origen vegetal son atractivos porque los recursos que se pueden obtener de las plantas son renovables y si se mantienen y cosechan de forma sostenible, pueden ser fuentes constantes de materias primas [4]. Los fructanos son polímeros de fructosa derivados de la molécula de sacarosa, la cual es un disacárido de fructosa y glucosa. Son una mezcla compleja de fructo-

oligosacáridos que contienen principalmente enlaces, β- (2 → 1), pero además, poseen una estructura ramificada. Los fructanos de plantas tienen diferentes estructuras y longitudes de cadena, que van de arriba de tres a pocos cientos de unidades de fructosa, con una gran variedad en enlaces y residuos fructosil. Sólo unas pocas plantas contienen fructanos en gran abundancia: la raíz de la achicoria y los tubérculos de pataca. Otra rica fuente de fructanos es la planta de agave azul (*A. tequilana* Weber var. Azul) [5].

Recientemente, los comprimidos de liberación inmediata han comenzado a ganar popularidad y aceptación como un sistema de administración de fármacos, principalmente porque son fáciles de administrar, tienen una acción terapéutica inicial rápida, son económicos y conducen a un mejor cumplimiento del paciente. También son una herramienta para la expansión de los mercados, ampliando los ciclos de vida de los productos y la generación de oportunidades en innovación farmacéutica. La Liberación inmediata puede ser obtenida empleando diferentes excipientes, la única condición es que no prolonguen la tasa de liberación del fármaco y / o absorción. Este término excluye formulaciones que llevan las connotaciones de liberación *"modificada", "controlada", "sostenida", "prolongada", "extendida"* o "*retrasada*" [6]. Trabajos previos han demostrado que criogeles,- a base de alcohol polivinílico (PVA) y ciprofloxacino hidrocloruro (CFX)-, y que son preparados mediante procesos criogénicos exhiben estructuras reticuladas y porosas siendo adecuados para controlar los perfiles de liberación de CFX [7]. El CFX, es un agente antibacteriano de amplio espectro de la familia de las fluorquinolonas. Es empelado con gran éxito para evitar infecciones urinarias, estomacales, etc. Además, es estable en medios ácidos [8-9].

Debido a lo expuesto anteriormente, este trabajo de investigación se ha centrado en la preparación de criogeles de PVA, conteniendo polvo de fructanos (Olifructine ®) como excipiente farmacéutico y CFX como fármaco modelo. Esto con la finalidad de evaluar el impacto que tiene la incorporación de Olifructine ® sobre el perfil de liberación de CFX procedente de los criogeles y utilizando un Simulador del Tracto Digestivo Humano (STDH) adaptado a las condiciones fisiológicas de los adultos.

METODOLOGIA

El Olifructine ® como materia prima fue donado por la empresa Nutriagaves y se caracterizó de la siguiente manera: 1) identidad química por espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier y reflectancia totalmente atenuada (ATR-FTIR); 2) determinación del hábito cristalino por difracción de rayos X (XRD); 3) Perfil de carbohidratos y distribución de tamaños Cromatografía- líquida de alta resolución (HPLC) y; 4) Grado de polimerización (DP) por espectrometría de masas por matriz con análisis por tiempo de vuelo (MALDI-TOF). Para llevar a cabo las caracterizaciones fisicoquímicas de los fructanos en polvo, la muestra se sometió a un proceso de secado térmico durante 2h a 70°C.

Identificación química por ATR-FTIR: Se empleó un equipo Jobin Yvon HORIBA (Edison, NJ, USA) con reflectancia totalmente atenuada. El análisis de datos se realizó mediante el software LabSpec (Edison, NJ, USA). ***Determinación del hábito cristalino por XRD:*** se empleó un Difractómetro Rigaku Modelo Miniflex 600, con tubo de Cu (longitud de onda de 154 nm), con dos detectores (DTEX *ultra* de alta velocidad y de centelleo), un monocromador y un revolver para seis muestras. ***Perfil de Carbohidratos por HPLC:*** se realizó la cuantificación de carbohidratos simples: glucosa, fructosa y sacarosa. El equipo empleado fue un Agilent Technologies 1260 Infinity, compuesto por automuestreador, desgasificador, bomba cuaternaria, compartimiento térmico de la columna y detector de índice de refracción. Como

fase estacionaria se utilizó una columna Aminex 42C de intercambio iónico (7.8 mm d.i. x 300 mm) de Bio-Rad (Hércules, Ca.) y como fase móvil, agua grado HPLC con un flujo de 0.35 ml/min. El volumen de muestra inyectada fue de 20 µl (con el inyector completamente lleno). La temperatura de la columna se mantuvo a 70 °C. Para el control del sistema y el análisis de resultados se empleó el software HP Chem de Agilent (Palo Alto, Ca.). Como estándares se emplearon, fructosa, glucosa y sacarosa (Sigma-Aldrich). Además, se realizó una curva de calibración de 0-10 g/L para cada azúcar. ***Determinación de distribución de tamaños por HPLC: s***e utilizó el mismo equipo HPLC. Como fase estacionaria, se utilizaron 1 o 2 columnas de exclusión de tamaño acopladas con un guarda-columna y conectadas en serie Ultrahydrogel DP y Ultrahydrogel 250 (7.8 x 300 mm, Waters). Como fase móvil, se utilizó agua grado HPLC con un flujo de 0.3 ml/min. El volumen de muestra inyectada fue de 20 µl (con el inyector completamente lleno). La temperatura de la columna se mantuvo a 50 °C. Se utilizaron dextranos de distinto peso molecular (Sigma-Aldrich) para la curva de calibración. ***Determinación del grado de polimerización (DP) por MALDI-TOF:*** se realizó usando un espectrómetro de masas MALDI-TOF Autoflex Speed de la marca Bruker Daltonics Inc. El equipo funciona con un voltaje de aceleración de 16.65 kV y 9.65 kV del extractor. El láser que se utilizó para ionizar la muestra tiene las siguientes características: atenuación de 23% con tasa de repetición de 1.000 Hz y 1500 disparos, y polaridad positiva. El Oligofructine se solubilizó en agua y se utilizó la matriz DHB (2,5-dihydroxybenzoic acid). Se obtuvieron los cromatogramas de iones totales de 250 a 3500 m/z y se analizaron con el software flexControl 3.4.135.0.

Preparación de los Criogeles:

Preparación de las soluciones poliméricas:

Suspensión de PVA al 7.8% (p/v): se añadieron 7.8 g de PVA (PM 89- 98000 KDa, con un grado de hidrólisis de 98-99%) a 100 mL de agua destilada, se agitó magnéticamente durante 1h en baño maría a 90°C. *Solución de Olifructine ® al 25% (p/v):* se añadieron 25 g de Olifructine® a 100 mL de agua destilada y se agitó vigorosamente hasta completa disolución del mismo.

Preparación de criogeles de PVA-Olifructine® con ciprofloxacino (F1):

Se pesaron 6.75g de la solución homogénea de PVA al 7.8% p/v y 3.75 g de solución de Olifructine ® al 25% (p/v) y se añadieron 750 mg de antibiótico (CFX) para hacer un total de 10 g de mezcla polimérica. Estos diez gramos debidamente pesados se colocaron en cajas Petri de 60 * 90 mm y éstas se sometieron a un ciclo de congelado y descongelado a -18°C durante 24h y fueron cortados con un suaje de 1cm de diámetro. Cada criogel cortado tuvo un peso aproximado de 0.868 ± 0.05 g.

Preparación de criogles de PVA con ciprofloxacino (F2):

Se pesaron 10 g de la solución homogénea de PVA al 7.8% p/v y se añadieron 750 mg de antibiótico (CFX). Estos diez gramos debidamente pesados se colocaron en cajas Petri de 60 * 90 mm y se procesaron de igual manera que los anteriores. Cada criogel cortado tuvo un peso aproximado de 0.709 ± 0.05 g.

Evaluación del perfil de liberación del ciprofloxacino procedente de criogeles con Olifructine ® empleando un Simulador del Tracto Gastrointestinal Humano (STDH):

La digestibilidad de los criogeles se llevó a cabo sin alimento. Se trabajó bajo condiciones ex vivo con un sistema que simula el tracto digestivo humano, adaptado a las condiciones fisiológicas de población adulta sin microbiota. El sistema consta de 5 reactores y cada uno representa una parte del sistema

digestivo: Estómago, Intestino Delgado, y tres secciones del colon. El sistema se mantuvo en condiciones fisiológicas (con las enzimas características de cada sección y al pH adecuado) y temperatura constante a 37º C. El medio del estómago se ajustó a un pH inicial de 2 a 2.5, posteriormente se ajustó el medio a pH 5 a 5.5 (condiciones del intestino delgado) y con una velocidad de agitación de 50 rpm, para así permitir la difusión del CFX contenido en los criogeles. El ensayo se realizó durante seis horas, es decir, 2h en el estómago y 4h en el intestino delgado. Las muestras procedentes del ensayo de liberación en el STDH se analizaron a una longitud de onda determinada anteriormente (274 nm), utilizando como blanco agua destilada, y se cuantificó en función de la curva obtenida en la validación, empelando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 marca Thermo Scientific.

DISCUSIÓN Y RESULTADOS

El impacto de los excipientes sobre la biodisponibilidad de los principios activos en las formas farmacéuticas se puede evaluar a través de su efecto sobre la velocidad de disolución del principio activo. Esto dependerá del rol del excipiente en la formulación (por ejemplo: disgregantes, aglutinantes, lubricantes, etc.), de sus propiedades fisicoquímicas (solubilidad, cristalinidad, hidrofobicidad, etc.), de los procesos implicados en la manufactura de las diferentes formas farmacéuticas (pulverización, co-precipitación, co-trituración, formación de dispersiones sólidas, etc.), lo cual puede conducir a la mejora en la solubilidad del fármaco y / o velocidad de disolución. Los excipientes naturales son actualmente incluidos en nuevas formas de dosificación para cumplir funciones específicas y en algunos casos directamente o indirectamente influir en la extensión y / o la velocidad de liberación del fármaco y la absorción. Además, los excipientes pueden afectar el pH del fluido gastrointestinal y / o microambientes lo que puede afectar a la liberación del fármaco [10]. En base a lo expuesto anteriormente, se formularon dos tipos de formas farmacéuticas (criogeles) de liberación inmediata con la finalidad de que se desintegren y disuelvan rápidamente y así seguir la liberación del CFX en el STDH y así evaluar el impacto que tiene la incorporación Olifructine ® en las formulaciones.

En este sentido, inicialmente procedimos a caracterizar fisicoquímicamente el Olifructine ®. Lo primero que se hizo fue identificar los grupos químicos funcionales de la mezcla de fructanos. Dado que los fructanos son una mezcla de azúcares, los resultados arrojados por ATR-FTIR detectaron la presencia de glucosa y fructosa en la mezcla, en donde las bandas de absorción característicos de fructosa y glucosa se observaron a las longitudes de onda de 1061-1063 cm^{-1} y 1033-1034 cm^{-1}, respectivamente (Fig. 1) [11]. Por otro lado, los excipientes farmacéuticos se pueden clasificar en dos grandes categorías basadas en su orden molecular: cristalino y amorfo (semi-cristalina o parcialmente amorfa). A la luz de las interacciones con el agua, los excipientes poliméricos hidrófilos amorfos o parcialmente amorfos son los materiales más importantes para la preparación de sistemas de liberación inmediata y controlada, debido a que las moléculas con grupos polares son capaces de formar enlaces de hidrógeno con las moléculas del principio activo durante su preparación y por ende durante su disolución, lo que afectará de manera significativa en su perfil de liberación [12]. Los resultados obtenidos mediante la técnica de XRD muestran que el polvo de fructanos es amorfo, y tiende a más cristalino una vez que es sometido a un proceso de secado térmico, indicándonos que podría tener un efecto sobre la cinética de liberación de principios activos (Fig 2) [13].

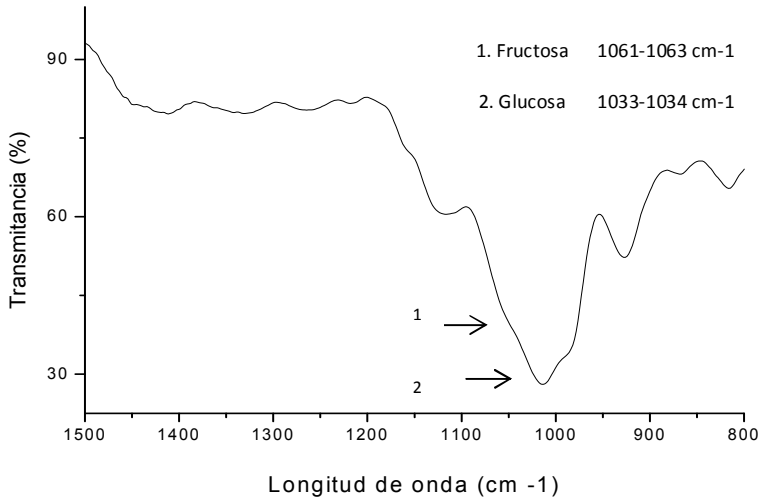


Figura 1. Espectro de FTIR de oligofructine muestra la presencia de hidratos de carbono en olifructine, debido a la variabilidad en esta zona 1186-950 cm^{-1}.

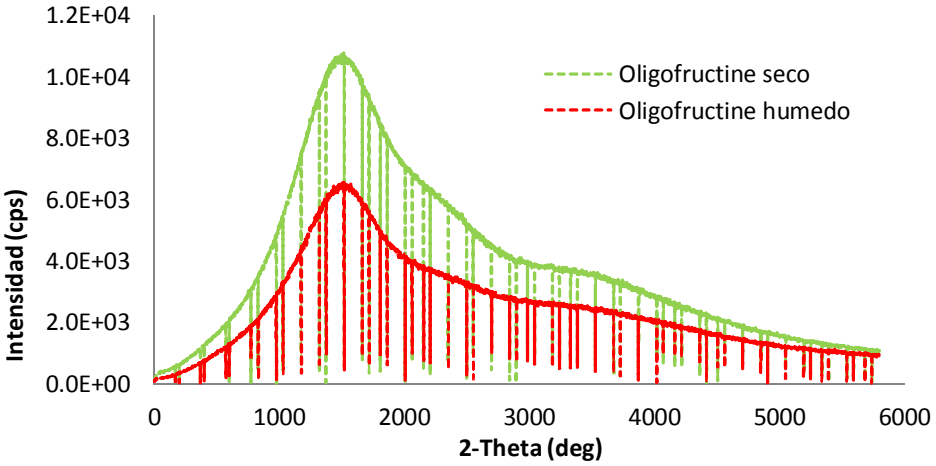


Figura 2. Patrón de difracción de rayos X de Olifructine®

Otros parámetros importantes que debemos conocer saber son el perfil de carbohidratos, el grado de polimerización (DP), y la distribución de tamaños. Es bien sabido que más del 80% en peso del contenido de carbohidratos en el agave azul contiene fructanos. Más aun, los fructanos con un grado de polimerización de 2 a 10 son comúnmente llamados fructooligosacáridos. Los fructanos de distinto origen y condiciones ambientales pueden diferir en el grado de polimerización, en la presencia de

ramificaciones, en el tipo de enlace entre las unidades de fructosa adyacentes y en la posición de los residuos de glucosa y de esto dependerá su actividad biológica y farmacéutica; por lo que es necesario conocer muy bien nuestra materia prima inicial [14]. De acuerdo a la caracterización del polvo de Olifructine® se observaron más de dos tipos de fructanos con un grado de polimerización alrededor de 25, corroborado por HLPC y MALDI-TOF (Fig 3). Se puede observar que Olifructine ® es una mezcla compleja de fructanos con un peso molecular de alrededor de 274-3450 Da que corresponden a un DP de 2 a 21. Además, los iones moleculares más intensos son los de 274 Da. Cabe mencionar que en esta figura (3a) solo se muestra el espectro desde 200 a 1800 m/z porque es la región donde se observan con mayor intensidad los picos de oligofructine. El análisis de HPLC mostró que Olifructine® tiene 6.7% (w/v) de fructosa y 1.012% (w/v) de glucosa (cromatograma no mostrado). También, por medio de HPLC se calculó la distribución de tamaños de oligofructine obteniendo un DP promedio de 25 (Fig 3b).

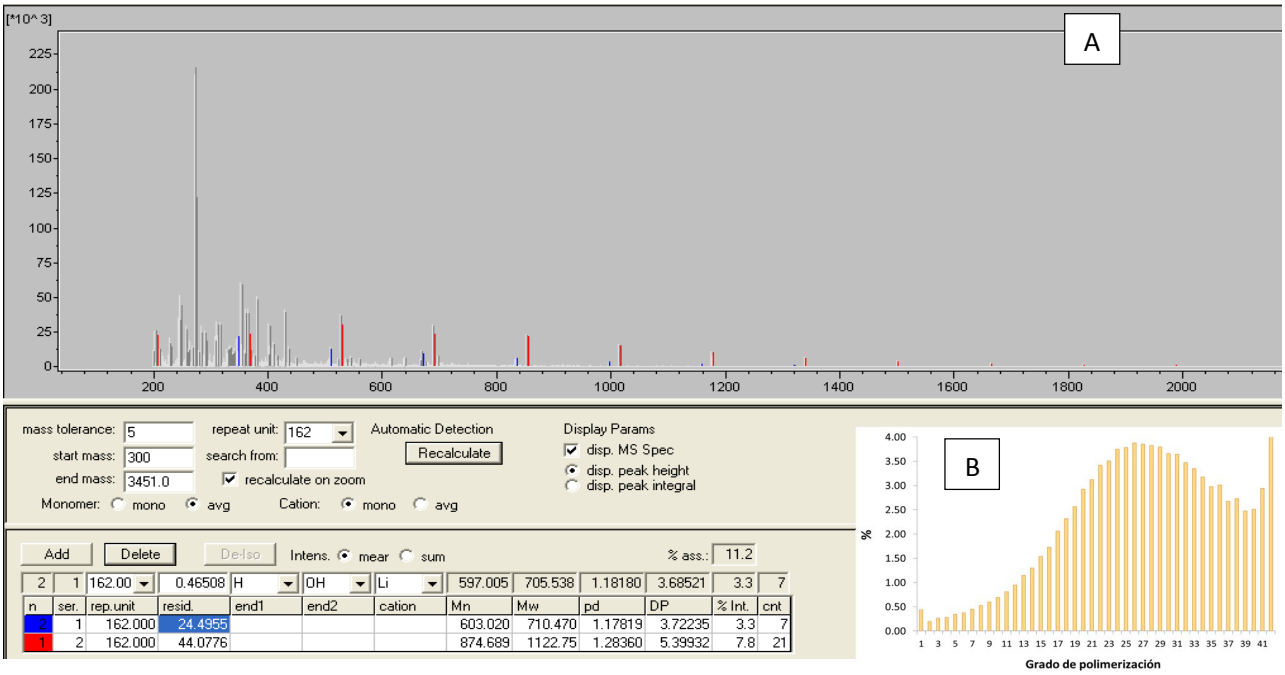


Figura 3. Grado de polimerización de Olifructine® obtenido por A) MALDI-TOF y B) HPLC

Por otro lado, el CFX es estable en medios ácidos, siendo su sitio principal de absorción el estómago continuando con la parte superior del intestino delgado (principalmente en duodeno), disminuyendo a partir del yeyuno y en las partes distales del intestino delgado y es casi completamente ausente en el colon, por lo que este antibiótico sirvió de fármaco modelo para evaluar el impacto que tiene el Olifructine ® como excipiente farmacéutico en una formulación hecha de manera fácil y sencilla [**¡Error! Marcador no definido.**]. Es bien sabido que empleando técnicas criogénicas se pueden obtener criogeles de PVA con estructuras macroporosas modificando la porosidad y por ende con capacidad de liberar el ciprofloxacino de una manera controlada. Además es una técnica sencilla y no costosa [**¡Error! Marcador no definido.**]. Aunado a esto, en CIATEJ se ha desarrollado un STDH que ayudo a evaluar el perfil de liberación del CFX durante su paso por el sistema gástrico simulando las condiciones fisiológicas del tracto digestivo humano. Además, en este STDH se han evaluado los cambios de la microbiota

intestinal en presencia de fracciones de fructanos de agave [15]. Durante el proceso de digestión se observaron cambios significativos en la matriz polimérica. En la formulación F1 (PVA-Olifructine®-CFX) se observó una erosión total del criogel a los 90 minutos liberando prácticamente el 100 % de CFX en el medio gástrico. Mientras que en la formulación F2 (PVA-CFX) se observó una erosión parcial (fragmentos flotando) de los criogeles y su perfil de liberación alcanzó el 100% entre los 160- 180 minutos en el medio del intestino delgado (Fig. 4). Esto pone de manifiesto que el Olifructine ® tendría un potencial uso como excipiente farmacéutico de formas de liberación inmediata de CFX.

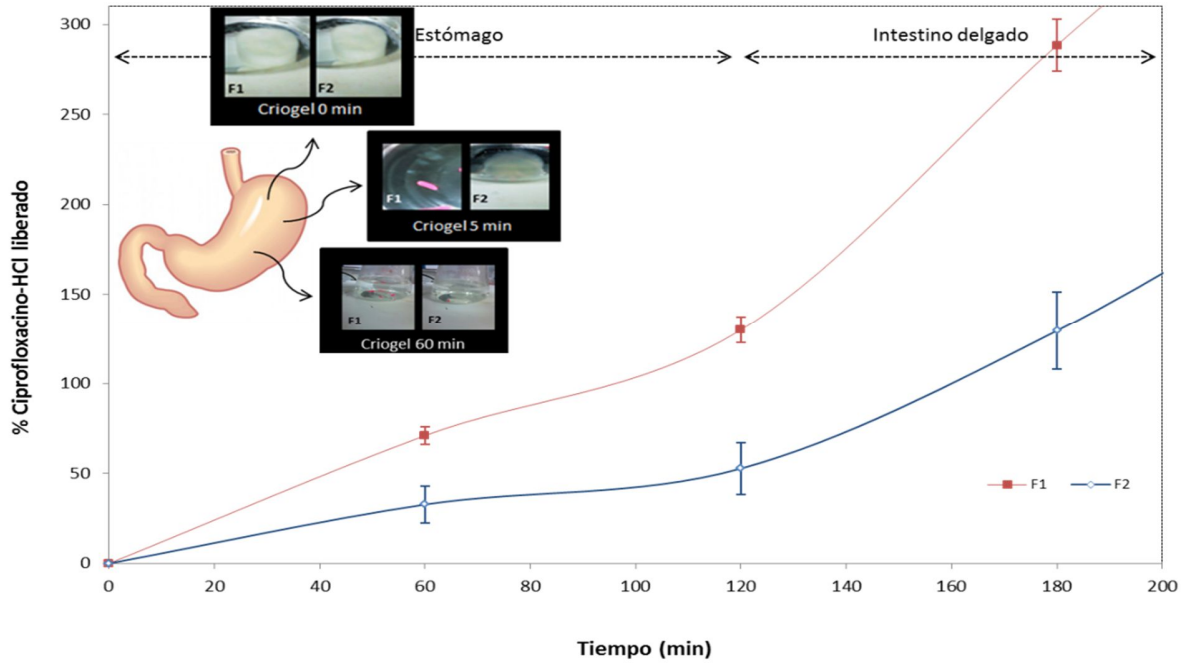


Figura 4. Perfil de liberación de CFX procedente de criogeles en condiciones fisiológicas mediante el uso de un Simulador del Tracto Digestivo Humano (STDH)

CONCLUSIONES

Existen grandes desafíos para la industria farmacéutica en materia de innovación. Una oportunidad sería la evaluación de nuevos excipientes que permitan nuevas formulaciones farmacéuticas de liberación inmediata y controlada. Oligofructine® podría ser un potencial excipiente farmacéutico de origen vegetal dado que es obtenido del Agave Tequilana Weber (var. Azul). Existen técnicas analíticas adecuadas y disponibles para la caracterización fisicoquímica de Olifructine®. El criogel conteniendo Olifructine ®- PVA y ciprofloxacino mostró una disgregación y disolución inmediata dando evidencia del empleo de esta materia prima como un potencial agente disgregante para formas farmacéuticas de liberación inmediata.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por CONACYT bajo los proyectos FOS-FINNOVA 50181, FOSSIS 234073. Se agradece al M.C. Luis Alberto Moreno Ruiz por el apoyo en la caracterización de FTIR-ATR, al Dr. Daniel Arrieta Báez por el apoyo en análisis de Espectrometría de Masas MALDI-TOF y al Dr. José Alberto

Andraca Adame por su colaboración en análisis de XRD, quienes son investigadores del Centro de Nanociencias y Micro y Nanotecnología del IPN.

REFERENCIAS

[1]. Miinea L, Farina J, Kallam M and Deorkar N. A New World of Excipients for Oral Solid Dosage Formulation. 2009. Pharmpro. Disponible en: http://www.pharmpro.com/articles/2009/02/new-world-excipients-oral-solid-dosage-formulation

[2]. Hlinak, A.J., Kuriyan, K., Morris, K.R., Reklaitis, G.V., Basu, P.K. Understanding critical material properties for solid dosage form design. 2006. Journal of Pharmaceutical Innovation 1 (1), pp. 12-17

[3]. Frost & Sullivan, "Strategic Analysis of Pharmaceutical Excipients in Europe". Disponible en internet: http://www.frost.com/prod/servlet/report-brochure.pag?id=B533-01-00-00-00

[4]. Beneke CE, Viljoen AM, Hamman JH. Polymeric plant-derived excipients in drug delivery. Molecules. 2009 Jul 16;14(7):2602-20

[5]. Delgadillo E., Corona R.I., Toriz G., Contreras H.J.,Sadeghifar H., Baobing W., Yang G., Lucia LA and Delgado E. Coacervated liposoluble fructan-based host–guest microspheres as unique drug delivery materials. 2015, RSC Advances 5 (83), pp. 67759-67766

[6]. Shafi Shaik, B.Pragathi Kumar, Harish.G. Formulation and evaluation of immediate release Carvedilol tablets. Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology. ISSN: 2321-5674; 2320 – 3471

[7]. Gutiérrez, M. C., García-Carvajal, Z. Y., Jobbágy, M., Rubio, F., Yuste, L., Rojo, F., Ferrer, M. L. and del Monte, F. (2007), Poly(vinyl alcohol) Scaffolds with Tailored Morphologies for Drug Delivery and Controlled Release. Adv. Funct. Mater., 17: 3505–3513.

[8]. Arza, R.A.K., Gonugunta, C.S.R., Veerareddy, P.R. Formulation and evaluation of swellable and floating gastroretentive ciprofloxacin hydrochloride tablets. 2009. AAPS PharmSciTech 10 (1), pp. 220-226

[9]. Harder, S., Fuhr, U., Beermann, D., Staib, A.H. Ciprofloxacin absorption in different regions of the human gastrointestinal tract. Investigations with the hf-capsule. 1990. British Journal of Clinical Pharmacology 30 (1), pp. 35-39

[10]. Ajit Narang. Excipients Impacting Bioavailability: A Case for Simplicity in Formulation. AAPS Blog in Current Perspectives., Bioavailability, Dosage, excipients, Formulation.2013. Disponible en: http://aapsblog.aaps.org/2013/06/27/excipients-impacting-bioavailability-a-case-for-simplicity-in-formulation/

[11]. Mellado-Mojica E, López MG. Identification, classification, and discrimination of agave syrups from natural sweeteners by infrared spectroscopy and HPAEC-PAD. Food Chem. 2015 Jan 15;167:349-57

[12]. Gergely Szakonyi, Romána Zelkó. The effect of water on the solid state characteristics of pharmaceutical excipients: Molecular mechanisms, measurement techniques, and quality aspects of final dosage form. Int J Pharm Investig. 2012 Jan-Mar; 2(1): 18–25.

[13]. Lopez, M. G., Mancilla, N. M., Mendoza, G. D. (2003), "Molecular Structure of Fructans from Agave tequilana Weber var. azul", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(27):7835-7840

[14]. Márquez-Aguirre AL, Camacho-Ruiz RM, Arriaga-Alba M, Padilla-Camberos E, Kirchmayr MR, Blasco JL, González-Avila M. Effects of Agave tequilana fructans with different degree of polymerization

profiles on the body weight, blood lipids and count of fecal Lactobacilli/Bifidobacteria in obese mice. Food Funct. 2013 Aug;4(8):1237-44.

[15]. Hernández-Moedano A., Moreno-Ramos E.F., Herrera-Rodríguez SE, González-Avila M. JCBPS; Section A: Food Biotechnogy; Special Issue; 30 Nov. 2014, Vol. 4, No. 5, 19-25.

ROLE OF SIRTUINS ON NAT1 AND NAT2 ENZYMATIC ACTIVITY

Eneida Turiján Espinoza[a,b*+], Raúl Alejandro Salazar [a,b], Rosa del Carmen Milán Segovia[b], Diana Patricia Portales Pérez[a].

[a] Laboratorio de Inmunología y Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Químicas. UASLP, San Luis Potosí, SLP, Mexico
[b] Laboratorio de Biofarmacia y Farmacocinética, Facultad de Ciencias Químicas, UASLP, San Luis Potosí, SLP, Mexico

*Autor que presentó.
+Autor para correspondencia: neyturijan@hotmail.com

Área del Conocimiento: Química Farmacéutica

ABSTRACT

The acetylation is the major route of biotransformation for several arylamine and hydrazine drugs. *N*-acetyltransferase (NAT) enzymes are responsible for metabolizing these drugs and are dependent of the disponibility of Acetyl-CoA in the cell. The acetyl group transferred to the acceptor substrate produces the enzymatic NAT desacetylation and in consequence its degradation. Some proteins are desacetylated in specific lysines by histone desacetylase enzyme like the sirtuins, which performes post-translational modifications. The similarities between NAT1 and NAT2 suggest that their enzymatic activity could be regulated by sirtuins. The aim of this study was evaluate the participation of sirtuins on the enzimatic activity of arylamine N-Acetyltransferases in mononuclear cells (CMN) of healthy subjects. The CMN were isolated from healthy subjects and NAT1, NAT2 and SIRT1 expression was detected with specific antibodies (Abcam Cambridge, MA) by Flow Cytometry. Cell culture was performed in the presence of different concentrations of NAT2 and NAT1 substrates; Isoniazid (INH) and p- aminobenzoic acid (PABA) respectively. The enzimatic activitiy of NATs were measured by chromatographic method (HPLC). The activity of sirtuins on NAT was analyzed in presence or absence of agonists and inhibitors of sirtuins. The results of positive cells were 90% NAT1, 56% NAT2 and 34% SIRT1 in a FACS Canto II (BD Science). It was performed, developed and validated a chromatographic method (HPLC) to measuring NAT1 and NAT2 activity in presence of PABA and INH in CMN (getting LD, LC, reproducibility and repetability). The NAT1 activity at 12h of culture in presence of 100 µM PABA was 30nM metabolite/min/million CMN. In contrast, the metabolizing activity of NAT2 was 180 nM metabolite/min/millon CMN in presence of 100µM of INH. **Conclusion.** The CMN of healthy subjects showed the presence of NAT1 and NAT2 activity. The expression and activity enzymatic of NAT1 and NAT2 may be evaluated in chronic inflammation conditions.

Keywords: N-acetyltransferase 1; N-acetyltransferaseacetiltransferasa 2; Sirtuins.

SYNTHESIS OF ANTI-INFLAMMATORY β-SITOSTEROL DERIVATES

(Síntesis de derivados anti-inflamatorios de β-Sitosterol)

Claudia Mariana Méndez González[a*+], Cristina Isabel Núñez Angeles[a]*, Juan Rodrigo Salazar[a].

[a] Facultad de Ciencias Quimicas, Universidad La Salle. Benjamin Franklin 47, Hipodromo Condesa, CP 06140, México City, México +52 (55)52789500 ext.2306

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: claumarmg090795@gmail.com

Área del Conocimiento: Química Farmacéutica.

ABSTRACT
i-NOS and COX-2 are enzymes that promotes inflammatory response against injury or infection. In some diseases the concentration and activities of those enzymes increased. Because the above, both enzymes are molecular targets for some drugs that can regulate the inflammatory response. Nowadays many natural products are being considered for the treatment of inflammatory diseases instead of traditional – toxic- synthetic drugs like β-sitosterol. Despite the low anti-inflammatory activity of this compound we decide to synthesize derivatives of β-sitosterol esterified with fatty acids at C3. The synthesis of β -sitosterol derivatives was performed by the esterification reaction at C3. This synthesis was carried out with different types of carboxylic acids using CDI as an coupling agent or by formation of the correspondent acyl chloride via reaction of the acid with oxalyl chloride.

Keywords: β-sitosterol; Anti-inflammatory; Fatty acids.

RESUMEN
i- NOS y COX- 2 son enzimas que promueven la respuesta inflamatoria frente a la lesión o infección. En algunas enfermedades, la concentración y las actividades de esas enzimas se incrementan. Debido a lo anterior, ambas enzimas son “blancos” moleculares para algunos medicamentos que pueden regular la respuesta inflamatoria. Hoy en día muchos productos naturales se están considerando para el tratamiento de enfermedades inflamatorias. A pesar de la baja actividad anti- inflamatoria de este compuesto decidimos sintetizar derivados de β-sitosterol esterificado con ácidos grasos en C3 porque su pudo comprobar que al hacer una esterificación con sus derivados, se comporta con una actividad anti-inflamatoria mayor. La síntesis de derivados de β-sitosterol se realizó mediante la reacción de esterificación en el C3. Esta síntesis se llevó a cabo con diferentes tipos de ácidos carboxílicos usando CDI como agente acoplante o por formación del cloruro de acilo correspondiente mediante la reacción del ácido con cloruro de oxalilo.

Palabras Clave: β-sitosterol; Anti-inflamatorio; Ácidos grasos.

INTRODUCCIÓN

El β-sitosterol es un compuesto perteneciente al grupo de los esteroles, que está presente en la mayoría de las plantas incluyendo aquellas que nos sirven de alimento. Se ha establecido que su papel en la célula vegetal es similar al colesterol en la célula animal, por lo que son constituyentes de las membranas celulares [1].

Sin embargo, a lo largo de los años se han encontrado diversos efectos biológicos que van desde la reducción de niveles plasmáticos de colesterol hasta propiedades antitumorales, incluyendo efectos anti-inflamatorios tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* [2].

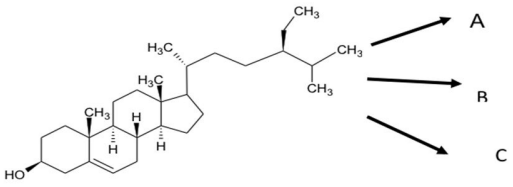
El interés en nuestro grupo es el de utilizar como materias primas, compuestos de origen natural que permitan la síntesis de nuevas y mejores moléculas anti-inflamatorias que puedan ser utilizadas en la terapia contra procesos inflamatorios crónicos, así como en la prevención de la carcinogénesis [3].

Debido a lo anterior decidimos realizar un estudio *in silico*, en el cual se realizó el docking de un set de moléculas esterificadas con ácidos grasos para a partir de éstos resultados, sintetizar moléculas más activas derivadas del β-sitosterol. [4]

METODOLOGÍA

Los productos de éster en la posición 3β parten de la síntesis del β-sitosterol, esta síntesis se realizó con varios ácidos carboxílicos utilizando CDI como agente acoplante que está involucrado en la formación de los esteres, siendo la reactividad de este agente (CDI) baja cual hace que se manipule fácilmente para estas reacciones, también se manejó cloruro de tionilo con ácidos grasos para dar el cloruro de acilo deseado y luego se le añadió el β-sitosterol en condiciones básicas.

Por otro lado, se formó el tosilato de β-sitosterilo mediante la reacción del β-sitosterol con Ts-Cl en Py.



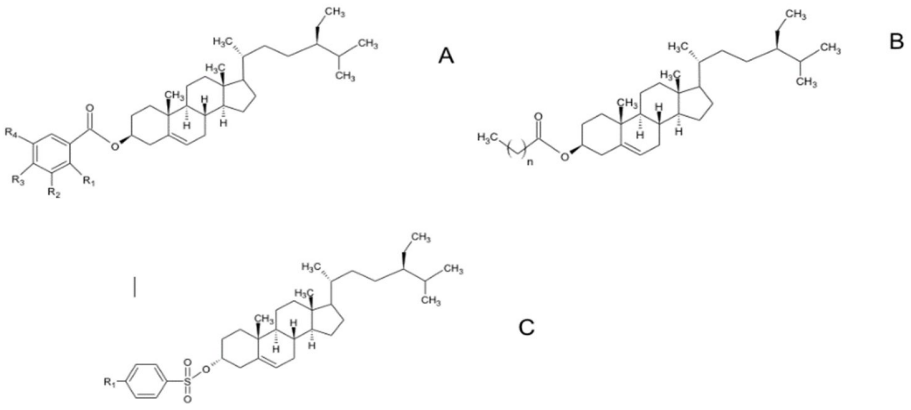


Figura 1. Diagrama de síntesis de los derivados de β-sitosterol.

1A= R_1=H, R_2=H, R_3=OH, R_4=H

2A= R_1=OH, R_2=H, R_3=H, R_4=OH

3A= R_1=OH, R_2=NO_2, R_3=H, R_4=NO_2

4A= R_1=OH, R_2=H, R_3=H, R_4=H

5A= R_1=H, R_2=OH, R_3=OH, R_4=OH

6A= R_1=NH_2, R_2=H, R_3=H, R_4=H

7A= R_1=H, R_2=H, R_3=OH, R_4=OH

1C= R_1= Me

1B= n= 12

2B= n= 10

3B= n= 8

4B= n= 16

-En estas moléculas se representa la reacción de esterificación de los diferentes compuestos que fueron utilizados con β-sitosterol, como lo es el Ts-Cl, y varios tipos de ácidos grasos.

RESULTADOS

Se realizó el estudio de docking utilizando las enzimas i-NOS y COX-2. Los resultados se muestran en las tablas 2 y 3. Como se puede observar, la esterificación de la molécula de β-sitosterol en la posición 3 del esqueleto del esterol, con residuos de ácidos grasos o residuos de ácidos fenólicos como el ferúlico o caféico mejora la actividad contra dichas enzimas. Con base en lo anterior, se sintetizaron un set de derivados del β-sitosterol para evaluarlos contra las enzímas específicas y en modelos in vivo de inflamación. En total se sintetizaron 15 compuestos. La caracterización parcial se realizó con IR-FT y los rendimientos estuvieron entre el 30 y 95 %. Con estos compuestos se realizarán los estudios antes mencionados.

Tabla 1: Resultados del estudio de docking realizado con los derivados del β-sitosterol contra la enzima i-NOS

i-NOS	
compuesto	Resultado
Miristato de Betasitoesterilo	-138.048
Antranilato de betasitoesteril	-130.723
Alfa epóxido de Betasitoester	-129.146
acetato de betasitoesterilo	-126.121
Betasitoesterol	-124.484
P-cumarato de Beatsitoesteril	-119.775
Caffeato de betasitoesterilo	-112.689
Estearato de Betasitoesterilo	-111.674

Tabla 2: Resultados del estudio de docking realizado con los derivados del β-sitosterol contra la enzima cox-2

COX-2	
compuesto	Resultado
beta epóxido de betasitoesterol	-110.6
Tosilato de Betasitoesterilo	-102.823
acetato de betasitoesterilo	-97.8439
Antranilato de betasitoesterilo	-95.6258
O-cumarato de Betasitoesterilo	-95.4708
Alfa epóxido de Betasitoesterol	-93.4591
Estearato de Betasitoesterilo	-92.8767
Miristato de Betasitoesterilo	-87.0408
Caffeato de betasitoesterilo	-77.3719
Betasitoesterol	-75.6088

CONCLUSIONES

Se sintetizaron los derivados del β-sitosterol de acuerdo con los resultados del estudio *in silico*. Estos compuestos se evaluarán en diferentes modelos de inflamación en la siguiente etapa de la investigación.

REFERENCIAS

[1]Nair, P. P., Turjman, N., Kessie, G., Calkins, B., Goodman, G. T., Davidovitz, H., & Nimmagadda, G. (1984). Diet, nutrition intake, and metabolism in populations at high and low risk for colon cancer. Dietary cholesterol, beta-sitosterol, and stigmasterol. *The American journal of clinical nutrition*, *40*(4), 927-930.

[2]Bouic, P. J. D., Etsebeth, S., Liebenberg, R. W., Albrecht, C. F., Pegel, K., & Van Jaarsveld, P. P. (1996). Beta-sitosterol and beta-sitosterol glucoside stimulate human peripheral blood lymphocyte proliferation: Implications for their use as an immunomodulatory vitamin combination. *International journal of immunopharmacology*, *18*(12), 693-700.

[3] Awad, A. B., Chen, Y. C., Fink, C. S., & Hennessey, T. (1995). beta-Sitosterol inhibits HT-29 human colon cancer cell growth and alters membrane lipids. *Anticancer research*, *16*(5A), 2797-2804.

[4]Sugano, M., Morioka, H., & Ikeda, I. (1977). A comparison of hypocholesterolemic activity of beta-sitosterol and beta-sitostanol in rats. *The Journal of nutrition*, *107*(11), 2011-2019.

ANTI-TUMOR EFFECT OF THE 3α-OH MASTICADIENOIC ACID IN PROSTATE CANCER XENOGRAFTS, BY INHIBITION OF PROLIFERATION MARKERS AND APOPTOSIS INDUCTION

(Efecto anti-tumoral del ácido 3α-OH masticadienoico en xenotransplantes de cáncer de próstata, por la inhibición de marcadores de proliferación e inducción de apoptosis)

Ma. Beatriz Sánchez-Monroy[a*+], Alejandro Zentella-Dehesa[b], Nadia J. Jacobo Herrera[b], Beatriz Hernández Téllez[c], Mariano Martínez-Vázquez[a]

[a]Instituto de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Coyoacán C.P. 04510, México, D.F.
[b]Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Vasco de Quiroga 15, Sección XVI, C.P. 1400, México, D.F.
[c]Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México. Circuito interior, Ciudad Universitaria, Coyoacán C.P. 04510, México, D.F.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: beatriz.sanchez@ciencias.unam.mx, marvaz@unam.mx

Área del Conocimiento: Química de Productos Naturales.

ABSTRACT
The tetracyclic triterpenes are a group of plant secondary metabolites with therapeutic potential for cancer treatment. In recent works it has been demonstrated, that some triterpenes inhibit human cancer cell proliferation *in vitro* and tumor growth *in vivo*. The 3α-OH masticadienoic acid (3α-OH AMD) is a tetracyclic triterpene isolated from *Amphipterygium adstringens*. In previous studies, 3α-OH AMD resulted as an excellent anti-inflammatory agent and also inhibitor of proliferation cell in several human cancer cell lines such as; HCT-15 (colon), MCF-7 (breast), U-251 (CNS), PC-3 (prostate), K-562 (leukaemia), HeLa (cervix), HepG2 (liver) and A-431 (epidermoid carcinoma). However, despite of investigations on the biological effects of 3α-OH AMD, no research on anti-tumor effect has been carried out so far. The aims of this work were firstly the isolation of 3α-OH AMD and subsequently the analysis of anti-tumor activity in a xenograft mouse model. In addition, we investigated the anti-proliferative effect and apoptosis induction by 3α-OH AMD in the tumor cells. The proliferation markers (PCNA and Ki67) were evaluated by immunohistochemistry analysis, and DNA-fragmentation by TUNEL assay. We demonstrated that 3α-OH AMD inhibits tumor growth *in vivo*; by down-regulation of proliferation markers. Moreover, this triterpene induces apoptosis in xenografts of prostate carcinoma. Collectively, our results suggest that the anti-tumor mechanism of 3α-OH AMD involve multiple molecular targets related to cell proliferation and apoptosis pathways.

Keywords: 3α-masticadienoic acid, xenografts, anti-proliferative effect, apoptosis.

RESUMEN
Los triterpenos tetracíclicos son un grupo de metabolitos secundarios con potencial terapéutico para el tratamiento del cáncer. En trabajos recientes se ha demostrado, que algunos triterpenos inhiben la

proliferación de células tumorales *in vitro* e *in vivo* disminuyen el crecimiento tumoral. El ácido 3α-OH masticadienoico (3α-OH AMD) es un triterpeno tetracíclico aislado de *Amphipterygium adstringens*. En estudios previos, el 3α-OH AMD resultó como un excelente agente anti-inflamatorio y también inhibidor de la proliferación celular de varias líneas celulares de cáncer humano tales como; HCT-15 (colon), MCF-7 (mama), U-251 (CNS), PC-3 (próstata), K-562 (leucemia), HeLa (cérvix), HepG2 (hígado) y A-431 (carcinoma epidermoide). Sin embargo, a pesar de las investigaciones sobre los efectos biológicos del 3α-OH AMD, hasta ahora no hay investigaciones sobre su efecto anti-tumoral.
Los objetivos de este trabajo fueron primeramente el aislamiento del 3α-OH AMD y subsecuentemente el análisis de la actividad anti-tumoral en un modelo murino de xenotransplantes. Además, se investigó el efecto anti-proliferativo e inducción de apoptosis por el 3α-OH AMD en las células tumorales. Los marcadores de proliferación (PCNA y Ki67) se evaluaron por análisis inmunohistoquímico y la fragmentación del ADN mediante el ensayo de TUNEL. Nosotros demostramos que el 3α-OH AMD inhibe el crecimiento tumoral *in vivo;* por una regulación negativa de marcadores de proliferación. Por otra parte, este triterpeno induce apoptosis en xenotransplantes de carcinoma de próstata. En conjunto, nuestros resultados sugieren que el mecanismo anti-tumoral del ácido 3α-OH AMD involucra múltiples blancos moleculares relacionados a proliferación celular y vías de apoptosis.

Palabras Clave: ácido 3α-OH masticadienoico, xenotransplantes, efecto anti-proliferativo, apoptosis.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de próstata (CaP) es la segunda causa de muerte por cáncer en hombres, con un estimado de 27, 540 muertes a nivel mundial, en el año 2015 [1]. Sin embargo, en México CaP es la primera causa de muerte por cáncer en varones. Un estudio sobre diagnóstico de los cinco tipos de cáncer del aparato genitourinario demostró que el CaP presenta mayor incidencia [2].

El tratamiento estándar para el CaP uncluye cirugía, radiación, vigilancia activa y terapia anti-androgénica. Aunque, estos enfoques inicialmente son efectivos, del 25 al 40% de los pacientes progresan a una etapa avanzada [3]. La mayoría de los pacientes en esta etapa recibe quimioterapia (50 a 70%), aumentando la sobrevivencia, sin embargo, el tratamiento no es curativo [4]. Es por ello que surge la necesidad de investigar tratamientos más efectivos dirigidos a estadios avanzados de la enfermedad.

Las especies vegetales son una de las fuentes que se pueden explorar en la búsqueda de nuevos fármacos anti-tumorales. Por ejemplo, un estudio realizado desde 1981 a 2010 indica que el 48.6% de los fármacos aprobados por la Food and Drug Administration (FDA) son productos naturales o derivados éstos [5]. Las investigaciones realizadas en fase preclínica demuestran que algunos triterpenos inhiben la proliferación de varias líneas celulares de cáncer humano e *in vivo* disminuyen el crecimiento de xenotransplantes en modelos murinos [6, 7].

El ácido 3α-OH masticadienoico es uno de los principales triterpenos aislados de *Amphipterygium adstringens* Schiede Schlecht (Cuachalalate), un árbol medicinal que destaca por su uso tradicional como posible adyuvante en el tratamiento en cáncer gastrointestinal y úlceras gástricas [8]. Previamente, se han investigado *in vitro* las propiedades anti-tumorales del ácido 3α-OH masticadienoico [9, 10]. Con

base a estos antecedentes, en este trabajo se analizó el efecto anti-tumoral *in vivo* del ácido 3α-OH AMD, igualmente se investigó su efecto anti-proliferativo e inducción de apoptosis en xenotransplantes de carcinoma de próstata.

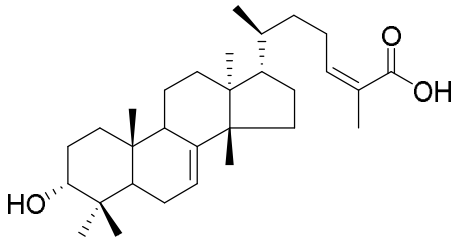


Figura 1. Estructura química del ácido 3α-OH masticadienoico.

METODOLOGÍA

Aislamiento del ácido 3α-OH masticadienoico

El material vegetal (corteza de *A. adstringens)* se colectó en el estado de Morelos, en el mes de enero de 2012. La corteza se cortó en secciones pequeñas (2 cm), las cuales se colocaron en 5 matraces y se realizó la maceración con acetato de etilo (AcOEt) de 3 a 4 veces con ciclos de 48 horas cada uno; a temperatura ambiente. El disolvente se eliminó por destilación a presión reducida para obtener los extractos crudos. El extracto de acetato de etilo (residuo verde oscuro) se separó por Cromatografía en Columna (CC) a presión reducida, utilizando gel de sílice 60 (mesh 230-400 ASTM) de Merck® en una columna de vidrio. El proceso de purificación se monitoreó por CCF en placas de gel de sílice con indicador de luz UV y como revelador una disolución de sulfato cérico. Se reunieron las muestras con comportamiento similar en CCF y se obtuvieron cinco fracciones principales (F1-F5). Las fracciones de la F2 a F4 se purificaron por recristalización por el método de disolventes pares seguido de una filtración. El filtrado se lavó con una mezcla hexano-acetato de etilo (4:1), obteniendo el ácido 3α-OH AMD como un sólido blanco amorfo. La pureza del triterpeno fue determinada por análisis de Cromatografía de Líquidos de alta Resolución (HPLC) bajo las siguientes condiciones; una columna Zorbax Eclipse Plus C-18, fase móvil MeOH/Agua (4:1), el tiempo de corrida fue de 15 minutos a un flujo de flujo 0.2 mL/min., la medición de UV fue a 240 nm

Ensayo de xenotransplantes de células PC-3 en ratones desnudos (nu/nu)

El ensayo de xenotransplantes se desarrolló conforme a los descrito por Estrada, cols. En 2010 con algunas modificaciones. Se utilizaron 18 ratones machos de la cepa nu/nu, de 4 a 6 semanas de edad, cuyo peso promedio fue 25 g. Los animales se inocularon con una suspensión celular de 3 $x10^6$ células PC-3/100 µL de medio blanco, por vía subcutánea. Entre dos y tres semanas después, cuando los tumores alcanzaron un volumen tumoral entre 40-100 mm^3, los ratones se agruparon al azar en tres grupos con 6 ratones cada uno. Los grupos de tratamiento se organizaron de la siguiente forma: el control negativo fue administrado sólo con el vehículo. El control positivo, con el fármaco de referencia (*cis*-diaminodicloro platino II, 4 mg/kg), el grupo restante recibió como tratamiento con ácido 3α-OH AMD (125 mg/kg). El esquema de tratamiento fue una sola dosis cada semana, por vía intraperitoneal.

Se monitorearon los diámetros menor y mayor del tumor y el peso de los animales durante tres semanas. Las medidas del tumor se tomaron con un calibrador Vernier y el volumen tumoral se calculó con la siguiente fórmula: $V = 4/3\pi \times (\text{diámetro mayor} \times [\text{diámetro menor}]^2)$.
Al término del ensayo, los ratones se sacrificaron y se hizo disección de los tumores los cuales se conservaron a -70°C en dos condiciones: una muestra en solución reguladora de lisis más inhibidor de proteasas y otra en trizol®. Adicionalmente, una muestra se conserva en formol al 10% en PBS (solución reguladora de fosfatos).

Detección de proliferación celular por inmunohistoquímica en xenotransplantes de carcinoma de próstata.

Los tejidos tumorales se extrajeron por disección y se fijaron en formaldehído 10%. Posteriormente fueron deshidratados y embebidos en parafina para el análisis histológico e inmunohostoquímico. Se obtuvieron cortes seriados de 4 µm. Los cortes se colocaron sobre portaobjetos cargados con poli-L-lisina (0.1%), se desparafinaron a 56-60 °C por 30 minutos y un gradiente desde xilol, etanol (100, 90, 80 y 70%), agua destilada y solución amortiguadora de fosfatos (PBS). Las muestras se trataron con una disolución de H_2O_2 al 30%, durante 10 minutos a temperatura ambiente; para inactivar la peroxidasa endógena. Los cortes fueron tratados con amortiguador de citratos a pH = 6 con el objetivo de hacer re-expresión de antígenos. Después de tres lavados con disolución amortiguadora de fosfatos (PBS) las secciones se bloquearon con una disolución al 5% de albúmina sérica bovina por 10 minutos a temperatura ambiente. Las muestras fueron incubadas con el anticuerpo primario PCNA (1:200) o Ki-67 (1:100), durante 12 horas a 4 °C y lavadas con PBS. Después, los cortes fueron incubados con el anticuerpo secundario biotinilado por 60 minutos a 37°C y tres lavados con PBS. Finalmente, se incubaron con el complejo estreptavidina-peroxidasa (1:1000) por 30 minutos a 37 °C. Los productos inmunoreactivos fueron identificados mediante una reacción con 3, 3-diaminebencidina (DAB) y una contratinción con hematoxilina. Los controles negativos se trabajaron con albúmina en lugar de anticuerpos primarios. Las muestras se montaron en resina y se analizaron al miscrocopio óptico (Nikon Eclipse 80i).

Detección de apoptosis mediante la técnica de TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labelling).

Las células apoptóticas se detectaron en los tejidos tumorales utilizando el kit de detección *in situ* Promega®) kit (G7131) y las muestras se analizaron de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Los cortes de 4 µ se desparafinaron y rehidrataron igual que en el análisis hecho por inmunohistoquímica. Después, los cortes se incubaron con proteinasa K (1:500) por 15 minutos a temperatura ambiente. Las muestras fueron incubadas con la mezcla de reacción, que consiste en la nucleotidil transferasa terminal (rTdT) y los nucleótidos biotinilados (dUTPs) por 30 minutos a 37 °C. Igualmente las muestras fueron incubadas con el complejo estreptavidina peroxidasa durante 30 minutos a 37 °C. Las señales apoptóticas fueron visualizadas por una reacción con DAB y una contratinción con hematoxilina seguido de tres lavados con agua destilada. Los controles negativos se prepararon sin rTdT, sólo con la mezcla de nucleótidos, "buffer" de equilibrio y agua desionizada. Las muestras se montaron en resina y se analizaron al miscrocopio óptico (Nikon Eclipse 80i).

Análisis de las fotomicrografías

Las fotomicrografías se capturaron con el microscopio Nikon Eclipse 80i acoplado a una cámara Nikon DS-U2 usando un software de adquisición de imágenes (Image Pro Plus). Las imágenes se digitalizaron a 2560 × 1920 pixeles a 20x y 40x, se analizaron aquellas tomadas a 40x en formato TIF. El análisis se realizó en el software Image-Pro Plus 7.0 (Media Cybernetics) utilizando el modelo tonalidad, saturación e intensidad (HSI) como se describe en el manual de procedimientos. Primero se hizo una calibración espacial de 50 µ en el software Image-Pro Plus 7.0 (Media Cybernetics) y posteriormente se definió un rango de color correspondiente a la señal inmunohistoquímica mediante una calibración de densidad óptica. Para una mejor representación de los datos se tomaron 10 fotomicrografías al azar de cada grupo experimental. El color café en las imágenes fue reconocido como la marca positiva a la inmunotinción y se cuantificó como la suma de las áreas y densidad óptica integrada (IOD) para las imágenes de TUNEL. Para las fotomicrografías correspondientes a Ki67 y PCNA se determinó el número de objetos (corresponde al número de células positivas).

Análisis estadístico

Los datos de volumen tumoral y peso corporal se reportan como el promedio ± DE (desviación estándar) en el experimento de xenotransplantes. Los valores de área e IOD se reportan como el promedio ± DE. Las comparaciones entre los grupos tratados y el control (sin tratamiento) se hicieron mediante las siguientes pruebas estadísticas: Kolmogorov-Sminnov para determinar la distribución de los datos. Aquellos datos que mostraron una distribución normal se analizaron por un análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de una prueba de comparación múltiple (Tukey) para determinar las diferencias estadísticas, los grupos se consideraron diferentes cuando los valores de $p < 0.05$. En tanto que, si los datos mostraron una distribución no normal se analizaron mediante ANOVA de Kruskal-Wallis seguida de una prueba de comparación múltiple (Dunn).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El objetivo de nuestro estudio fue investigar el efecto anti-tumoral del ácido 3α-OH AMD en xenotransplantes de células PC-3 (carcinoma prostático). Los resultados demuestran que el ácido después de ser administrado en ratones nu/nu con tumores pre-establecidos inhibe el crecimiento tumoral (Tabla 1). En estas condiciones de trabajo, el compuesto mostró un efecto similar al fármaco de referencia, cisplatino (*cis*-diaminodicloro platino II, 4 mg/kg). El ácido 3α-OH AMD inhibió el 80% del crecimiento de los tumores mientras que el cisplatino inhibió 90%.

El efecto anti-tumoral del 3α-OH AMD aumenta mientras transcurre el tiempo, es decir a la primera semana de tratamiento inhibe 55% mientras que a la tercera semana inhibió 81%.

Tabla 1. *Actividad anti-tumoral del ácido 3α-OH masticadienoico*

Tiempo	Semana 0	Semana 1	Semana 2	Semana 3
Tratamiento	Volumen tumoral (mm^3)			
Control (sin tratamiento)	*47.32±9.66	276.70 ± 61.65	1014.40 ± 217.30	2995.52 ± 440.60
Cisplatino (4 mg/kg)	*46.20±6.70	82.23 ± 4.10 (70%)	146.50 ± 6.40 (86%)	307.50 ± 67.80 (90%)
Ácido 3α-OH masticadienoico (125 mg/kg)	*63.95±11.49	123.37±32.99 (55%)	284.94 ± 54.75 (72%)	563.25± 154.53 (81%)

*Inicio del tratamiento

Se monitoreo el peso corporal con la finalidad de detectar algún signo de toxicidad. En los resultados se observa que disminuye el peso corporal tanto en el grupo control (disminuyen 2 g) como en los individuos que recibieron tratamiento con cisplatino (disminuyen 4 g). Sin embargo, el grupo tratado con ácido 3α-OH masticadienoico mantienen o incrementan su peso (figura 2).

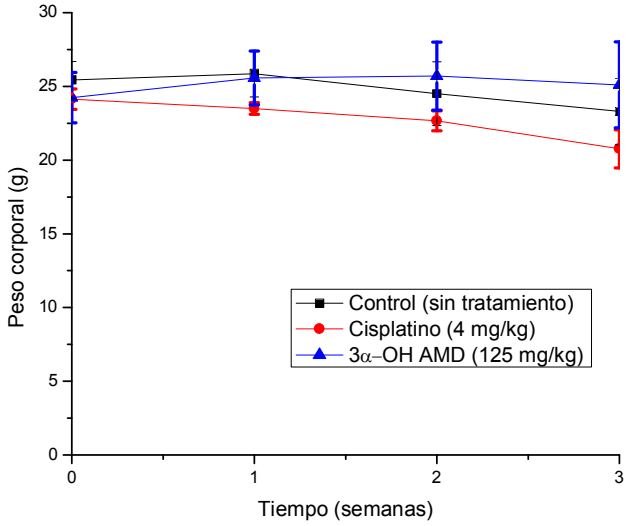


Figura 2. Peso corporal de los ratones tratados con ácido 3α-OH masticadienoico.

Con el objetivo de conocer el índice de proliferación celular se llevó a cabo la detección de los marcadores Ki67 y PCNA mediante un análisis de inmunohistoquímica, después del análisis de las

fotomicrografías tomadas a 40x (datos no mostrados) los resultados se muestran como los valores promedio ± DE del número de células positivas (Tabla 2). Los resultados demuestran el efecto anti-proliferativo del ácido 3α-OH AMD debido a que disminuyó el 55.24% de células positivas a Ki67 respecto al grupo control. Mientras que las células positivas a PCNA disminuyeron 48.16% esto sugiere que las células dejaron de duplicarse en todas las fases del ciclo celular ya que Ki67 se expresa preferentemente en las fases G1, G2, S y la mitosis [11] en tanto que, PCNA se expresa en las fases G1 y S [12].

Tabla 2. Células positivas en inmunotinciones específicas para Ki67 y PCNA.

Tratamiento	Ki67	PCNA
Control (sin tratamiento)	198.85±8.80	185.22±16.80
Cisplatino 4 mg/kg	133.0±10.70	161.33±8.30
Ácido 3α-OH AMD (125 mg/kg)	89.0±9.90	96.0±9.83

La fragmentación del ADN es una característica de la apoptosis. En este ensayo se utiliza la transferasa terminal (rTdT) que añade nucleótidos (dUTPs) marcados con biotina a los extremos 3' libres en el ADN, lo que permite detectar la fragmentación del ADN producida en la muerte por apoptosis. La biotina es un sustrato del complejo HRP y el revelado para evidenciar la marca se hace mediante una reacción con diaminobenzidina (DAB), un sustrato cromogénico [13]. A través de este método se investigó la muerte por apoptosis en los tejidos tumorales. Los resultados sugieren que el compuesto 3α-OH AMD induce muerte por apoptosis; ya que después del análisis cuantitativo de las fotomicrografías (datos no mostrados) obtenidas de los cortes se observó que tanto el área como la IOD de los cortes correspondientes a ratones tratados con 125 mg/kg de 3α-OH AMD son mayores respecto al control, sin tratamiento (Tabla 3). Estos resultados son concordantes con los ensayos *in vitro* realizados por Dalla L. y cols. En 2012.

Tabla 3. Resultados de las áreas y la IOD medidas en las fotomicrografías de la detección de apoptosis por TUNEL.

Tratamiento	Área (μ^2)	IOD (pixeles/ μ^2)
Control (sin tratamiento)	5485.35±797.04	1.50±0.40
Cisplatino (4 mg/kg)	6122.97±274.31	7.768±0.65
Ácido 3α-OH AMD (125 mg/kg)	9862.87±601.46	12.90±1.72

CONCLUSIONES

En conjunto nuestros resultados demuestran el efecto anti-tumoral del ácido 3α-OH masticadienoico, asociado a su efecto anti-proliferativo y a su capacidad de inducir muerte por apoptosis.

AGRADECIMIENTOS

Ma. Beatriz Sánchez Monroy agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (proyecto 152650) por el apoyo financiero y Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por el apoyo académico.

REFERENCIAS

[1] L. Siegel, R. *et al*. (2015), "Cancer Statistics 2015", CA Cancer J Clin. 65(1): 5-29.

[2] Aragón, A. R. *et al.* (2011), "Panorama epidemiológico del cáncer genitourinario en la Zona Norte Noreste de México", Rev Mex Urol, 71 (suplemento 3): 7-10.

[3] Heidenreich, A. *et al*. (2008), "EAU Guidelines on Prostate Cancer", European Urology, 53: 68-80.

[4] *Masters G. A. et al.* (2015), "Clinical Cancer Advances 2015: Annual Report on Progress Against Cancer From the American Society of Clinical Oncology", J. Clin. Oncol. 33: 1-24.

[5] Newman, D.J and Cragg G. M. (2012), "Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010", *J Nat Prod.,* 75(3): 311-35.

[6] Zhang, W. and Men X. (2014), "Review on anti‑tumor effect of triterpene acid compounds". *J. of* Cancer Res. and Therap. 10: C14-C19.

[7] Yadav, R. *et al*. (2012), "Boswellic acid inhibits growth and metastasis of human colorectal cancer in orthotopic mouse model by downregulating inflammatory, proliferative, invasive and angiogenic biomarkers", Int. J. Cancer, 130: 2176–2184

[8] Olivera, A. G. et al. (1999), "Phytochemical study of cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*, Schiede ex Schlecht)", J. of Ethnopharm. 68: 109–113.

[9] Oviedo, I. *et al*. (2005), "Cytotoxic activity and effect on nitric oxide production of tirucallane-type triterpenes". J. Pharmacy and Pharmacology. 57: 1087-1091.

[10] Dalla, L. *et al*. (2012), "3α-Hydroxymasticadienonic Acid As an Antiproliferative Agent That Impairs Mitochondrial Functions", J. Nat. Prod. 75 (4): pp 557–562.

[11] Gong P, *et al*. (2013), "New Insight into Ki67 Expression at the Invasive Front in Breast Cancer".,PLoS ONE 8(1): e54912.

[12] Stoimenov I. and Helleday T., (2009), **"**PCNA on the crossroad of cancer", Biochem. Soc. Trans., 37(3): 605-613.

[13] Watanabe T., (1997). "Apoptosis induced by glufosinate ammonium in the neuroepithelium of developing mouse embryos in culture", Neuroscience Letters, 222: 17-20.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

EXTRACTION, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF CHLOROPHYLL A OF THE CYANOBACTERIUM *Arthrospira platensis*: A SIMPLE PROPOSAL, WITH LOW COST AND HIGH YIELDS

(Extracción, purificación y caracterización de la clorofila A de la cianobacteria *Arthrospira platensis:* una propuesta simple, de bajo costo y con altos rendimientos)

Brenda Gisella Curiel Olague[a]*, Margarita Cid Hernández[a], Raúl Ricardo Quiñones López[a], Sandra Fabiola Velasco Ramírez[a+], Fermín Paul Pacheco Moisés[a], Fernando Antonio López Dellamary Toral[b], Ricardo Manríquez González[b], María Judith Sánchez Peña[a], Luis Javier González Ortiz[a], Ana Cristina Ramírez Anguiano[a].

[a] Departamento de Química, Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Universidad de Guadalajara, Blvd. Marcelino García Barragán #1421, esq Calzada Olímpica, C.P. 44430, Guadalajara, Jalisco, México.
[b] Departamento de Madera, Celulosa y Papel, Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Universidad de Guadalajara, Km. 15.5 Carretera Guadalajara-Nogales, Las Agujas, Zapopan, Jalisco, México.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: sfqfb30@gmail.com

Área del Conocimiento: Química de Productos Naturales.

ABSTRACT
Chlorophylls and their derivatives are an important class of organic pigments with potential applications in pharmaceutical, cosmetics and many other fields; they are considered great candidates for use as photoinactivating antimicrobial agents thanks to their structural malleability, photophysical and photobiological properties, and their high level of functionalization. There are several methods used for the extraction of chlorophylls; however, in some cases the method is expensive, making the isolation and purification process uneconomic, and coupled with this, sometimes chlorophyll it is not removed completely pure and is accompanied with other remnants. Therefore, the purpose of this study is focused on proposing an alternative methodology to optimize the extraction, purification and characterization of chlorophyll A. *Arthrospira platensis* is a cyanobacterium that we used to extract chlorophyll A, using the technique of Thin Layer Chromatography (TLC) with a mobile phase consisting of ethyl acetate, ammonium hydroxide and isopropyl alcohol, that probes it is an efficient and selective form for the isolation and purification of chlorophyll A. Also we confirm purity and presence of chlorophyll A of the sample by the following methods: UV-Visible Spectroscopy (UV-VIS), Infrared Spectroscopy (IR), Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and Gas Chromatography-Mass Spectroscopy (GC-MS). These results show an efficient and selective extraction, isolation and purification of chlorophyll A. Therefore, this methodology is appropriate and a simplified proposal that provides a new low-cost and high-performance extraction, purification and characterization of chlorophyll A from *Arthrospira platensis*.

Keywords: *Arthrospira platensis*; chlorophyll; TLC; UV-VIS.

RESUMEN
Las clorofilas y sus derivados representan una clase importante de pigmentos orgánicos con posibles aplicaciones en la industria farmacéutica, cosmética y varios otros campos; muy en particular son considerados buenos candidatos para utilizarlos como agentes fotoinactivantes antimicrobianos gracias a su maleabilidad estructural, sus propiedades fotofísicas, fotobiológicas y su alto nivel de funcionalización. Existen diversos métodos utilizados para la separación de clorofilas, sin embargo, en algunos casos, los costos resultan elevados, haciendo que el proceso de aislamiento y purificación sea poco rentable y aunado a esto, en algunas ocasiones, no es extraída la clorofila completamente pura y es acompañada con otros remanentes. Por lo que, el objetivo del estudio se centró en proponer una metodología diferente para optimizar la extracción, purificación y caracterización de la clorofila A. La cianobacteria *Arthrospira platensis* fue utilizada para extraer la clorofila A, utilizando la técnica de Cromatografía de Capa Fina (TLC) usando una fase móvil conformada por acetato de etilo, hidróxido de amonio y alcohol isopropílico, la cual resultó eficiente y selectiva para el aislamiento y purificación de la clorofila A. Por otro lado, para corroborar la pureza y presencia de la clorofila A, la muestra fue evaluada mediante los siguientes métodos: Espectroscopía Ultravioleta-Visible (UV-VIS), Espectroscopía por Infrarrojo (IR), Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y Cromatografía de Gases-Espectroscopía de Masas (SM-GC). Los resultados obtenidos mostraron una extracción eficiente y selectiva para el aislamiento y purificación de la Clorofila A. Por lo que, esta metodología resultó adecuada y brinda una nueva propuesta simple de bajo costo y con alto rendimiento para la extracción, purificación y caracterización de la clorofila A procedente de *Arthrospira platensis*.

Palabras Clave: *Arthrospira platensis*; clorofila; TLC; UV-VIS.

INTRODUCCIÓN

La creciente emergencia de resistencia antibiótica ante microorganismos ha llevado a la búsqueda de terapias antimicrobianas alternativas para las cuales la bacteria no sea capaz de desarrollar resistencia fácilmente, siendo la Fotoinactivación (FI) una de las técnicas más prometedoras que combina la acción de un agente fotosensibilizante y la luz visible para el control de infecciones bacterianas [1,2].

La fotoinactivación bacteriana se ha empleado especialmente en la erradicación de biopelículas presentes en placas dentales, implantes orales y prótesis, y se ha propuesto su uso en catéteres colonizados. También algunos agentes fotosensibilizantes (AFS) han sido clínicamente aprobados y aplicados para el tratamiento local de enfermedades tales como cáncer y lesiones infectadas [1,3].

Las ventajas que ofrece la FI frente a otro tratamientos son: a) no produce efectos adversos sistemáticos; b) al ser una técnica no invasiva, después del tratamiento se obtiene una minimización de las cicatrices; c) puede combinarse con la cirugía para obtener resultados exitosos en el tratamiento; d) especificidad en el tejido a tratar; e) puede utilizarse como terapia paliativa [4].

La FI es un procedimiento de dos etapas que requiere 3 elementos: fotosensibilizador, luz y oxígeno. El AFS seleccionado debe poseer características particulares, tales como ser biológicamente estable, mínimamente tóxico para los tejidos sanos, fotoquímicamente eficiente y en resonancia con la longitud de onda emitida por la fuente de luz [3].

Tras la irradiación con luz de una longitud de onda específica experimenta una transición desde un estado de baja energía aun estado singulete excitado. El AFS en estado triplete puede reaccionar con biomoléculas en dos vías diferentes: de tipo I y II, puede reaccionar directamente entre el estado excitado del AFS con el sustrato biológico a través de los procesos de transferencia de hidrógeno o electrones, donde las especies de radicales libres son generalmente altamente reactivas e interactúan con el oxígeno molecular para producir especies altamente reactivas de oxígeno, tales como superóxido, radicales hidroxilo y peróxido de hidrógeno, que son perjudiciales para la integridad de la membrana celular, causando daños biológicos irreparables (tipo I), y el agente fotosensibilizante en estado triplete reacciona con el oxígeno para producir un estado electrónicamente excitado y altamente reactivo del oxígeno, conocida como oxígeno singulete que puede interactuar con un gran número de sustratos biológicos que inducen daño oxidativo en la membrana de la célula y la pared celular. Los microorganismos que son destruidos por el oxígeno singulete incluyen virus, bacterias y hongos. El oxígeno singulete tiene una corta vida en los sistemas biológicos y un radio muy corto de acción (0.02 m). Por lo tanto, la reacción tiene lugar dentro de un espacio limitado, lo que lleva a una respuesta localizada; lo que es ideal para la aplicación de los sitios localizados sin afectar las células distantes u órganos. Así, la reacción de tipo II se acepta como la principal vía de daño celular microbiana [5].

Los agentes fotosensibilizantes pueden ser naturales o de síntesis artificial y pueden clasificarse atendiendo a su estructura central básica: Naturales como a) las Porfirinas, derivados y precursores; y b) las Clorofilas y derivados [6]. Algunos AFI se pueden preparar fácilmente por semi-síntesis utilizando abundantes materiales de partida natural, como las clorofilas. El uso de pigmentos naturales es muy recomendable, y una de las principales razones es su menor costo en comparación con agentes sintéticos [1].

Las cianobacterias *Arthrospira platensis* son organismos desprovistos de membrana nuclear y mitocondrias, difieren de otras procariotas en la composición de ácidos grasos, ya que presentan ácidos grasos no saturados con dos o más dobles enlaces. Poseen solamente clorofila-a y un fotosistema II (PS-II). Este fotosistema así como los pigmentos fotosintéticos, los pigmentos accesorios y los componentes del transporte de electrones están incluidos en los tilacoides (sistemas membranosos fotosintéticos). [7].

Arthrospira platensis es una cianobacteria filamentosa no diferenciada, habitante de lagos alcalinos. En los últimos años, se le han atribuido diversos efectos positivos en el tratamiento de algunos tipos de alergias, anemia, cáncer, enfermedades virales y cardiovasculares. Muchas de sus propiedades son consecuencia de la presencia de pigmentos como las ficobiliproteínas y los carotenoides, así como de otros compuestos como polisacáridos, ácidos grasos (destacando el ácido gama linoleico), proteínas, vitaminas y minerales [8].

Las clorofilas se pueden utilizar como materiales de partida para la síntesis de clorinas funcionalizadas, ya que algunos grupos farmacofóricos pueden introducirse para mejorar la fotoinactivación. Las clorofilas constituyen plantillas útiles para su uso como fotosensibilizador teniendo en cuenta sus propiedades fotofísicas, fotobiológicas y su alto nivel de funcionalización que permite transformaciones. Los derivados de clorofila son buenos candidatos para la fotoinactivación, porque tienen una mejor selectividad en comparación con los microorganismos, especialmente en condiciones de poco tiempo de incubación [1].

METODOLOGÍA

Obtención del extracto

Se pesó 25 g de la cianobacteria *Arthrospira platensis* liofilizada, se colocó en un mortero para obtener un polvo fino, enseguida se mezcló con metanol en una proporción 1:10, y se almacenó en frasco color ámbar para proteger la solución de la luz. Posteriormente, se agitó durante 21 días para obtener una solución homogénea, se filtró y se separó la solución; el remanente se sometió de nuevo al mismo tratamiento de agitación y filtración. Ambas soluciones obtenidas se llevaron a concentración en rotaevaporador con un baño de agua de 40 °C, hasta que se redujo su volumen a 1/3 de la solución inicial. Seguidamente, se llevó a almacenamiento a oscuridad en refrigeración a 4 ° C.

Método de separación por Cromatografía en capa fina

Se utilizaron placas de vidrio de 20 x 20 cm con 500 micras de espesor con gel de sílice con UV-254, se agregó el extracto con un tubo microcapilar y se colocó de forma continua en la placa a unos 2 cm por encima del borde. Los solventes utilizados fueron: acetato de etilo, hidróxido de amonio y alcohol isopropílico [9]. Posteriormente, cada placa se colocó en una cámara de cromatográfica saturada con los disolventes añadidos por un tiempo de 1 h 20 min. Después, se secó la placa a temperatura ambiente, para observar las bandas a luz visible y ultravioleta; por lo que, se raspó la gel de sílice para obtener la banda de clorofila A y se colectó en un tubo limpio protegido de la luz. Enseguida, se resuspendió con 6 mL de metanol absoluto para su filtración, y por último, se almacenó la solución filtrada protegida de la luz a temperatura ambiente.

La muestra obtenida de clorofila se analizó por los siguientes métodos: Espectrofotometría Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR), Espectroscopía Ultravioleta (UV-VIS), Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y Cromatografía de Gases-Espectrofotometría de Masas (GC-MS).

Preparación de la muestra para analizarla por Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR):

A 10 mg de clorofila A se llevaron a sequedad con N_2 y se les realizó el análisis de Espectroscopía Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR) en un equipo Perkin Elmer modelo spectrum one de un rango de 4000 a 600 número de ondas (cm -1).

Preparación de la muestra para analizarla por Espectrofotometría Ultravioleta-Visible (UV-VIS)

Una muestra de 20 mg de clorofila A se disolvió en 3 mL de Metanol y posteriormente, se lee la muestra en el aparato de Espectroscopía UV-VIS, Lambda EZ 150, Perkin Elmer en un rango de 400 a 730 nm en intervalos de 10 nm para después construir un espectro con las absorbancias que se registren.

Preparación de la muestra para analizarla por Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Se colocó 10 mg de clorofila A en un tubo de RMN de líquidos, se disolvió con Cloroformo deuterado (CDCl3) y se introdujo al imán, en el equipo de Resonancia Magnética Nuclear de 600 MHz (JEOL ECA 600 operando a frecuencias de 150.86 MHz para ^{13}C bajo un campo magnético de 14 Teslas).

RESULTADOS

Espectroscopia Infrarroja con Trasformada de Fourier

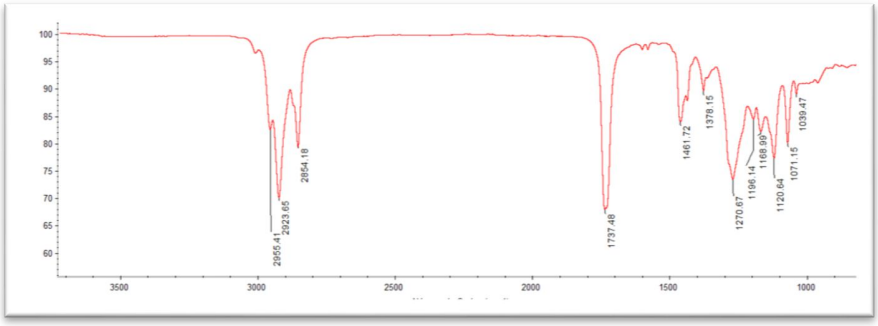


Figura 1.- Espectroscopía Infrarroja con Trasformada de Fourier (% Trasmitancia vs. Número de ondas (cm-1)). Se mostró IR bandas características de C-H, alquenos, C-O, también de algunos dobles enlaces, además una banda en 1737 número de ondas (cm-1) donde nos indica un éster presente que es una de las principales características de la clorofila A ya que otro tipo de clorofilas tienen otros grupos funcionales.

Espectroscopia Ultravioleta-Visible

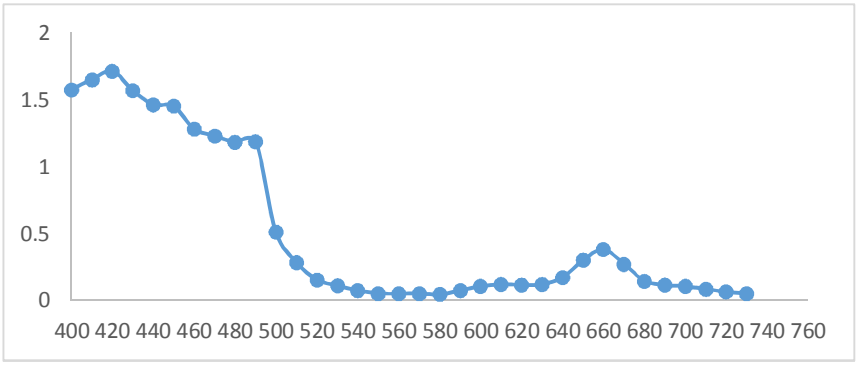


Figura 2.- Gráfica de ABS vs. nm. En espectroscopía UV-VIS, los componentes presentan dos bandas características de clorofila A una en 420 nm y 660 nm.

Resonancia Magnética Nuclear 1H y 13 C

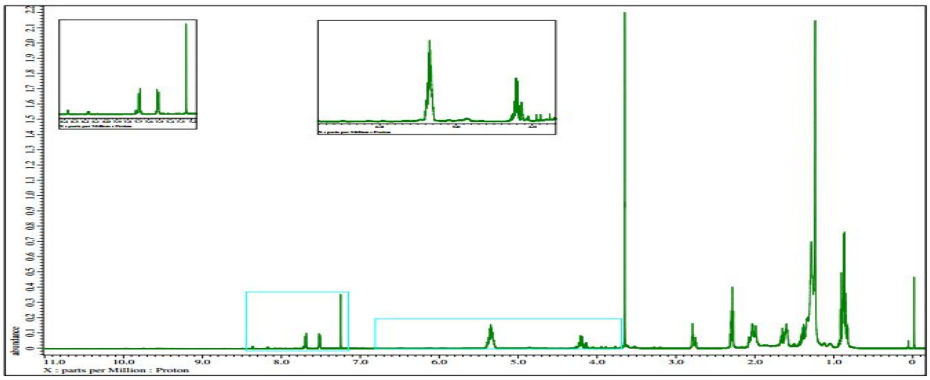


Figura 3.- En Resonancia Magnética Nuclear de 1H entre 7 y 8 ppm se encuentra una banda de protones de imina presentes en un anillo aromático, 5 y 6 ppm algunos carbonos vinílicos, 4 ppm C-H cerca de un oxígeno, 3.6 un grupo éster, por debajo de 1 ppm metilos de cadena larga.

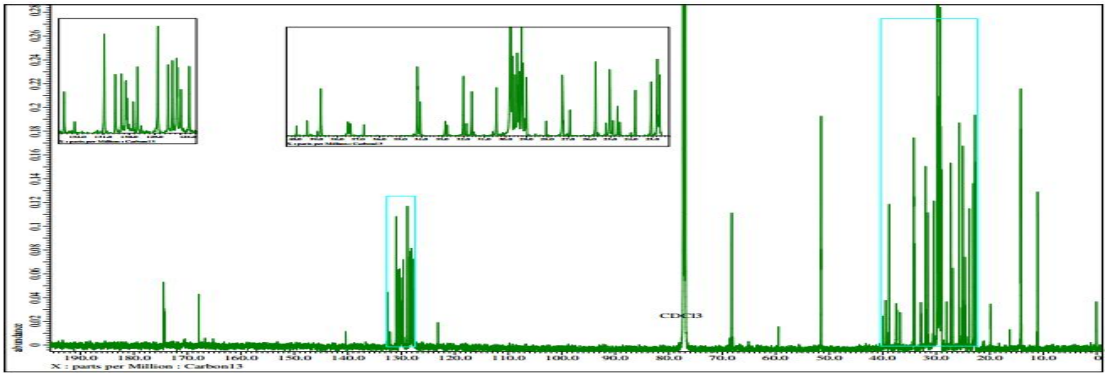


Figura 4.- En Resonancia Magnética Nuclear13C 168 ppm se encuentran iminas, 127 y 133 ppm pirroles, 23 y 40 ppm carbonos alifáticos.

DISCUSIÓN

Los resultados mostrados en el IR nos muestran que por debajo de los 1000 cm-1 no se presenta la banda del Mg que se esperaría, resultados similares a los mostrados en la presente investigación fueron señalados por Uliana et al. (2014) [1] quien obtuvo espectros típicos de absorción UV-Vis para clorinas, con una banda principal alrededor 350-450 nm y bandas de alrededor de 600 a 670 nm. En los espectros de 1H-NMR y 13C-RMN ambos muestran iminas, que son grupos funcionales característicos de las clorinas y no presentan el centro de Mg que se encuentra en la clorofila A.

CONCLUSIONES

En este trabajo se concluye de que se obtuvieron clorinas, ya que se perdió durante la extracción el centro de Magnesio, sin embargo, pese a que se obtienen estos compuestos tienen una potencial aplicación como la terapia de fotoinactivación. La síntesis de clorinas con iminas se puede considerar un método excelente y versátil para la preparación de nuevas clorinas que no lo hacen autoagregables; además los métodos de obtención son más fáciles y económicos de hacer.

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT por el apoyo con la beca otorgada y a la Universidad de Guadalajara por facilitar las instalaciones para el desarrollo de dicha investigación.

REFERENCIAS

[1] Uliana M., Pires L., Pratavieira S., Brocksom T., Oliveira K., Bagnato V., Kurachi.,(2013), "Photobiological characteristics of chlorophyll a derivatives as microbial PDT agents", 13: 1137-1145.

[2]Denis T., Huang L., Dai T., Hamblin M., (2011), "Analysis of the Bacterial Heat Shock Response to Photodynamic Therapy-Mediated Oxidative Stress", 87(3): 707–713

[3] Paloma de Oliveira B., Menezes Aguilar C., Cruz Camara A., (2014), "Photodynamic therapy in combating the causative microorganisms from endodontic infections", 8:424-30

[4] López Chicón G., (2012), Fotoinactivación de especies fúngicas patógenas mediante hipericina, TMPyP y NMB como agentes sensibilizantes fotodinámicos, tesis doctoral, España.

[5] Rajesh S., Koshi E., Philip K., Mohan A., (2011), "Antimicrobial photodynamic therapy: An overview", India, 8: 323-327.

[6] De la Paz Cristóbal M., (2013), Terapia fotodinámica in vitro con Hipericina en hongos causantes de micosis cutáneas, (tesis doctoral), Universidad de Zaragoza, España

[7] Rodriguez Cuesta A., Triana Serrano F., (2006), "Evaluación del pH en el cultivo *Spirulina spp*. (Arthrospira) bajo condiciones de laboratorio", tesis microbiólogo industrial, Universidad Javeriana, Bogotá.

[8] Cogne, G., J. Cornet and J. Gros. (2005), "Design, Operation, and Modeling of a Membrane Photobioreactor to Study the Growth of the Cyanobacterium *Arthrospira platensis* in Space Conditions. Biotechnol. Progr. 21(3):741-750

[9] Ikan R., (1991), "Natural Products a laboratory Guide", United Kingdom, Academic press, Inc., USA, 313-315.

[10] Uchoa A., T. de Oliveira K., Baptista M., Bortoluzzi A., Iamamoto Y., Serra O., (2011), " Chlorin Photosensitizers terically designed to prevent self-aggregation", Brazil, (76) 8824-8832.

[11] Lamia T., Nour Houda M., Hatem Ben O., Hassen B., Sadok R., (2009), "Partial Characterization of Extracellular Polysaccharides Produced by Cyanobacterium *Arthrospira platensis"*, Biotechnology and Bioprocess Engineering, 14: 27-31.

[12] Ulatowska-Jarza A., Zychowicz J., Holowacz I., Bauer J., Razik J., Wieliczko A., Podbielska H., Muller G., Strek W., Bindig U., (2006), "Antimicrobial PDT with chlorophyll-derived photosensitizer and semiconductor laser", Poland, 177-183

[13] Warren M.J., Smith A. G., (2009), Tetrapyrroles: birth, life and death, New York, USA: Springer Science, 235.

(Actividad antitumoral de saponinas esteroidales en líneas celulares de cáncer cérvico uterino HeLa y CasKi)

Gerardo Díaz Vázquez[a*+]

[a] Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México.

*Autor que presentó.
+Autor para correspondencia: qfbgedi@gmail.com

Área del Conocimiento: Química de Productos Naturales.

ABSTRACT
Cervical cancer (CC) is one of the main causes of death in the world. CC is a major health problem in Mexico, occupying the second place of mortality among malignant tumors in the female population. Presently, the available treatments for this malady are ineffective on advanced stages of cancer, highly necrotic, and yield severe side effects; which creates the need to develop new treatment alternatives. In this regard, saponins, sapogenins, dioscin, hecogenin, and sarsasapogenin, to mention some, have generated strong interest as they have been reported as molecules with antiproliferative activity in diverse lines of tumor origin. However, analogs or derivatives of these molecules have not yet been determined as having antitumor activity. In this work we evaluated the antiproliferative, cytotoxic and apoptotic effect of two hecogenin derivatives: 26-OH-He and 26-glu-He in tumor cells derived from CC. Our results establish that both compounds affect the proliferative potential of tumor lines HeLa and CaSki with a dose-dependent response. No or low activity of the lactate dehydrogenase (LDH) enzyme detected in the supernatants from these cultures, indicate that these molecules are of no or low cytotoxicity. The observation of typical morphological characteristics of apoptotic cells as the increased expression of active caspase-3 suggest that both saponins induce the HeLa and CaSki cells to a apoptotic death, establishing that the 26-OH-He and the 26-glu-He could be strong candidates to be evaluated as potential therapeutic agents for cancer.

Keywords: Cancer; Antitumor; Saponin; Apoptosis.

EVALUATION OF THE PROTECTIVE ABILITY OF *Heterotheca inuloides* METABOLITES TOWARD OXIDATIVE DAMAGE TO *C. elegans* USING SPECTROSCOPIC TECHNIQUES

(Evaluación de la capacidad protectora de los metabolitos de *Heterotheca inuloides* frente al daño oxidativo en *C. elegans* empleando técnicas espectroscópicas)

José Luis Rodríguez Chávez[a]*, Virginia Gómez Vidales[a], Elvia Coballase Urrutia[b], Daniel Ortega Cuellar[b], Guillermo Delgado Lamas[a+].

[a] Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México DF
[b] Instituto Nacional de Pediatría, Insurgentes Sur 3700-C, México, DF

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: delgado@servidor.unam.mx

Área del Conocimiento: Química de Productos Naturales.

ABSTRACT
Transition metals can form reactive oxygen species (ROS) via Fenton, or Fenton-like, reactions. Overproduction of ROS has been associated with oxidative damage to biomolecules. *Heterotheca inuloides* is an important plant used in traditional medicine in Mexico. The plant has been used for in folk medicine as treatment for bruises, inflammation, contusions and muscle pains. *H. inuloides* species biosynthesizes a range of polyphenol and cadinene compounds s with interesting biological activities. The aim of this study was to evaluate the potential protective role of the acetone extract and selected *H. inuloides* metabolites and some semisynthetic derivatives against copper-mediated damage in *Caenorhabditis elegans* cultures. Worms were exposed to copper ions (1 mM). We have found that Cu^{2+} decreasing the worms' survival rate, however, pretreatment with the acetone extract and with the natural compounds 7-hydroxy-3,4-dihydrocadalene, 3,7-dihydroxy-3(4H)-isocadalen-4-one and quercetin protected the nematode *C. elegans* from the mortality induced by copper. The copper (II) complexes formation was investigated by means of UV–Vis, ESR, and ESI-MS spectroscopy. The results of the spectroscopic analysis showed that quercetin has ability to bind to Cu^{2+}. By contrast, natural and semisynthetic cadinene-type compounds showed no ability to bind to copper.

Keywords: *Heterotheca inuloides*; Mexican arnica; cadinenes; *C. elegans*

RESUMEN
Los metales de transición pueden generar especies reactivas de oxígeno (ERO) a través de la reacción de Fenton o reacciones similares. La sobreproducción de ERO ha sido asociada con daño oxidativo a las biomoléculas. *Heterotheca inuloides* es una planta importante dentro de la medicina tradicional en México. Esta planta ha sido empleada tradicionalmente en el tratamiento de contusiones, inflamación, golpes y dolor muscular. *H. inuloides* biosintetiza diversos compuestos de tipo polifenol y cadinano los cuales poseen interesantes actividades biológicas. El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad protectora del extracto acetónico y ciertos metabolitos y derivados semisintéticos de *H. inuloides* frente al daño inducido por cobre en cultivos de *Caenorhabditis elegans*. Los gusanos fueron expuestos a iones de cobre (1mM). Como resultado encontramos que el Cu^{2+} disminuye la sobrevida de los gusanos, sin

embargo, el pretratamiento con el extracto acetónico y con los productos naturales 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno, 3,7-dihidroxi-3(4H)-isocadalen-4-ona y quercetina protegieron al nematodo *C. elegans* del efecto toxico inducido por el cobre. La formación de complejos de cobre (II) fue investigada empleando las técnicas de UV–Vis, ESR, y espectroscopia ESI. Los resultados del análisis espectroscópico revelaron que solamente la quercetina posee capacidad para quelatar cobre. Por el contrario, los compuestos naturales y semisintéticos de tipo cadinano non mostraron capacidad para quelatar el cobre.

Palabras Clave: *Heterotheca inuloides*; árnica mexicana; cadinanos; *C. elegans*.

INTRODUCCIÓN

Los iones de ciertos metales de transición (V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo y Cd) son esenciales en los procesos biológicos normales, su deficiencia conlleva a la incapacidad del organismo para efectuar ciertos procesos biológicos importantes, sin embargo, iones como el Cu^{2+} o Fe^{2+} pueden interactuar con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) para formar radicales hidroxilo ($OH^{\bullet}$), y generar daño oxidativo a las membranas y biomoléculas [1-4].

Heterotheca inuloides es una planta originaria de México comúnmente conocida como árnica y diversos nombres regionales [5,6]. La infusión de las flores secas se utiliza para tratar afecciones tales como: contusiones, dolor muscular, problemas dermatológicos, úlceras, y otras condiciones asociadas a procesos inflamatorios [7,8]. A partir de esta planta se han aislado principalmente compuestos de tipo sesquiterpeno, flavonoide y fitoesterol [8]. Algunos compuestos aislados de *H. inuloides* inhiben la peroxidación lipídica y tienen capacidad para que atrapar especies reactivas de oxígeno (ERO) [9,10]. Considerando que los metales de transición tienen una participación importante en la generación de ERO asociadas a daño oxidativo, el objetivo de este estudio fue investigar la capacidad protectora de los metabolitos aislados del extracto acetónico de *H. inuloides* para proteger a *Caenorhabditis elegans* contra el daño generado por iones cobre^{2+}.

METODOLOGÍA

Material vegetal

Las flores de *H. inuloides* proporcionadas Laboratorios Mixim (México) fueron autentificadas por la M. en C. Abigail Aguilar Contreras. Una muestra de referencia (IMSSM-16064) se depositó en el Herbario de Plantas Medicinales del Instituto Mexicano del Seguro Social. Los compuestos 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno (**1**), 7-hidroxicadaleno (**2**), 3,7-dihidroxi-3 (4H) -isocadalen-4-ona (**3**), ácido (1R, 4R)-1-hidroxi-4H-1,2,3,4-tetrahydrocadalen-15-oico (**4**), quercetina (**5**), 3,7,3'-trimetil éter de quercetina (**6**), 3,7,3',4'-tetrametil éter de quercetina (**7**), 7,4'-dimetil éter de eriodictiol (**8**) se obtuvieron a partir del extracto acetónico; los compuestos semisintéticos 7-acetoxi-3,4- dihidrocadaleno (**9**), 7-benzoxi-3,4-dihydrocadaleno (**10**), 7-acetoxicadaleno (**11**), 7-benzoxicadaleno (**12**), penta-acetil quercetina (**13**) y 7-hidroxicalamenano (**14**) (figura 1) fueron obtenidos por procedimientos químicos convencionales [11].

Cepa de *Caenorhabditis elegans*

Se utilizó la cepa N2 de *C. elegans* var. Bristol (*Caenorhabditis* Genetic Center, Universidad de Minnesota). Los nemátodos se crecieron en medio NGM a 20° C [12], con *Escherichia coli* OP50 concentrada como fuente de alimento. Para el ensayo se emplearon nemátodos al estadío L1 de desarrollo, sincronizados mediante el método de hipoclorito de sodio.

Resistencia al estrés

El bioensayo con *C. elegans* se desarrolló en medio líquido a 20° C en placas de 96 pozos [13]. 10-15 nemátodos por pozo que fueron pretratados por una hora con el extracto o los metabolitos de *H. inuloides* disueltos en DMSO/metanol (50/50% v/v). Posteriormente fueron expuestos a 1 mM de $CuSO_4$ durante un período de 24 h. Los animales fueron observados bajo el microscopio después del tratamiento con cobre y la fracción viva se obtuvo con base en la movilidad. Como controles negativos se incluyeron pozos con nemátodos los cuales recibieron solamente el vehículo (DMSO/etanol (50/50% v/v), se incluyeron controles positivos tratados con catequina (1 mM). La comparación entre los tratamientos y el control se realizó mediante una prueba *t* de Student. Los valores promedio de gusanos vivos se calcularon a partir de tres experimentos independientes.

Estudio espectrofotométrico de la interacción con el cobre

Se evaluó la interacción con el cobre de aquellos metabolitos que mostraron capacidad para proteger a *C. elegans* empleando las técnicas de UV-Vis, resonancia de espín electrónico (ESR) y espectrometría de masas con ionización por electrospray (ESI-MS). Para el análisis por UV-Vis, soluciones de los metabolitos (25 M) en solución amortiguadora de fosfatos (10 mM, pH 7,5), y soluciones de los metabolitos (25 M) en presencia de 50 M de $CuSO_4$ se sometieron a análisis espectral en el intervalo de 300 a 600 nm. El análisis por ESR se llevó a cabo con soluciones (0.5 mM) de los metabolitos y $CuSO_4$ en exceso disueltos en MeOH-H_2O (1:1), empleando un espectrómetro Jeol JES–TE300. Los espectros de ESR se registraron como la señal proveniente de la primera derivada de la absorción, calculándose los parámetros principales. Finalmente, el análisis de espectrometría de masas por ionización por electrospray se llevó a cabo en un espectrómetro Esquire 6000. Las muestras (0.5 mg/ml, metanol:agua 1:1), se inyectaron en la cámara de electrospray por infusión directa con un flujo constante de 240 L/h. Los espectros se obtuvieron en el modo positivo y negativo.

RESULTADOS

Figura 1. Productos naturales y derivados semisintéticos de *H. inuloides*.

Tabla 1. Efecto protector de los metabolitos de *H. inuloides* en cultivos de *C. elegans* bajo estrés inducido por cobre (1mM $CuSO_4$).

Compuesto	Total (N)	Supervivencia %	
		Media	EE
1	125	69.167**	5.64
2	102	0	--
3	139	82.93**	8.87
4	111	21.10	5.95
5	72	88.18**	7.36
6	94	6.78	4.38
7	71	0	---
8	132	8.44	3.68
9	134	0	0
10	54	15.56	5.47
11	64	6.25	6.25
12	53	0	---
13	105	16.66	11.91
14	116	2.38	2.38
Extracto acetónico	122	94.38**	5.22
Catequina	82	64.133**	4.60
Control (-)	53	6.31	1.228

* P< 0.05. Los datos fueron procesados mediante la prueba "*t*" de Student.

La adición de cobre no produjo un desplazamiento batocrómico en los espectros de UV/Vis para **1** y **3**, el análisis por ESI-MS de estos compuestos en presencia de cobre no se observaron picos atribuidos a complejos con cobre; en tanto que los espectros de ESR obtenidos para **1** y **3** mostraron el mismo patrón obtenido para los iones libres de Cu^{2+}. La adición de cobre produjo un efecto batocrómico en los picos de absorción del compuesto **5**, así mismo en el espectro de ESI-MS se observaron picos asociados a complejos con cobre con estequiometria 1:1 y 1:2 a *m/z* = 382 $[(M+H) +Cu^{2+} +H_2O]^+$ y *m/z* = 688 $[(M+H) +Cu^{2+} + M + H_2O]^+$. Tanto el extracto como el compuesto **5** producen un cambio notable en el patrón del espectro de Cu^{2+} (figura 2).

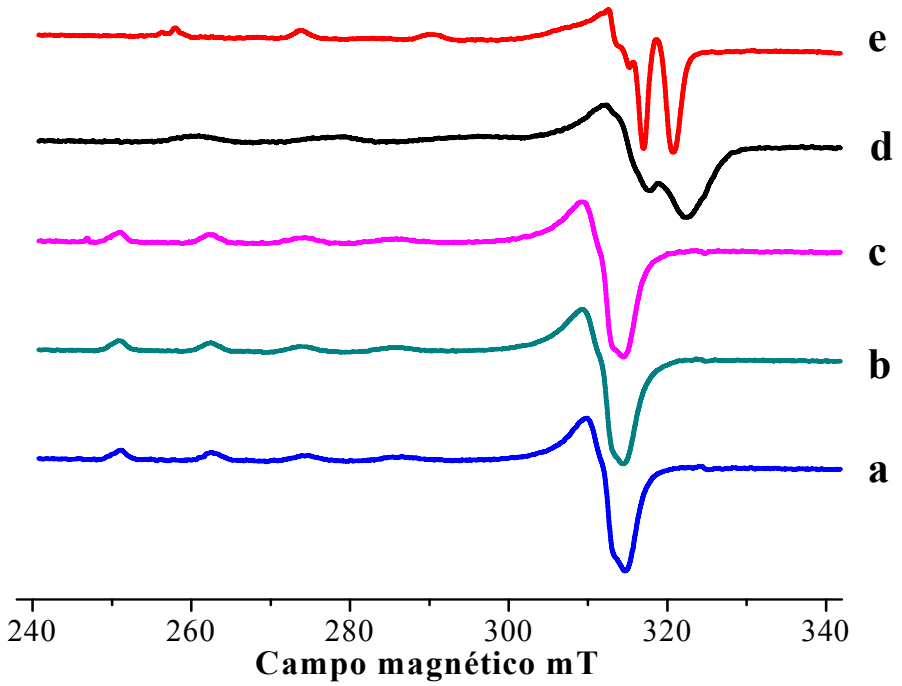


Figura 2. Espectro de ESR (metanol/H_2O) para Cu^{2+} (a), Cu^{2+}-**1** (b) Cu^{2+}-**3** (c) Cu^{2+}-**5** (d) y Cu^{2+}/Extracto acetónico (e).

DISCUSIÓN

La exposición de *C. elegans* a 1 mM de Cu^{2+} produjo una disminución en la sobrevivencia del nemátodo después de 24 h, sin embargo, el pretratamiento con el extracto acetónico y con los compuestos **1**, **3** y **5** incrementó su resistencia. El efecto protector del extracto puede atribuirse a la presencia de compuestos fenólicos con capacidad antioxidante [8,14], además, es conocida su capacidad para quelatar metales [15]. Mediante un análisis espectroquímico empleando las técnicas de espectroscopía de UV-Vis, ESI-MS y EPR se evaluó la formación de complejos de Cu^{2+} con los metabolitos de *H. inuloides*. Solo se demostró la formación de complejos de cobre con el compuesto **5**. La capacidad quelante limitada de **1** y **3** fue evidenciada por los análisis espectrales de UV-Vis, ESI-MS y ESR donde no se observaron especies de Cu-**1** y Cu-**3**. Así, es posible que la capacidad protectora de los compuestos de tipo cadinano ocurra por mecanismos diferentes a la quelación. Se ha informado que el compuesto **1** inhibe la peroxidación de lípidos [16,17], mientras que el compuesto **3** mostró capacidad moderada para atrapar ROS [18], lo anterior es importante si se considera que el cobre libre induce la peroxidación lipídica [19] y la producción ERO [20].

CONCLUSIONES

El extracto acetónico de *H. inuloides* posee compuestos que causan un aumento significativo en la resistencia del nemátodo al daño inducido por cobre, y la quercetina (**5**), específicamente, mostró la mayor actividad. Esta propiedad es importante al considera que la quelación es un mecanismo alterno mecanismo de actividad antioxidante. El análisis espectrofotométrico, utilizando las técnicas de UV / Vis, ESR y ESI-MS proporcionó evidencia de la formación de complejos entre **5** y Cu^{2+}, con estequiometría 1:1 y 1:2. Los compuestos de tipo cadinano 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno (**1**) y 3,7-dihidroxi-3 (4H) - isocadalen-4-ona (**3**) no mostraron capacidad para quelatar iones Cu^{2+} lo que implica que su efecto protector procede por mecanismos diferentes a la quelación.

AGRADECIMIENTOS

Al personal técnico del Instituto de Química de la UNAM por el apoyo brindado. Al CONACYT por la beca otorgada para los estudios de doctorado en Ciencias Biomédicas.

REFERENCIAS

[1] Uriu-Adams, J.Y., Keen, C.L. (2005), "Copper, oxidative stress, and human health", Molecular Aspects of Medicine, 26, 268–298.

[2] Moriwaki, H., Osborne, M.R., Phillips, D.H. (2008), "Effects of mixing metal ions on oxidative DNA damage mediated by a Fenton-type reduction", Toxicology in Vitro, 22, 36–44.

[3] Simonsen, L.O., Harbak, H., Bennekou, P. (2012), "Cobalt metabolism and toxicology--a brief update.," Science of The Total Environment, 15, 210-215.

[4] Kurita, H., Ohsako, S., Hashimoto, S., Yoshinaga, J., Tohyama, C. (2013), "Prenatal zinc deficiency-dependent epigenetic alterations of mouse metallothionein-2 gene", Journal of Nutritional Biochemistry, 24, 256–266.

[5] Argueta, A., Cano, L., Rodarte, M.E. (1994). Atlas de las plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana. (1ª ed.) Vols. 1-3. Instituto Nacional Indigenista, editor. México.

[6] Martínez, M. (1937). Catálogo alfabético de nombres vulgares y científicos de plantas que existen en México. Ed. Botas. México.

[7] Lozoya, X., Aguilar, A., Camacho, J.R. (1987), "Encuesta sobre el uso actual de plantas en la medicina tradicional mexicana", Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social, 25:283-286.

[8] Delgado, G., Olivares, M.S., Chávez, M.I., Ramírez-Apan, T., Linares, E., Bye, R., Espinosa, G. F.J. (2001), "Antiinflammatory constituents from *Heterotheca inuloides*", Journal of Natural Products, 64:861-864.

[9] Haraguchi H, Saito T, Ishikawa H, Sánchez Y, Ogura, T, Kubo I. (1996), Inhibition of lipid peroxidation by sesquiterpenoid in *Heterotheca inuloides*", Journal of Pharmacy and Pharmacology, 48:441–443.

[10] Coballase-Urrutia E, Pedraza-Chaverri J, Camacho-Carranza R, Cárdenas-Rodríguez N, Huerta-Gertrudis B, Medina-Campos ON, Delgado-Lamas, G., Espinosa-Aguirre, J.J. (2010), "Antioxidant activity of *Heterotheca inuloides* extracts and of some of its metabolites", Toxicology, 276:41–48.

[11] Rodríguez-Chávez, J.L., Rufino-Gonzlez, Y., Ponce-Macotela, M., Delgado, G. (2015), "In vitro activity of 'Mexican Arnica' *Heterotheca inuloides* Cass natural products and some derivatives against *Giardia intestinalis*", Parasitology, 142, 576–584.

[12] Brenner, S. (1974), "The genetics of *Caenorhabditis elegans*", Genetics, 77:71-94.

[13] Solis, G.M., Petrascheck, M. (2011), "Measuring *Caenorhabditis elegans* Life Span in 96 Well Microtiter Plates", Journal of Visualized Experiments, 49:1-6.

[14] Muñoz-Velázquez, E.E., Rivas-Díaz, K., Loarca-Piña, M.G., Mendoza-Díaz, S., Reynoso-Camacho, R., Ramos-Gómez, M. (2012), "Comparación del contenido fenólico, capacidad antioxidante y actividad antiinflamatoria de infusiones herbales comerciales", Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 3:481-495.

[15] Mladěnka, P., Macáková, K., Filipský, T., Zatloukalová, L., Jahodář, L., Bovicelli, P., Silvestri, I,P., Hrdina, R., Saso, L. (2011), "In vitro analysis of iron chelating activity of flavonoids." Journal of Inorganic Biochemistry, 105:693-701.

[16] Haraguchi, H., Saito, T., Ishikawa, H., Sánchez, Y., Ogura, T., Kubo, I. (1996), "Inhibition of lipid peroxidation by sesquiterpenoid in *Heterotheca inuloides*", Journal of Pharmacy and Pharmacology, 48:441–443.

[17] Haraguchi, H., Ishikawa, H., Sánchez, Y., Ogura, T., Kubo, Y., Kubo, I. (1997), "Antioxidative constituents in *Heterotheca inuloides*", Bioorganic & Medicinal Chemistry, 5:865-871.

[18] Rodríguez-Chávez, J.L., Coballase-Urrutia, E., Nieto-Camacho, A., Delgado-Lamas, G. (2015), "Antioxidant capacity of "Mexican Arnica" *Heterotheca inuloides* Cass natural products and some derivatives: Their anti-inflammatory evaluation and effect on *C. elegans* life span", Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2015; 1-11.

[19] Boadi, W.Y., Iyere, P.A., Adunyah, E. (2003), "Effect of quercetin and genistein on copper- and Iron-induced lipid peroxidation in methyl linolenate", Journal of Applied Toxicology, 23:363–369.

[20] Pham, A.N., Xing, G., Miller, C.J., Waite, T.D. (2013), "Fenton-like copper redox chemistry revisited: Hydrogen peroxide and superoxide mediation of copper-catalyzed oxidant production" Journal of Catalysis, 301:54–64.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

IDENTIFICATION OF PIGMENTS IN STRAINS OF *Pycnoporus sanguineus*

(Identificación de pigmentos en cepas *Pycnoporus sanguineus*)

Leonardo Romo Patiño[a*], Alexis Joavany Rodríguez Solís[b], Ma Lourdes Acosta Urdapilleta[c], Elba Cristina Villegas Villarreal[b+]

[a]Escuela de Técnicos Laboratoristas, Laboratorio de Estructura-Función e Ingeniería de Proteínas,[b]Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos.
[b] Laboratorio de Estructura-Función e Ingeniería de Proteínas, Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos.
[c]Laboratorio de Micología, Centro de Investigación en Biología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: elbav@uaem.mx

Área del Conocimiento: Química de Productos Naturales.

ABSTRACT
Pycnoporus sanguineus belongs to edible basidiomycetes. Its color is due to cinabarinic acid, transmesanguine and cinnabarine red compounds, which have antioxidant, anti-inflammatory, antibiotic, antiviral and insecticidal properties. Cinnabarine is a compound with three aromatic rings in its phenoxazine type one structure and possess antimicrobial properties. Cinnabarine extracts have greater effect on Gram + bacteria than in Gram – as have been demonstrated through antimicrobial activity in bioassays with *Salmonella typhi* bacteria and *Staphylococcus aureus*. We have 32 strains of *Pycnoporus* sanguineus, which are deposited in the collection of ceparium HEMIM CIB-UAEM, they were collected from various cities of Morelos state. The goal of this work is to select the best *Pycnoporus* strains based on their characteristics of growth rate, mycelium and pigment production. Mineral and HIT agars were used to cultivate them at pH 5.5 in Petri dishes. Radial growth was recorded for 7 days. From 500 mg mycelium/strain, exhaustive extractions with acetone were carried out. Once acetone was removed Cinnabarine was quantified in the total extract and resuspended in water. The absorbance was measured at a wavelength of 435 nm, to calculate the cinnabarine, cinnabarinic acid and tramesanguine concentration using a standard curve and the molar extraction coefficient for 18,000Mcm. Moreover, each extracts were purified by HPLC. The results demostrate that HEMIM strains 52, 53, 61, 65, 69, 70, 72 and 78, produced the higher amount of cinnabarine among the pigments present and they have the highest radial grow speed. However among them, strains HEMIM-61 and HEMIM-65, have the highest yield of cinnabarine production. Cinnabarine is a compound which have important biotechnological applications such as colorant, antimicrobial, antiviral, acaricide and nematicide and these strains could be used for these purposes.

Keywords: Pigments, Cinnabarine, Antimicrobials, Isolation, Quantification.

CHEMICAL CHARACTERIZATION OF ESSENTIAL OIL OF GOBERNADORA (*Larrea tridentata*), OBTAINED BY HYDRODISTILLATION

(Caracterización química del aceite esencial de Gobernadora (*Larrea tridentata*), obtenido por hidrodestilación)

Mirna Estarrón-Espinosa[a*+], Alberto Flores-Arteaga[b], Gustavo Adolfo Castillo-Herrera[a]

[a]Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. Unidad de Tecnología Alimentaria/ Av. Normalistas No. 800, Colinas de la Normal, C. P. 44270. Guadalajara, Jalisco.
[b] DARMEX, S.P. R. de R.L., Ramón Corona No. 311, Col. San Luis Soyotlán, C. P. 49443. Tuxcueca, Jalisco, México

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: mestarron@ciatej.mx

Área del Conocimiento: Química de Productos Naturales.

ABSTRACT
Larrea tridentata, also known as “gobernadora” or “hediondilla”, is a native plant to North America and it is distributed abundantly in the desert areas of northern Mexico and southwestern United States. Since ancient times, this plant has been used in Mexico as an herbal remedy for its healing and medicinal properties, which are mainly attributed to the biological activity of secondary metabolites present in extracts and essential oils. In this work, we evaluated the physicochemical properties and volatile composition of the essential oil extracted by hydrodistillation from dried leaves of *Larrea tridentata* in flowering stage, accord to the AFNOR regulation. The essential oil yield was 0.15% from plant material with a moisture content of 5%. Ninety six components (88.3% of total) were tentatively identified by GC-MS. The most abundant compounds were (E, E)-farnesyl acetate (9.5%), alpha-eudesmol (5.7%) and beta-eudesmol (5.5%). Among its physicochemical parameters, relative density at 25°C was 0.9665 and 1.4711 for refractive index. The characterization of this essential oil has revealed a high complexity, with a large number of volatile compounds, mainly monoterpenes and sesquiterpenes which are related with antiinflammatory and antimicrobial activities.

Keywords: *Larrea tridentata*; essential oil; hydrodistillation; gobernadora.

PHYTOCHEMICAL PROFILE OF *Kalanchoe daigremontiana* SUSPENSION CULTURES

(Perfil fitoquímico de cultivos en suspensión de *Kalanchoe daigremontiana*)

María Nancy Pérez Mejía[a], Pablo Emilio Vanegas Espinoza[a*], Alejandro Zamilpa Álvarez[b], Alma Angélica Del Villar Martínez[a+]

[a]Centro de Desarrollo de Productos Bióticos-IPN Carretera Yautepec Jojutla, Km 6, Calle CEPROBI Num. 8, Col San Isidro, CP 62731. Yautepec, Morelos México
[b]Centro de Investigación Biomédica del Sur-IMSS. Argentina 1, Colonia Centro, Xochitepec, Morelos, México.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: adelvillarm@ipn.mx

Área del Conocimiento: Química de Productos Naturales.

ABSTRACT
Kalanchoe genus, includes about 125 species, several are used in traditional medicine; leaves are used as antimicrobial, analgesic, antipyretic, anti-inflammatory agents, and against skin and digestive system diseases. *Kalanchoe daigremontiana* is a plant used in traditional medicine for treatment of respiratory, inflammatory and chronic diseases. Plant extracts have shown the presence of: triterpenes, bufadienolides, sterols, phenanthrene, flavonoids and fatty acids. Purification of these compounds requires large amounts of plant biomass, then is necessary to develop a biotechnological production system. Suspension cultures are systems under specific conditions favoring the biosynthesis of compounds with high added value. The aim of this work was to analyze the phytochemical profile of extracts from *Kalanchoe daigremontiana* suspension cultures. *In vitro* seedlings, were used as explant source to induce dedifferentiated cells on BAP and 2, 4-D supplemented MS media. Subsequently, suspension cultures were established, the kinetics of cell growth was obtained and the kinetic parameters were calculated. Methanolic extracts were analyzed and compounds identification was performed by TLC and HPLC. Ursolic acid and β-sitosterol were identified as main extracts compounds in cell suspension cultures of *K. daigremointiana*.

Keywords: *Kalanchoe daigremointiana*; ursolic acid; β-sitosterol; cell culture.

RESUMEN
El género *Kalanchoe* incluye alrededor de 125 especies, algunas de ellas se utilizan en la medicina tradicional; las hojas son utilizadas como agente antimicrobiano, analgésico, antipirético, antiinflamatorio y contra enfermedades del sistema digestivo y de la piel. *Kalanchoe daigremontiana* es una planta utilizada en la medicina tradicional para el tratamiento de padecimientos respiratorios, inflamatorios y enfermedades crónicas. Se ha demostrado la prescencia de triterpenos, bufadienólidos, fenantreno, flavonoides y ácidos grasos en extractos de la planta. La purificación de estos compuestos requiere de grandes cantidades de biomasa, por lo que es necesario el desarrollo de sistemas biotecnológicos de producción. El cultivo de células en suspensión es un sistema en el cual, bajo condiciones controladas se favorece la biosíntesis de compuestos con alto valor agregado. El objetivo de

este trabajo fue analizar el perfil fitoquímico de extractos de células en suspensión de *Kalanchoe daigremontiana*. Se utilizaron plántulas in vitro como fuente de explante para inducir la desdiferenciación celular en medio MS adicionado con BAP y 2,4-D. Una vez establecidos los cultivos en suspensión se obtuvieron las cinéticas de crecimiento celular y se calcularon los parámetros cinéticos. Los extractos metanólicos fueron analizados y se identificaron los compuestos por TLC y HPLC. Se identificaron al ácido ursólico y al β-sitosterol como los principales compuestos en los cultivos en suspensión de *K. daigremontiana*.

Palabras Clave: *Kalanchoe daigremointiana*; ácido ursólico; β-sitosterol; cultivo celular.

INTRODUCCIÓN

El género *Kalanchoe* pertenece a la familia Crassulaceae, cuenta con alrededor de 125 especies, es una planta silvestre, que se adapta a condiciones de sequía, varias especies de este género se utilizan en la medicina tradicional; las hojas se utilizan como antimicrobianos, analgésicos, antipiréticos, agentes antiinflamatorios, y contra enfermedades de la piel y del aparato digestivo [1, 2].

Los extractos que se obtienen de las especies de Kalanchoe, presentan un alto contenido en alcaloides, triterpenos, glucósidos con actividad cardiotónica, flavonoides, esteroides y lípidos, algunas de estas fracciones se han utilizado en el tratamiento de diversas enfermedades como hipertensión y reumatismo, presentan actividad, antiinflamatoria, antihistamínica y antitumoral [3]. Tomando en cuenta el potencial de los compuestos químicos que produce esta planta, es interesante implementar protocolos para la micropropagación e inducción de callo, que permitan la obtención de estos compuestos. El objetivo de este trabajo fue establecer el cultivo *in vitro* de células desdiferenciadas y estudiar el perfil fitoquímico de cultivos en suspensión de *Kalanchoe daigremontiana*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de células desdiferenciadas

Para el establecimiento del cultivo *in vitro*, los brotes vegetativos se desinfestaron de acuerdo al método establecido por Pedroso y col. [4]. Posterior a la desinfestación se sembraron los brotes en medio MS [5]. Se obtuvieron explantes de tallo, se colocaron en cajas Petri con medio MS adicionado con bencil amino purina (BAP, 1 mg/L) y ácido 2, 4-diclorofenoxiacético (2, 4-D, 0.5 mg/L), sacarosa (30 g/L) y fitagel (Sigma®) (3 g/L), los cultivos se incubaron a una temperatura de 25±2° C.

Establecimiento de cultivos celulares en suspensión

Inóculos de 3 a 5 g de callo friable y se depositaron en matraces Erlenmeyer de 125 ml, con 30 ml del medio MS (BAP, 1 mg/L; 2, 4-D, 0.5 mg/L). Los cultivos se incubaron a 25±2° C, con agitación a 110 rpm.

Colecta y preparación del material vegetal

Se pesaron entre 10 g de células en suspensión previamente molidas, se colocaron las muestras en matraces Erlenmeyer y se adicionaron 50 ml de metanol, por un periodo de 24 h. Los extractos fueron concentrados por destilación a presión reducida utilizando un Rotavapor (Buchi, Buchi-490, Suiza).

Análisis por TLC

Los extractos metanólicos se analizaron mediante TLC [6,7]. Se utilizaron cromatofolios de aluminio de sílica gel 60 F_{254} de 20x20 cm, Merck, Alemania (fase normal). Como fase móvil se empleó una mezcla de

CH_2Cl_2/CH_3OH (97:3 v/v). Se emplearon como estándares de referencia: glucósido de quercetina, ácido ursólico y β-sitosterol. Las placas se revelaron con el reactivo de KOM [8].

RESULTADOS

Establecimiento del cultivo *in vitro* de *K. daigremontiana*

En la figura 1, se observan las plántulas *in vitro* a los 45 días. Los tallos sirvieron como fuente de explante para la obtención de células desdiferenciadas.

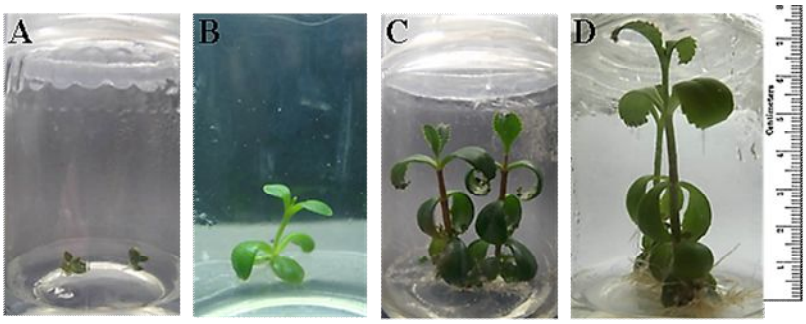


Figura 1. Plántulas de *Kalanchoe daigremontiana* de brotes vegetativos.

Inducción de callo a partir de explantes de tallo

La figura 2 muestra los callos obtenidos a partir de tallo con BAP y 2,4-D. Los resultados obtenidos fueron similares a lo reportado por López-Díaz [9].

Establecimiento de cultivos en suspensión

A partir de callos friables desarrollados en medio semisólido se establecieron las condiciones para la obtención y formación de suspensiones celulares con un activo crecimiento celular.

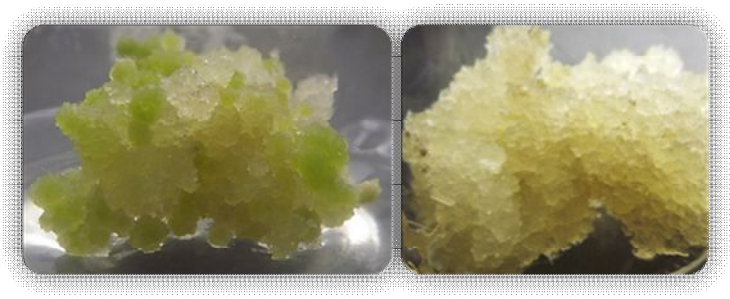


Figura 2. Aspecto de callos de *K. daigremontiana*. MS, BAP (1 mg/L) y 2,4-D (0.5 mg/L).

Caracterización de compuestos en cultivos en suspensión de *K. daigremontiana*

Se analizó cualitativamente el perfil de compuestos presentes tanto en la hoja como en cultivos en suspensión. Se utilizó una cromatografía en columna con un sistema de fase normal, y se determinó que las fracciones 26 y 35 correspondieron a ácido ursólico y β-sitosterol, por comparación con estándares de referencia; en los extractos de *K. daigremontiana*.

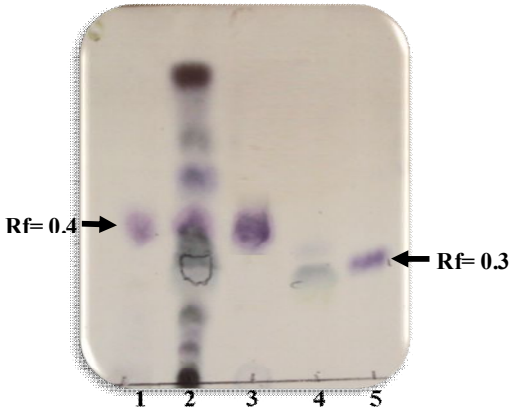


Figura 3. Identificación por TLC de ácido ursólico y β-sitosterol en cultivos en suspensión de *K. daigremontiana*. 1. Estándar de β-sitosterol, 2. Extracto con CH_2Cl_2, 3. F26, 4. F35 y 5. Estándar de ácido ursólico. Fase normal, sistema: 93:7 v/v CH_2Cl_2/CH_3OH, reveladas con el reactivo de KOM.

REFERENCIAS

[1] Garces, H. M. P., Champagne, C. E. M., Townsley, B. T., Park, S., Malho, R., Pedroso, M. C., Sinha, N. R. (2007). Evolution of asexual reproduction in leaves of the genus Kalanchoe, Plant Biology 104(1), 1–6.

[2]Kuo, P. C., Kuo, T. H., Su, C. R., Liou, M. J. y Wu, T. S. (2008). Cytotoxic principles and α-pyrone ringopening derivatives of bufadienolides from *Kalanchoe hybrida*. Tetrahedron 64(1), 3392- 3396.

[3] Cruz, E. A, Da-Silva, S. A. G., Muzitano, M. F., Silva, P. M. R., Costa, S. S. y Rossi Bergmann, B. (2008). Immunomodulatory pretreatment with *Kalanchoe pinnata* extract and its quercitrin flavonoid effectively protects mice against fatal anaphylactic shock. International Immunopharmacology, 8(12), 1616–21.

[4] Pedroso, M. C., Magalhaes, J. R., Durzan, D., Vegetal, C. D. B., Vegetal, D. B., Cie, F. De, Gene, D. R. (2000). A nitric oxide burst precedes apoptosis in angiosperm and gymnosperm callus cells and foliar tissues, 51(347), 1027–1036.

[5] Murashige, T. y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. Physiology Plant 15, 472-497

[6] Dutta, N. K., Mazumdar, K., Mishra, U. S., Dastidar, S. G., y Park, J.H. (2007). Isolation and identification of a flavone (quercetin) from Butea frondosa bark. Pharmaceutical Chemistry Journal, 41(5), 269–271.

[7] Dmitrienko, S. G., Kudrinskaya, V. a., y Apyari, V. V. (2012). Methods of extraction, preconcentration, and determination of quercetin. Journal of Analytical Chemistry, 67(4), 299–311.

[8] Gagner, H. y Bladt, S. (2001). Plant Drug Analysis. A thin layer chromatography atlas. Second edition. Springer

[9] López-Díaz, D. E. (2011). Análisis del RNAm del gen que codifica para la enzima escualeno sintasa (sqs) en cultivo de células de *Kalanchoe daigremontiana*. Tesis de Maestría. CeProBi-IPN, Yautepec, Mor.

EFFECT OF SALICYLIC ACID ON PHENOLIC COMPOUNDS PRODUCTION OF CORIANDER (*Coriandrum sativum* L)

[Efecto del ácido salicílico sobre la producción de compuestos fenólicos en cilantro (*Coriandrum sativum* L)]

Carlos Arturo Loyola Torres[a], Alma Angélica Del Villar Martínez[a], Gabriela Sepúlveda Jiménez[a], Pablo Emilio Vanegas Espinoza[a]*+

[a]Centro de Desarrollo de Productos Bióticos-IPN Carretera Yautepec Jojutla, Km 6, Calle CEPROBI 8, Col San Isidro, CP 62731. Yautepec, Morelos México.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: pevanegase@gmail.com

Área del Conocimiento: Química de Productos Naturales.

ABSTRACT
Plants react against any biotic or abiotic stress, producing a range of chemical compounds called secondary metabolites. Many secondary metabolites are currently used as pigments, drugs, fragrances, food additives, insecticides, among other. Flavonoids are a group of secondary metabolites belonging to the group of diphenyl propanoids, used as antioxidants, antimicrobial, cytotoxic, cardioprotective, pigments, etc. Phenylalanine ammonia lyase (PAL) is a key enzyme in the flavonoids biosynthesis; it catalyzes the reaction of phenylalanine to cinnamic acid in phenyl propanoids pathway. Coriander (*Coriandrum sativum* L.) aerial tissues contain a variety of compounds belonging to phenolic and flavonoids group; however, the role of PAL on flavonoids has been weakly studied. It has been reported elicitation in plants for secondary metabolite biosynthesis. Salicylic acid (SA) stimulates transcription of related genes to secondary metabolites production evolved in plant defense response. In this study the potential of salicylic acid as an elicitor agent for the accumulation of flavonoids and phenolic compounds in coriander plants was evaluated. Protein content was determined by Follin´s colorimetric method, PAL enzymatic activity was determined quantifying cinnamic acid generated and, its relationship with flavonoids and phenolic compounds accumulation was studied. Results indicate that salicylic acid (250 mM) not affected PAL activity in leaves nor roots, 24 and 48 h after elicitation; however, this treatment induced accumulation of phenolic compounds in aerial tissues.

Keywords: *Coriandrum sativum*; phenolic compounds; elicitation; salicylic acid.

RESUMEN
Las plantas responden a los cambios bióticos o abióticos produciendo una amplia gama de compuestos químicos denominados metabolitos secundarios. Actualmente, muchos de estos son utilizados como pigmentos, fármacos, fragancias, aditivos para alimentos, insecticidas, entre otros. Los flavonoides son metabolitos secundarios que pertenecen al grupo de los difenil propanoides, utilizados como antioxidantes, antimicrobianos, citotóxicos, cardioprotectores, pigmentos, etc. La fenilalanina amonio liasa (PAL) es una ezima clave en la biosíntesis de flavonoides; cataliza la reacción de fenilalanina a ácido cinámico en la ruta de los fenilprpanoides. El cilantro (*Coriandrum sativum* L.) acumula una gran variedad de compuestos fenólico y flavonoides en tallos y hojas; sin embargo, la participación de PAL en

la biosíntesis de flavonoides ha sido poco estudiada en este modelo. El ácido salicílico (SA) estimula la transcripción de genes relacionados con la biosíntesis de metabolitos involucrados en las reacciones de defensa de las plantas. En este estudio se evaluó el potencial de ácido salicílico como agente inductor de la acumulación de compuestos fenólicos y flavonoides en plantas de cilantro. El contenido de proteínas se determinó por el método colorimétrico de Follin, la actividad enzimática de PAL mediante la cuantificación del ácido cinámico y estos datos se relacionaron con la acumulación de compuestos fenólicos y flavonoides. Los resultados indican que el ácido salicílico (250 mM) no afectó la actividad de PAL ni en hojas ni en raíces, 24 y 48 horas después de la aplicación; sin embargo, este tratamiento indujo la acumulación de compuestos fenólicos en tejidos aéreos.

Palabras Clave: *Coriandrum sativum*; compuestos fenólicos; elicitación; ácido salicílico.

INTRODUCCIÓN

Las plantas se defienden ante el estrés biótico o abiótico, produciendo una gama de compuestos químicos de bajo peso molecular, denominados metabolitos secundarios, los cuales ayudan a su supervivencia. Muchos de los metabolitos secundarios son utilizados actualmente como: pigmentos, medicamentos, fragancias, aditivos para alimentos, insecticidas, entre otros usos [1, 2]. Los flavonoides son un grupo de metabolitos secundarios pertenecientes al grupo de los difenil propanoides, utilizados como antioxidantes, antimicrobianos, citotóxicos, cardioprotectores, pigmentos, entre otros. La enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) es una enzima clave en la producción de flavonoides, cataliza la reacción de fenilalanina a ácido cinámico en la vía de los fenil propanoides. El cilantro (*Coriandrum sativum* L.) contiene una gran variedad de compuestos pertenecientes al grupo de los flavonoides y fenoles en sus órganos aéreos; sin embargo, el papel de PAL en la producción de flavonoides esta débilmente estudiado [4]. Se ha reportado que la elicitación es una opción para potenciar, la acumulación o biosíntesis de metabolitos secundarios en varios tipos de plantas [5,6,7]. El ácido salicílico (SA), es un compuesto elicitor utilizado para estimular la transcripción de genes relacionados con la producción de metabolitos secundarios y está relacionado con varias vías de respuesta de defensa de la planta. El objetivo general de este trabajo fue analizar el efecto del ácido salicílico como inductor de la actividad de PAL (fenilalanina amonio liasa) en plantas de cilantro.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Se utilizó semilla comercial de cilantro (*Coriandrum sativum* L.) producida por Rancho los Molinos (Tepoztlán, Morelos, México). Se utilizaron macetas de 15 cm de diámetro con una altura de 10.8 cm. Se agregó sustrato, con turba marca P*remier*, vermiculita y agrolita (60:20:20 p/p). Las plantas se regaron con agua purificada.

Métodos

Establecimiento de cultivo

Se sembraron diez semillas de cilantro por maceta preparada con 700 g de sustrato estéril. Las macetas se regaron diariamente con 200 ml de agua purificada.

Extracción de compuestos fenólicos y flavonoides

Para la extracción de compuestos fenólicos se empleó la técnica descrita por Kim y col. [7]. Se pesó 1 g de material vegetal seco y pulverizado, se le agregaron 20 ml de metanol absoluto, la suspensión se sonicó (35 KHz) por 20 minutos y se filtró. Se realizó un lavado con 5 mL de metanol. Los extractos se

recolectaron en un matraz volumétrico de 50 mL. El extracto se filtró y se conservó en frasco ámbar, para la determinación de fenoles y flavonoides totales.

Determinación de fenoles totales

Se utilizó la técnica modificada de Kim y col. [7], se partió de alícuotas de 30 µl para extractos de muestras foliares y 100 µl para extractos de tejido radicular, se agregaron 100 µl de reactivo de Folin y Ciocalteu. Después de 5 min, se agregaron 100 µl de $Na_2 CO_3$ al 7% (p/v) y se aforó con metanol a 1 ml, agitando vigorosamente. Posteriormente, se procedió a incubar por 60 min, se midió la absorbancia (Spectronic 20 Genesys®, USA) a una longitud de onda de 750 nm. La concentración de compuestos fenólicos se calculó mediante una ecuación de regresión y la curva de calibración de ácido gálico (0-500). El contenido de fenoles totales del material vegetal se expresó en mg equivalentes de ácido gálico (GAE)/100 g de muestra fresca. Se realizaron tres repeticiones.

Determinación de flavonoides totales

El contenido de flavonoides totales se determinó de acuerdo al método colorimétrico descrito por Zhishen y col. [8], con modificaciones. Se partió de alícuotas de 30 µl para áreas foliares y 100 µl para partes radiculares, se agregaron 400 µl de agua destilada para el tiempo cero, después se agregaron 0.3 mL de una solución de $NaNO_2$ al 5% (p/v). Después de 5 min, se añadieron 0.3 mL de $AlCl_3$ al 10% (p/v). A los 6 min, se agregaron 2 mL de NaOH 1 M, se diluyó llevando el volumen a 1 ml con agua destilada. Inmediatamente, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 510 nm (Spectronic 20 Genesys®, USA). La concentración de flavonoides se calculó mediante una ecuación de regresión y la curva de calibración de catequina (0-250 mg/L). El contenido de flavonoides totales del material vegetal fue expresado en mg equivalente de catequina (CE)/100 g de muestra fresca.

Extracción de proteínas

Se pesó 1 g de material vegetal, se pulverizó con nitrógeno líquido, posteriormente se agregaron 10 ml de buffer de boratos 0.1 M se ajustó el pH a 8.8; posteriormente, se centrifugó a 28,000 g por 30 minutos a 4° C, el sobrenadante se recuperó y se almacenó a 4°C.

Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas totales se determinó por el método de Bradford [9]. Se partió del extracto proteico, se realizó una curva de patrón (0.05 a 5 mg/ml) de donde se dedujo la ecuación de regresión para la cuantificación proteica. En un tubo de 1.5 ml se agregaron 200 µl del reactivo Bradford al 20%, posteriormente se le añadieron 10 µl de muestra, la mezcla se agitó, se dejó incubar por al menos de 5 minutos, se determinó la absorbancia a 595-465 nm. La determinación de proteínas se realizó a las 24 y 48 horas posteriores a la elicitación de la muestra, las plantas fueron elicitadas con agua, ácido salicílico y Antigard® .

Determinación de actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL)

Para la determinación enzimática de PAL se siguió la metodología modificada de Martínez y Téllez [10]. Se partió del extracto de proteínas descrito previamente. Se agregaron 30 µL de extracto para áreas foliares y 100 µl para partes radiculares en un tubo Epppendorf. La actividad enzimática se determinó en los extractos crudos, mediante cuantificación del ácido cinámico generado por la enzima a una longitud de onda de 270 nm. Para realizar la cuantificación espectrofotométrica del ácido cinámico, se realizó una curva de calibración (270 nm). Los resultados en esta parte se expresaron como actividad específica

(nmoles ácido cinámico/mg proteína*min) y como actividad por gramo de material vegetal (nmoles ácido cinámico/g material vegetal).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cultivo de las plantas

El porcentaje de geminación que se obtuvo a los 7 días, posterior a la siembra fue del 82%, se obtuvieron plantas sanas sin ningún síntoma de clorosis o deficiencia nutrimental, se regaron con agua purificada, a los 30 días se elicitarón con ácido salicílico, la cual fue asperjada con una solución de 250 µM por 10 segundos en la parte foliar. Otro grupo de plantas se elicitó con un producto comercial (Singenta®) llamado Antigard® el cual es un derivado del ácido salicílico (acibenzolar-S-metil (S-metil benzo [1,2,3] tiadiazol-7-carbotioato).

Determinación de proteínas

El contenido de proteínas existente en raíz y en hojas es diferente, encontramos una mayor abundancia en el tejido aéreo en comparación con las partes radiculares en una proporción de tres a uno, aproximadamente (Fig. 1). En raíz, el contenido proteínas no se ve afectado por los elicitores utilizados. En hojas, se observa el incremento en el contenido de proteínas totales por efecto del elicitor; con el ácido salicílico el incremento se observó a las 24 horas; pero, con el reactivo Antigard® el incremento se detectó a las 48 horas. Como se parecía en la figura el incremento en la biosíntesis de proteínas en hojas es mayor con el ácido salicílico een comparación con el reactivo Antigard® ; sin embargo, la diferencia no es significativa.

Determinación de actividad de PAL

La actividad de PAL a las 24 horas posteriores a la elicitación en hojas no presenta cambios en su actividad; por otra parte, a las 48 horas se redujo la actividad de la proteína en comparación con el control. La actividad de PAL se encuentra ligeramente incrementada a las 48 horas en las partes radiculares cuando las plantas son estimuladas con ácido salicílico. Sin embargo se observa una mayor actividad de la enzima PAL en las hojas que en las partes radiculares (fig. 2).

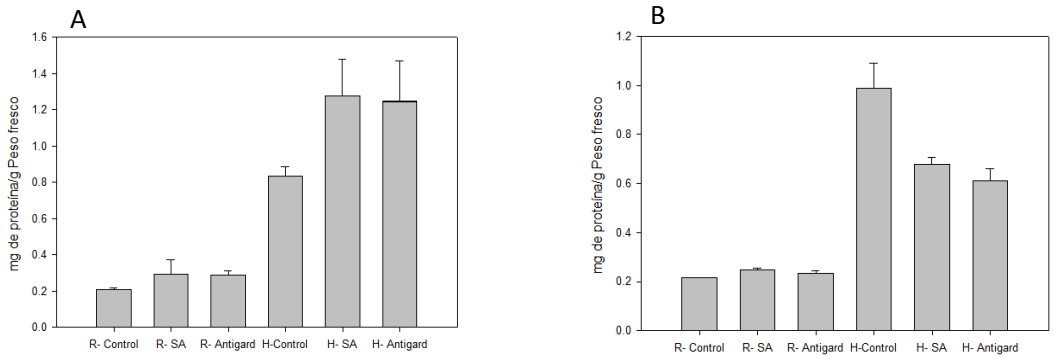


Figura 1. Determinación de proteínas de R- control (Raíz de muestra control), R-SA (Raíz de muestra elicitada con 250 µM de ácido salicílico), R-Antigard® (Raíz de muestra elicitada con 250 µM de

Antigard®) y H- control (Hoja de muestra control), H-SA (Hoja de muestra elicitada con 250 µM de ácido salicílico), H-Antigard® (Hoja de muestra elicitada con 250 µM de Antigard®) posterior al tiempo de elicitación a las 24 (imagen A) y a las 48 (imagen B) horas.

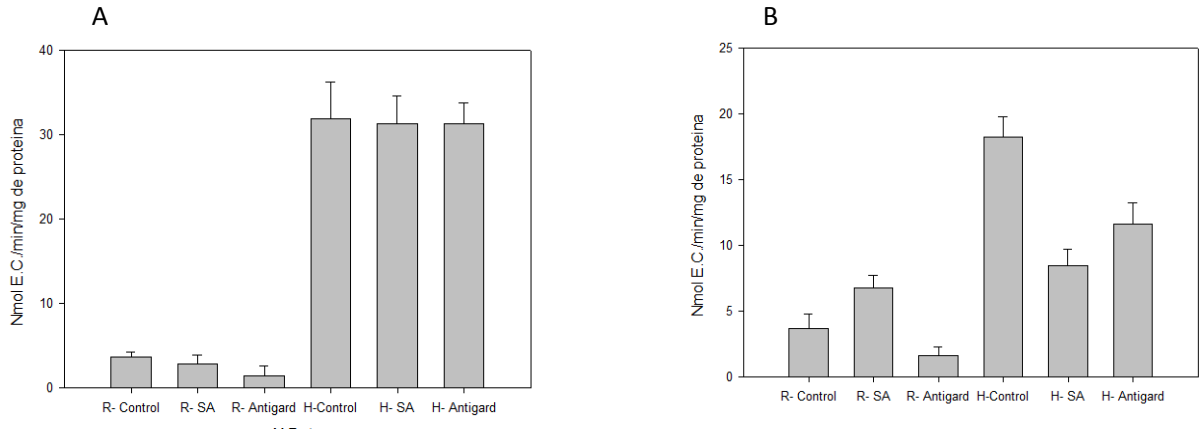


Figura 2. Determinación de actividad de PAL de R- control, R-SA, R-Antigard® , H- control, H-SA y H-Antigard® posterior al tiempo de elicitación a las 24 (imagen A) y a las 48 (imagen B) horas.

Determinación de compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos se acumularon principalmente en hojas, 24 horas después de la adición de ácido salicílico y Antigar®. Por otra parte, no se observan cambios importantes en las partes radiculares al mismo tiempo de valuación.

Por otra parte, a las 48 horas se reduce la acumulación de compuestos fenólicos. La acumulación de compuestos fenólicos se encuentra estimulada a las 48 horas en las hojas cuando son elicitadas por el ácido salicílico. Sin embargo se observa una mayor acumulación de compuestos fenólicos en las hojas que en las partes radiculares.

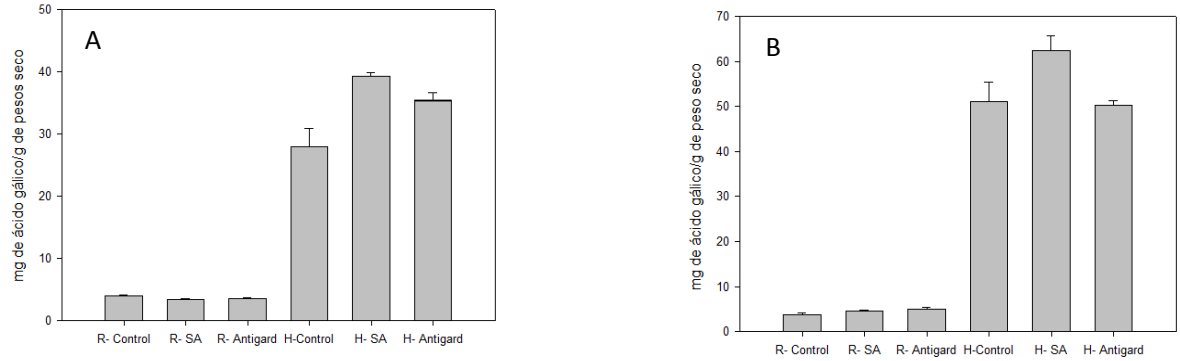


Figura 3. Cuantificación de compuestos fenólicos de R- control, R-SA, R-Antigard® , H- control, H-SA y H-Antigard® posterior al tiempo de elicitación a las 24 (imagen A) y a las 48 (imagen B) horas.

Determinación de flavonoides

En la figura 4, se muestran los resultados correspondientes a la concentración de flavonoides en las plantas elicitadas. Como se puede observar, en las partes radiculares la acumulación de flavonoides es escasa y se observa una diferencia contrastante con los resultados a partir de hoja.

Se observó la acumulación de flavonoides totales en hojas a las 24 horas posteriores a la elicitación con ácido salicílico; pero a las 48 horas, bajó la concentración. Estos resultados son congruentes con los reportados por Divya y col. [7]; en donde se reporta que la adición de ácido salicílico, estimuló la biosíntesis de compuestos fenólicos. Por otra parte no presenta cambios sustanciales en las partes radiculares durante el mismo tiempo de valuación.

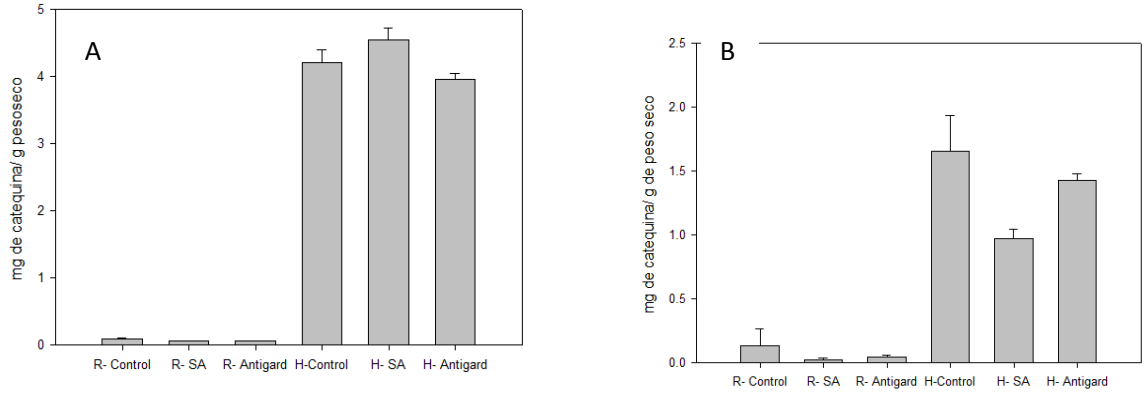


Figura 4. Acumulación de flavonoidesen respuesta a la elicitación. R- control, R-SA, R-Antigard® , H-control, H-SA y H-Antigard® a las 24 posterior al tiempo de elicitación (imagen A) y a las 48 (imagen B) horas.

CONCLUSIÓN

El ácido salicílico induce la acumulación de flavonoides y la actividad enzimática de PAL en plantas de cilantro a las 24 horas posterior a su elicitación en hojas de las plantas de cilantro y presenta un efecto potenciador en la acumulación en el contenido de compuestos fenólicos a las 24 y 48 horas. Por otra parte, con el reactivo Antigard®

REFERENCIAS

[1] Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). *Fisiologia vegetal* (Vol. 10). Universitat Jaume I.

Trejo-Tapia, G. y Rodríguez-Monroy, M. 2007. La agregación celular en la producción de metabolitos secundarios en cultivos vegetales in vitro. Interciencia 32(10): 669-674.

[2] Wink, M. (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, *64*(1), 3-19.

[3] Mahendra, P., Bisht, S. (2011). Anti-anxiety activity of Coriandrum sativum assessed using different experimental anxiety models. *Indian journal of pharmacology*, *43*(5), 574.

[4] Puthusseri, B., Divya, P., Lokesh, V., & Neelwarne, B. (2012). Enhancement of folate content and its stability using food grade elicitors in coriander (Coriandrum sativum L.). *Plant foods for human nutrition*, *67*(2), 162-170.

[5] Divya, P., Puthusseri, B., & Neelwarne, B. (2012). Carotenoid content, its stability during drying and the antioxidant activity of commercial coriander (Coriandrum sativum L.) varieties. *Food Research International*, *45*(1), 342-350.

[6] Divya, P., Puthusseri, B., & Neelwarne, B. (2014). The effect of plant regulators on the concentration of carotenoids and phenolic compounds in foliage of coriander. *LWT-Food Science and Technology*, *56*(1), 101-110.

[7] Kim, D. O., Jeong, S. W., & Lee, C. Y. (2003). Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food chemistry*, *81*(3), 321-326.

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

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

[10] Martinez-Tellez, M. A., & Lafuente, M. T. (1997). Effect of high temperature conditioning on ethylene, phenylalanine ammonia-lyase, peroxidase and polyphenol oxidase activities in flavedo of chilled‹ Fortune› mandarin fruit.*Journal of Plant Physiology*, *150*(6), 674-678.

ANTIMCROBIAL ACTVITY OF *Simsia sp.* EXTRACTS

(Actividad antimicrobiana de extractos de *Simsia sp.*)

Lauro Daniel Aguilar-Ramírez[a*+], Montserratt Herrera-Martell[a], Juan Rodrigo Salazar[b], Anabelle Cerón-Nava[c] Juan Rosales-Guevara[d]

[a] Universidad La Salle A. C. Estudiante, Facultad de Ciencias Químicas
[b] Universidad La Salle A. C. Profesor-Investigador de tiempo completo, Facultad de Ciencias Químicas
[c] Universidad La Salle A. C. Responsable del laboratorio de Microbiología, Facultad de Ciencias Químicas
[d] Universidad La Salle A. C. Responsable del área de análisis Químico, Facultad de Ciencias Químicas

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: lauroaguilar@lasallistas.org.mx

Área del Conocimiento: Química de Productos Naturales.

ABSTRACT
The acahual term is used to describe a series of invasive plants that grows as secondary species associated with crops. Among the species known as “acahuales” we found some plants of the *Simsia* genus, which are characterized by white or yellow inflorescence and seeds that in contact with clothing or hair sticks, this is a hallmark of these species. An alternative strategy to combat this secondary flora is to give it an added value, so doing a bibliographic research it was found that some of these species are ascribe as a medical treatment for the so-called “mal de orín” mainly caused by some microorganism as *Escherichia coli* or some species of the *Candida* genus. The sensibility of *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Candida albicans, Candida parpsilosis, Candida neoformans y Candida tropicalis* was tested with hexane, ethyl acetate and methanol extracts of flowers and stem of this plant by the microdilution method for the determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC). The results shows that the *Simsia sp.* inhibit mostly tested strains, especially *C. albicans, C. parapsilosis, C. neoformans, C. tropicalis* with MIC’s about 100 to 25 µg/mL, therefore it requires more research of the plant species, as well as the compounds in the extracts. This suggests the continuity of the research about the development of a drug of natural origin with antimicrobial activity.

Keywords: Medicinal plants; traditional medicine; minimum inhibitory concentration; acahual; microbiology.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

THE CHEMICAL AND COLORIMETRIC STUDY OF "AGRILLO" *(Rhus sp.)*

[a]Calderón Gómez I.*, Bustillos G. [b]; Salazar J.R. [a]*

[a] Universidad La Salle, Mexico DF.
[b] BUSTAR ALIMENTOS

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: juan.rodrigo.salazar@gmail.com

Área del Conocimiento: Química de Productos Naturales.

ABSTRACT
The chemical study of the fruit popularly known as "agrillo" was conducted. "Agrillo" comes from the state of Jalisco and is used in the traditional cuisine of the state, mainly in the preparation of sauces and as a condiment; this study seeks to identify those responsible color components and propose its use as a natural dye, because most synthetic ones are toxic and that´s why here is trying to look for another alternative. There were prepared tree extracts with hexane, ethyl acetate and methanol, which have deep red hue. They were conducted microbiological testing of extracts using the technique of "disk diffusion" to see if they have an antibiotic effect, which were negative. The gas/mass spectra of each extract were obtained; then were performed extractions with dichloromethane/water of each extract and there were obtained colorful organic phases, that were subjected to UV spectrum, trying to deduce potential carotenoids based on absorbencies and bibliographic data. Chromatographic separation on column and TLC of each extract was performed. Elution was made with mixtures of solvents of increasing polarity. From each fraction were obtained the curves from 700 to 200 nm in UV spectrometry. Then, a basic hydrolysis of the hexanic extract was performed, and then it was extracted with ethyl acetate and obtaining IR and UV spectra of the organic phase, that has orange color. Finally, a color curve of the extracts ethyl acetate and hexane was calculated at different concentrations, deciding not to use the methanolic extract because its solubility problem; the color results were between (0.35-0.45, 0.4-0.3) in Minolta CR-300 colorimeter´s scale.

Keywords: Carotenoids; Natural dye; Agrillo.

ANTIFUNGAL ACTIVITY OF *Simsia sp* EXTRACTS IN IMPORTANT STRAINS IN FOOD INDUSTRY

(Actividad antifúngica en cepas con importancia en la industria alimentaria de extractos de *Simsia sp*)

Montserratt Herrera-Martell[a*+], Lauro Daniel Aguilar-Ramírez[a], Juan Rodrigo Salazar[b], Anabelle Cerón-Nava[c]

[a] Universidad La Salle A. C. Estudiante, Facultad de Ciencias Químicas
[b] Universidad La Salle A. C. Profesor-Investigador de tiempo completo, Facultad de Ciencias Químicas
[c] Universidad La Salle A. C. Responsable del laboratorio de Microbiología, Facultad de Ciencias Químicas

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: effy014@gmail.com

Área del Conocimiento: Química de Productos Naturales.

ABSTRACT
In food industry, some microorganisms can be harmful for food production and for the consumer. Among those microorganisms are included filamentous fungi as the strains of the genus *Rhizopus, Aspergillus* and *Penicillium* and others, which are generally developed on cereals, by-products and fruits. Among the species known as "acahuales", we found some plants of the *Simsia* genus, which are characterized by white or yellow inflorescence and seeds that in contact with clothing or hair sticks, this is a hallmark of these species. An alternative strategy to combat this secondary flora is give it an added value. The resistance of this plant to environmental factors and invasion of insects and lower organisms claimed the attention to evaluate its activity in fungi strains. The sensibility of *Penicillium notatum, Rhizopus sp, Aspergillus sp, Aspergillus nidulans, Aspergillus oryzae* y *Aspergillus niger* was tested with hexane, ethyl acetate and methanol extracts of flowers and stem by the microdilution method. The results showed morphological variations of strains in all the concentrations tested, finding growth inhibition with hexanolic and methanolic extracts, whereas the ethyl acetate extract fostered the growth of strains. Therefore, it requires more research of the plant species, as well as the compounds in the extracts and the morphological changes in fungi strains. This suggests the continuity of the research about the development of a food preservative of natural origin with antifungal activity.

Keywords: Food preservative; Natural product; minimum inhibitory concentration; acahual; microbiology.

SELECTION OF MICRO AND NANO-ENCAPSULATION CONDITIONS OF ANTHOCYANINS FROM BLACK BEAN (*Phaseolus vulgaris L*. VAR. QUERÉTARO)

[Selección de las condiciones de micro y nanoencapsulación de antocianinas provenientes de frijol negro (*Phaseolus vulgaris L*. Var. Querétaro)]

Jesús Salvador Navarrete Zapién[a]*, Eugenia del Carmen Lugo Cervantes[a+].

[a] Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. Unidad de Tecnología Alimentaría / Av. Normalistas No. 800 Colinas de la Normal, Guadalajara, Jalisco. C.P. 44270

*Autor que presentó el trabajo.

+Autor para correspondencia: elugo@ciatej.mx

Área del Conocimiento: Química de Productos Naturales.

ABSTRACT

In Mexico, legumes are an important part of the diet in most of the population. These include the black bean (Phaseolus vulgaris L. Var. Querétaro) to be a variety that is consumed mainly in México. Several studies have reported the importance by the presence of phenolic compounds, mainly in the husk and its color is determined by the presence of anthocyanins. In the same scale they are associated with glycosylated flavonoids, condensed tannins which are a source of antioxidants with anticarcinogenic and antimutagenic properties. The objective of this work was the micro and nano-encapsulation of phenolic compounds extracted black bean (Phaseolus vulgaris L. Var. Querétaro) to maintain their antioxidant activity. Extraction was performed using ethanol acidified at 1%, the anthocyanin content and antioxidant activity was determined before and after the micro and nanoencapsulation made by spray drying. The concentration of anthocyanins in black bean extract was 8.19 mg Eq. Cyanidin -3-glycosidic / 100 g bean flour with an antioxidant activity of 365.48 TEAC µmol / g bean flour. The encapsulation was performed using a ratio maltodextrin DE 10 and gum arabic as encapsulant for determining the best proportion of these agents by measuring the z potential y particle size where the best ratio it 70:30 (maltodextrin: gum arabic). With a yield of microencapsulated from 87.33% at 150 ° C, with a concentration of anthocyanins 26.2967 mg Eq. Cyanidin -3-glycosidic / 100 g microencapsulated and a yield in nanoencapsulated from 56.25% with a concentration of anthocyanins 14.74705 mg Eq. Cyanidin-3-glycosidic / 100g nanoencapsulated at 120 ° C.

Keywords: anthocyanins, antioxidant activity, microencaosulatio, nanoencapsulation.

RESUMEN

En México, las leguminosas son una parte importante de la dieta en la mayor parte de la población. Estos incluyen el frijol negro (Phaseolus vulgaris L. var. Querétaro) al ser una variedad que se consume principalmente en México. Varios estudios han informado de la importancia por la presencia de compuestos fenólicos, principalmente en la cáscara y su color está determinado por la presencia de antocianinas. En la misma escala que están asociados con los flavonoides glicosilados, taninos condensados que son una fuente de antioxidantes con propiedades anticancerígenas y antimutagénicas. El objetivo de este trabajo fue la micro y nano-encapsulación de compuestos fenólicos extraídos de frijol

negro (*Phaseolus vulgaris* L. var. Querétaro) para mantener su actividad antioxidante. La extracción se realizó usando etanol acidificado al 1%, se determinó el contenido de antocianinas y la actividad antioxidante antes y después de la micro y nanoencapsulación hecho mediante secado por aspersión. La concentración de antocianinas en el extracto de frijol negro fue 8.19 mg Eq. Cianidina-3-glucosídico / 100 g de harina de frijol con una actividad antioxidante de 365,48 TEAC µmol / g de harina de frijol. La encapsulación se realizó utilizando una relación de maltodextrina DE 10 y goma arábiga como encapsulante para determinar la mejor proporción de estos agentes mediante la medición del tamaño de partícula y potencial z, donde la mejor relación es 70:30 (maltodextrina: goma arábiga). Con un rendimiento de microencapsulado del 87,33% a 150 ° C, con una concentración de antocianinas 26.2967 mg Eq. Cianidina -3-glicosídico / 100 g microencapsulado y un rendimiento en nanoencapsulados de 56.25% con una concentración de antocianinas 14.74705 mg Eq. Cianidina-3-glucosídico / 100g nanoencapsulados a 120 ° C.

Palabras Clave: antocianinas, actividad antioxidante, microencapsulación, nanoencapsulación.

INTRODUCCIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris L.)* es el segundo frijol más importante del mundo al ser un alimento que se consume por la población en América. El frijol negro es una de las fuentes considerable de calcio, hierro, fósforo, magnesio, zinc y de vitaminas entre las que destacan tiamina, niacina y ácido fólico así como también estudios han informado de su importancia por la presencia de compuestos fenólicos [3]. Últimamente se está desarrollando investigación sobre las características por su contenido de compuestos fenólicos en frijol, por las actividades antimutagénica y antioxidante que benefician la salud [7].

En la semilla de frijol contiene diferentes compuestos fenólicos, contenidos principalmente en la cascarilla y en la misma escala que están asociados con los flavonoides glicosilados, taninos condensados y antocianinas [6, 15, 16, 18]. Las antocianinas son glucósidos de antocianidinas, pertenecientes a la familia de los flavonoides, compuestos por dos anillos aromáticos α y β unidos por una cadena de tres carbonos [10].Las antocianinas aisladas de frijol negro han mostrado actividad antioxidante en un sistema de ácido linoleico [20]. Estos compuestos son colorantes naturales que han suscitado interés debido a su carácter no tóxico e hidrosolubles, presentan una baja estabilidad al ser sensibles a cambios de pH, temperatura, luz, oxigeno siendo la principal limitación de estos pigmentos sin dejar de lado las propiedades antioxidantes, anticancerígenas y antimutagénicas [5, 11]. Esto hace que la determinación de los compuestos antioxidantes en frijol negro sea objeto de numerosos estudios, para su aprovechamiento como aditivos en los alimentos con la finalidad de preservar estos compuestos con la encapsulación para aumentar su biodisponibilidad [9].

Las aplicaciones de técnicas de micro y nanoencapsulación han ido incrementándose en la industria de los alimentos, debido a la protección de los materiales encapsulados frente a diferentes factores que afectan su vida útil, permitiendo, mantener su estabilidad y viabilidad en el tiempo [13, 14]. En comparación con otros métodos, el secado por aspersión proporciona una eficiencia de encapsulación relativamente alta. En un proceso de secado por aspersión se deben tener en cuenta algunos parámetros como: temperatura de entrada y salida del aire de secado, el flujo de alimentación del producto a secar, la concentración de agente encapsulante y el acondicionamiento de la materia prima [9].

El objetivo del presente trabajo fue el cuantificar los compuestos fenólicos, evaluar su actividad antioxidante y establecer condiciones para micro y nanoencapsulación de antocianinas provenientes de frijol negro.

METODOLOGÍA

Se analizo la variedad de frijol negro [*Phaseolus vulgaris L.* var., Querétaro] marca Verde Valle®. Posteriormente para la extracción se pesaron 100 gramos de harina de frijol, se le adicionó 500 mL de una solución de etanol-HCl 99:1 %v/v y metanol-HCl 99:1 %v/v, se mantuvo en agitación durante 24 horas a 25 °C. Posteriormente se centrifugó [Centrifuga, Heerlme, Germany] a 7,000 rpm durante 10 min a 4˚ C, fue filtrado a vacío para separar sólidos presentes se resuspendió en 500 mL para una agitación de 15 horas. Este proceso (centrifugación y agitación) se repitió una vez con un tiempo de agitación de 10 horas. Para concentrar el extracto y eliminar la mayoría solvente en la extracción, los extractos filtrados se colocaron en un rotavapor [BÜCHI R-220] con vacío con una temperatura de 35 ˚C. El extracto concentrado fue almacenado en frasco ámbar a 4 ˚C. Para lograr una mayor eliminación del solvente el extracto se evaporó en un concentrador al vacío [Speedvac Vacufuge] durante 6 horas a una temperatura de 30 ˚C. El extracto final se almaceno en frasco ámbar a temperatura de 4°C.
El extracto obtenido se le determinó el contenido de fenoles solubles mediante el método de Folin-Ciocalteu [17], taninos condensados [8, 19], antocianinas [1], así como su capacidad antioxidante por el método ABTS [21], y la actividad antirradical por el método del DPPH [4, 5]. Los resultados fueron expresados como la media ± la desviación estándar.

El proceso de microencapsulación y nanoencapsulación se realizó con un agente encapsulante de goma arábiga, Maltodextrina DE 10 (30:70% m/m) se disolvieron en agua desionizada con agitación durante toda una noche a temperatura ambiente (20 °C), con una concentración de 30% m/v [2, 22], y 0.02% v/v $_{(encapsulante)}$ de azida de sodio, como agente antimicrobiano. Pasado una noche de hidratación a la solución se añadió el extracto de frijol negro 20% v/v $_{(encapsulante)}$ [2, 22]. Las cuales se homogenizaron a 17´400 RPM (ULTRA-TURRAX T 25 basic-S25N-10G, IKA-Werke GmbH & Co.; Staufen, Germany) por un lapso de 6.4 minutos [2, 12], Para la nanoencapsulación se parte del agente encapsulante anterior y se alimenta a un microfluidizador (M-110P, Microfluidics, Westwood USA) con una presión de 20´000 psi y 5 pasos de microfluidización, previa selección en función a: tamaño de partícula y de potencial zeta.

RESULTADOS

Los resultados en cuanto a la extracción de compuestos fenólicos se decide trabajar con etanol al ser un producto alimenticio con rendimiento en la extracción de 100g de harina de frijol fue 14.4 g de extracto con una concentración de antocianinas de 8,19 ± 1,2 de mg Eq. Cianidina 3 glucosídico /100 g de harina de frijol con una actividad antioxidante de 365,48±1.82 µM TEAC/ g de harina de frijol y un 51.216±1.8 % de actividad antirradical, con concentración de fenoles totales de 864,52±14,8mg Eq. Ácido Gálico/100 g de harina de frijol, 167.48 ± 11.08 mg Eq. (+)-catequina /100 g de harina de frijol en cuanto a las cuantificaciones realizadas para el extracto antocianídico; las cuantificaciones del microencapsulado resultaron con una concentración de antocianinas de 26,29671±0.41 mg Eq. Cianidina 3 Glucosídico /100 g de encapsulado, fenoles totales de 795.17±47.38 mg Eq. Ácido Gálico/100 g de encapsulado, taninos condensados de 74.66 ±3.77 mg Eq. (+)-catequina /100 g de encapsulado y con una actividad antioxidante de 353.89±9.07 µM TEAC/ g de encapsulado y un 51.60±2.096 % de actividad antirradical, mientras que en las cuantificaciones del nanoencapsulado resultaron con una concentración de antocianinas de 14,74705±0,8 mg Eq. Cianidina 3 Glucosídico /100

g de encapsulado, fenoles totales de 779,40±97.7 mg Eq. Ácido Gálico/100 g de encapsulado, taninos condensados de 239.67±24.57 mg Eq. (+)-catequina /100 g de encapsulado y con una actividad antioxidante de 162.60±9.014 µM TEAC/ g de encapsulado y un 82.85± 8.34 % de actividad antirradical como se muestra en la (tabla 1). Lo que indicaría de acuerdo a la diferencia en cuanto las cuantificaciones es viable el proceso de microencapsulación para mantener una alta estabilidad de los compuestos microencapsulado.

Tabla 1. Cuantificación de compuestos fenólicos en extracto y encapsulados de frijol negro

Muestra		**Extracto de frijol negro**			
Condiciones	Fenoles totales *mg Eq AG/100g frijol*	Antocianinas *mg Eq C-3-G/100 g frijol*	Taninos condensados *mg EqC/100g frijol*	TEAC *µmol ET/g frijol*	ARA *%*
Et OH Acid.	864,52±14,8	8.19 ± 3,2	167.48±11.08	365.48±1.82	51.216±1.8
Me OH Acid.	1025,9±57,71	10.97 ± 5	229.80±0.328	651.595 ±2.27	48.870 ±23.0
		Microencapsulado de frijol negro			
Condiciones	Fenoles totales *mg Eq AG/100g encapsulado*	Antocianinas *mg Eq C-3-G/100g encapsulado*	Taninos condensados *mg EqC/100g encapsulado*	TEAC *µmol ET/g encapsulado*	ARA *%*
150˚C (20% de extracto, 30 % solidos 100 MD)	645.87±41.91	17.6643±0,18	103.35±2.70	315.62±13.26	48.72±1.31
150˚C (20% de extracto30 % solidos 70:30 MD-GA).	795.17±47.38	26.29671±0.41	239.67±24.57	353.89±9.07	51.60±2.096
		Nanoencapsulado de frijol negro			
Condiciones	Fenoles totales *mg Eq AG/100g encapsulado*	Antocianinas *mg Eq C-3-G/100 g encapsulado*	Taninos condensados *mg EqC/100g encapsulado*	TEAC *µmol ET/g encapsulado*	ARA *%*
120˚C (20% de extracto30 % solidos	779,40±97.7	14,74705±0,8	74.66 ±3.77	162.60±9.014	82.85± 8.34

70:30 MD*-GA*).

Et OH Acid.; (etanol-HCl, 99:1 %v/v), Me OH Acid.; (metanol-HCl 99:1 %v/v) mg Eq. Cianidina 3 Glucosídico /100 g de harina de frijol; fenoles totales mg Eq. Ác. Gálico/100 g de harina de frijol; taninos mg Eq. (+)-catequina /100 g de harina de frijol; TEAC es la capacidad expresados en µmol equivalentes de Trolox/ g de harina de frijol por el método de ABTS; ARA es la actividad antirradical por el método de DPPH expresado porcentaje de la capacidad antirradical. MD* (Maltodextrina) - GA* Goma arábiga. Los valores para las antocianinas están reportados en mg Eq. Cianidina 3 Glucosídico /100 g de encapsulado; fenoles totales mg Eq. Ác. Gálico/100 g de encapsulado; taninos mg Eq. (+)-catequina /100 g de encapsulado; TEAC es la capacidad expresados en µmol equivalentes de Trolox/ g de encapsulado por el método de ABTS; ARA es la actividad antirradical por el método de DPPH expresado porcentaje de la capacidad antirradical. Los resultados representan la media de tres experimentos independiente ±DE.

Las pruebas para determinar el agente encapsulante por las distribuciones de tamaño de partícula de las diferentes diluciones que se prepararon a partir de la correspondiente relación maltodextrina: goma arábiga (m/m). La lectura del tamaño de partícula y potencial z fue la relación 70-30% (tabla 2) Maltodextrina-Goma Arábiga, puesto que a esta concentración se evitó la superposición entre las partículas en el momento de la lectura. De acuerdo a los resultados se decide tomar la emulsión con 20 % solidos (70 % Maltodextrina 30 % goma arábiga) por presentar estabilidad en cuanto a su potencial z de -17.862 y presentar un tamaño de partícula de 361.92 nm además de proporcionar mayor estabilidad y protección a las moléculas encapsuladas

En el proceso de microencapsulado presenta más rendimiento además una importante punto es que el equipo es más fácil la el manejo y se ve reflejado en los gramos obtenidos y en cambio el proceso del nanoencapsulado una gran desventaja es el tiempo es más prolongado al desmontar el equipo los resultados se expresan en la tabla 2.

Tabla 2. Resultados de micro y nanoencapsulado en relación al agente encapsulante para el secado por aspersión utilizando goma arábiga y maltodextrina

Muestra		**Microencapsulado**					
Temperaturas del Microencapsulado	*Homogenización (RPM)*	*Índice de refracción*	*pH*	*Potencial Z*	*Tamaño de partícula*	*Rendimiento %*	*Gramos obtenidos (g)*
150 ˚C (GA (30%): MD (70%)	17400	1.3325	6-7	-17.862	361.92 nm	87.33 %	10.48g

150 ˚C (MD (100%)	17400	1.3325	6-7	-11.266	326.2 nm	88.33 %	11.48g

Muestra		**Nanoencapsulado**					
Temperaturas del Nanoencapsulado	*Microfluidización (pasos)*	*Índice de refracción*	*pH*	*Potencial Z*	*Tamaño de partícula*	*Rendimiento %*	*Gramos obtenidos (g)*
120 ˚C (GA (30%): MD (70%)	5	1.3303	6-7	-9.914	102.02 nm	45.83 %	1.1g

MD* (Maltodextrina) - GA* Goma arábiga.

CONCLUSIONES

Mediante el presente estudio se logró establecer una metodología de extracción de antocianinas a partir de la harina de frijol negro var., Querétaro. La metodología desarrollada brindó un extracto con una concentración significativa de antocianinas, además de mantener la capacidad antioxidante de las mismas. Respecto al proceso de encapsulación de antocianinas, la microencapsulación ofrece mejor rendimiento en cuanto a la cantidad de extracto encapsulado. Es importante mencionar que la capacidad antioxidante no se vio afectada por el proceso de encapsulamiento.

REFERENCIAS

[1] Abdel-Aal, E-S. M. and Hucl, P., (1999). “A rapid method for quantifying total anthocyanins in blue aleurone and purple pericarp wheats.” *Cereal Chemistry*. **76(3)**: 350-354.

[2] Baranauskiene, R., Bylaité, E., Zukauskaité, J.y Venskutonis, R. P. (2007). "Flavor retention or peppermint (Mentha piperita L.) essential oil spray-dried in modifed starches during encapsulation and storage." Journal of Agricultural and food chemistry **55**: 3027-3026.

[3] Bravo, L., Siddhuraju, P. and Saura-Calixto, F. (1998). “Effect of various processing methods on the vitro starch digestibility and resistant starch content on Indian pulses”. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **46 (11)** : 4667-4674.

[4] Burda, S. and Oleszek W., (2001). “Antioxidant and antiradical activities of flavonoids.” Journal of Agricultural and Food Chemistry. **49**: 2774-2779.

[5] Cardador Martínez A., Loarca Piña y Oomah BD, (2002). “Antioxidant activity in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.).” Journal of Agricultural and Food Chemistry. **50:** 6975-6980

[6] Choung, C. (2003). “Anthocyanins profiles of Korean kidneys beans (*Phaseolus vulgaris* L.)”. Journal Agriculture of Food Chemistry. **24**: 740-743.

[7] Debouck, D. G. (1987). “Primary diversification of *Phaseolus* in the Americas: three centers? FAO/IBPGR”. Plant Gen. Res Newsl. **67**: 2 -8.

[8] Desphande, S. S. y Cheryan, M. (1985).” Evaluation of vainillin assay for tannin analysis of dry beans.” Journal of Agricultural and Food Chemistry. **50**: 905-916.

[9] García, G., M. González, H. Ochoa y Medrano, (2004). “Microencapsulación del jugo de cebada verde mediante secado por aspersión”. Revista Ciencia y Tecnología Alimentaria **4(4)** : 262-266.

[10] Garzón, G., (2008). “Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos” Acta Biológica Colombiana **13 (3)**: 27 – 36.

[11] González de Mejía, E., Castaño Tostado, E. and Loarca Piña. G. (1999). “Antimutagenic effects of natural phenolic compounds in beans.” Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ.Mutagen. **441**: 1 -9.

[12] Souza, L. G., Silva, E. J., Martins, A. L. L., Mota, M. F., Braga, R. C., Lima, E. M., Valadares, M. C., Taveira, S. F.y Marreto, R. N. (2011). "Development of topotecan loaded lipid nanoparticles for chemical stabilization and prolonged release." European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics **79**: 189-196.

[13] Olaya, C., Castaño, M., Garzón, G. (2009). “Stability of anthocyanins from *Rubus glaucus* Benth and *Solanum betaceum Cav.dark-red strain* as affected by temperature, storage time and water activity” Acta Biológica Colombiana**. 14**: 141 – 156

[14] Ribeiro, F. y P. Stringheta, (2006). “Microencapsulamiento de antocianinas”. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento **36.**

[15] Takeoka, G. R., Dao, L. T., Full, G. H., Wong, R. Y., Harden, L. A., Edwards, R. H. and Berrios, J. de J. (1997). “Characterization of black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) anthocyanins”. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **45**: 3395-3400.

[16] Romani, A., Vignolini, P., Galardi, C., Nulinacci, N., Benedettelli, S. y Heimler, D. (2004). “Germplasm characterization of Zolfino landraces (*Phaseolus vulgaris* L.) by flavonoid content.” Journal Agriculture of Food Chemistry **52**: 3838-42.

[17] Singlenton, V. L., Orthofer. R., y Lamuela-Raventos, R. M. (1999). “Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by jeans of Folin- Ciocalteu reagent.” Methods enzymol. **299**: 152-178.

[18] Salinas Moreno, Y., Rojas-Herrera, L., Sosa, Montes, E. y Pérez Herrera, P. (2005). “Composición de antocianinas en variedades de frijol negro (*Phaseolus vulgaris* L.) Cultivadas en México.” *Agrociencia.* **39**: 385-394.

[19] Ricco, R. A., Vai, V. M., Sena, G. A., Wagner, M. L., & Gurni, A. A. (2003). “Taninos Condensados de *Ephedra ochreata* Miers (*Ephedraceae*).” Acta Farm. Bonaerense*, **22(1)**: 33-37.

[20] Tsuda, T., Ohshima, K., Kawakishi, S. and Osawa, T. (1994). “Antioxidative pigments isolated from the seeds of *Phaseolus vulgaris* L.”. Journal Agriculture of Food Chemistry. **42**: 248-251.

[21] Van den Berg, R., Haenen, G. R. M., Van den Berg, H. and Bast, A. (1999). “Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures.” Food Chem. **66**: 511-517.

[22] McNamee, B. F., O´Riordan, E. D.y O´Sullivan, M. (1998). "Emulsification and microencapsulation properties of gum arabic." Journal of Agricultural and food chemistry **46**: 4551-4555.

OREGANO OIL COMBINED WITH NATURAL FOOD PRESERVATIVES AS ANTIMICROBIAL AGAINST HUMAN PATHOGENS

(Aceite de orégano combinado con conservadores naturales de alimentos como antimicrobiano contra patógenos humanos)

Zahaed Evangelista-Martínez[a], Nohemí Reyes-Vázquez[b*+], Ingrid Rodríguez Buenfil[b]

[a] Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ,A.C.) Unidad Sureste, Yucatán, México.
[b] Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ,A.C.) Unidad Noereste, Apodaca,N.L. México.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: nreyes@ciatej.mx

Área del Conocimiento: Química de Productos Naturales.

ABSTRACT
Essential oils (EOs) are promising natural antimicrobials additives employed to control food-borne pathogens within the food industry. This work examines commercial EOs antimicrobial activity alone and in combination with food preservatives against *Escherichia coli*, *Salmonella tiphymurium*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. For this purpose, an initial antimicrobial activity screening of fourteen oils was implemented using the disc-diffusion method. For the selected EOs, the Minimum inhibitory concentration (MIC) and Minimum lethal concentration (MLC) were obtained by microwell dilution methods. Furthermore, checkerboard experiments of oregano (OR) in combination with ascorbic acid (AA) or acetic acid (AcA), and time-kill curves of oregano, ascorbic acid and their combination against pathogens were implemented. *E. coli* and *S. tiphymurium* appeared to be less susceptible to EOs (6/14 and 5/14, respectively), while *S. aureus* and *C. albicans* were more affected by EOs (11 and 13, respectively). For laurel, cumin, oregano, and rosemary, the following MIC and MLC values were obtained: from 0.078 to 1.25% (v/v). Moreover, the inhibitory and lethal values of certain common preservative substances were exposed. Combination of OR:AcA showed and additive effect against *E. coli* and *C. albicans*, while OR:AA demonstrated the same effect over *S. tiphymurium* and *C. albicans*. Killing curves for OR:AA combination confirmed an indifferent effect over the growth of *E. coli* and additive for *S. tiphymurium*; a contrary effect were observed for *S. aureus* and *C. albicans* respect the results of the checkerboard test. The antimicrobial activity of EOs alone or in combination with some natural food preservatives increases the possibilities of its application as a natural antimicrobial.

Keywords: Natural preservatives, plant essential oils, ascorbic acid, oregano oil, time-kill curves.

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

OIL SEED FROM FRUITS *Rubus idaeus* GROWN IN MICHOACAN BY THE COSMETICS INDUSTRY

(Aceite de semilla de los frutos *Rubus ideaus,* cultivados en Michoacán, por la industria cosmética)

Rafael Ortiz Alvarado[a+], Rubén Chávez Rivera[a], Víctor Meza Carmen[a], Luis Alejandro García de León Rodríguez[b*].

[a] Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Cuerpo Académico-211 de Fisiopatologias. Morelia, Michoacán, México. Calle Tzintzuntzan 173 Colonia Matamoros. Morelia, Michoacan, México.C.P. 58240.
[b] p.Q.F.B. de la Facultad de Químico Farmacobiología de la [a]Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: rortizalvarado@gmail.com

Área del Conocimiento: Química de Productos Naturales.

ABSTRACT
Mexico is ranked number 14th by the size of its economy (growth domestic product) and the State of Michoacan is a leader in the production of fruits such as avocado (*Persea americana var. Hass*). In recent dates they have been introduced as fruit crops for export, to the species of the genus *Rubus spp*. like (Raspberries and blackberries). Due to strong demand and quality standards imposed target markets (USA, Europe and Asian countries), a significant amount of fruit not meet the quality criteria are discarded, becoming agroindustrial waste, which can cause pollution problems. They should consider that Mexico has a stake in the production of cosmetics 8% worldwide according to CANIPEC, 2014 (National Chamber of Industry Cosmetic) and this through multinational like Unilever, Procter & Gamble, among others, which consume avocado oil, for the manufacture of cosmetic products for the domestic market and export market (according to the Ministry of Economy). Against this background, has done an analysis of the feasibility and profitability for the production of these fruits and agricultural food waste and has implemented an extractive method for concentrating fatty acids contained in the seed of the fruit from raspberry (*Rubus idaeus)*, the oil containing polyunsaturated fatty acids like (linolenic, linoleic and oleic) no trans-conformation, makes this oil in a raw material for cosmetics. We described the method for isolated the polyunsaturated fatty acids from seed raspberry (*Rubus idaeus).*

Keywords: *Rubus fruticosus*, *Rubus idaeus,* Cosmetic, polyunsaturated fatty acids.

Grant support: Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH proyecto 2014-2015 y Proyecto de Fortalecimiento de cuerpos académicos (PRODEP) proyecto IDCA 9305, CLAVE UMNSH-CA-211.

EVALUATION OF HYPOGLYCAEMIC ACTIVITY OF AN ETHYL ACETATE EXTRACT OF *Ibervillea lindheimerii*

(Evaluación de la actividad hipoglucemiante de un extracto de acetato de etilo de la raíz de *Ibervillea lindheimeri*)

Sonia Hernández-Navia[a*+], José Luis Figueroa-Hernández[b], Adolfo Andrade-Cetto[c], Artemisa Espinoza–Hernández[c] , Gerardo Mata Torres-Valle[c], Mariano Martínez-Vázquez[a]

[a]Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, C. Exterior, C. Universitaria, Coyoacán 04510, México, D. F. México.
[b]Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, C. Universitaria, Coyoacán 04510, México, D. F. México
[c]Laboratorio de Etnofarmacología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, D.F. México.

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: uvita1989@ciencias.unam.mx

ABSTRACT
Diabetes mellitus is a metabolic disorder of multiple etiologies characterized by chronic hyperglycemia with disturbances of carbohydrate, fat and protein metabolism resulting from defects in insulin secretion, insulin action, or both. Unfortunately, most of the therapeutic agents available for the treatment of this affliction have undesirable secondary effects. It is, therefore, necessary to find new drugs to treat diabetes with higher activity with fewer side effects. In Mexico, there are more than 300 medicinal plants with traditional use as anti-diabetic remedies. One of them is the called “Wereque,” (*Ibervillea sonorae*), recently it has reported that that an aqueous extract of this species induces the glucose uptake in human adipocytes by activating a PI3K-independent pathway. It's known that there are six other species from the genus *Ibervillea* growing in Mexico. One of this species is *Ibervillea lindheimeri* (A. Gray) Greene, which has similar characteristics to *I. sonorae*. Considering the above, the objective of this project was to evaluate the effect of a root ethyl acetate (EtOAc) extract of *I. lindheimeri* on the glycemia in an animal diabetes model. Dried and ground roots of *I. lindheimeri* were subjected to successive extractions with hexane, ethyl acetate, and methanol. The hypoglycemic effect of the EtOAc extract was assessed in male Winstar rats of 200-215g to which diabetes was induced using streptozotocin (40 mg/kg). The extract was administrated by intraperitoneal injection and the glycaemia measured at 0, 15, 30, 60, 120 and 180 minutes post administration. Our results showed that the EtOAc extract (500 mg/kg) has hypoglycemic activity comparable to metformin (500 mg/kg) but the EtOAc extract did not showed activity in healthy rats.

Keywords: Diabetes *mellitus*; *Ibervillea linheimeri* ; hypoglycaemic activity .

Helicobacter pylori BIOFILM INHIBITION BY METHANOLIC EXTRACTS OF *Stenocereus marginatus* AND *Glycyrrhiza glabra*

(Inhibición del biofilm de *Helicobacter pylori* por extractos metanólicos de *Stenocereus marginatus* y *Glycyrrhiza glabra*)

Karla Ivette Leal López[a*], María Porfiria Barrón González[a+], Ramón Gerardo Rodríguez Garza[a], Sergio Moreno Limón[b]

[a] Departamento de Biología Celular y Genética, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, NL, México. Pedro de Alba s/n C.P. 66455.
[b] Departamento de Botánica, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, NL, México. Pedro de Alba s/n C.P. 66455

*Autor que presentó el trabajo.
+Autor para correspondencia: porfi_bagzz@yahoo.com.mx

Área del Conocimiento: Química de Productos Naturales.

ABSTRACT
Helicobacter pylori, gram-negative bacillus is recognized as a major worldwide cause of gastrointestinal disorders, which has developed resistance to its eradication treatment. Due to this, novel compounds that inhibit their growth have been searched. Plants have been of great interest due to the presence of substances that have been tested against several microorganisms, showing its effectiveness to inhibiting them. In this work, the antimicrobial activity of the methanol extracts of *Glycyrrhiza glabra* and *Stenocereus marginatus* on the biofilm formed by *H. pylori* was assessed and phytochemical analysis of both extracts was performed. These plants were obtained by steeping in methanol and after seven days in constant stirring, the extracts were concentrated by rotary evaporation. Next, they were carried out phytochemical tests, which consisted of colorful tests to identify the presence of important functional groups. For biofilm inhibition bioassay, it was incubated in Brucella broth for 72 h an inoculum of *H. pylori* in the presence of each extract with 4 different doses, given as a positive control of inhibition, the antibiotic ceftriaxone. Subsequently, PBS washes were performed and violet crystal was added, for eventually discolorating with alcohol/acetone and realizing an absorbance reading at 570 nm. The results of the phytochemical test indicate the presence of important secondary metabolites such as tannins, flavonoids, sterols, alkaloids and saponins. The results of the inhibition bioassay show there is significant difference ($p = 0.05$) between each of the doses used for *S. marginatus*, compared to the antibiotic. For *G. glabra* extract, concentrations of 1.0, 3.0 and 7.0 mg/mL showed no significant difference between them or concerning the control. Finally, there was significant difference between the two extracts with respect to the direct inhibition of the biofilm of *H. pylori*.

Keywords: *Helicobacter pylori*, biofilm, extract, *Stenocereus marginatus, Glycyrrhiza glabra*.



Ecological Restoration: Opportunities and Challenges to Repairing Degraded Ecosystems across the Globe

James G. Hallett
Eastern Washington University

SER SOCIETY FOR ECOLOGICAL RESTORATION

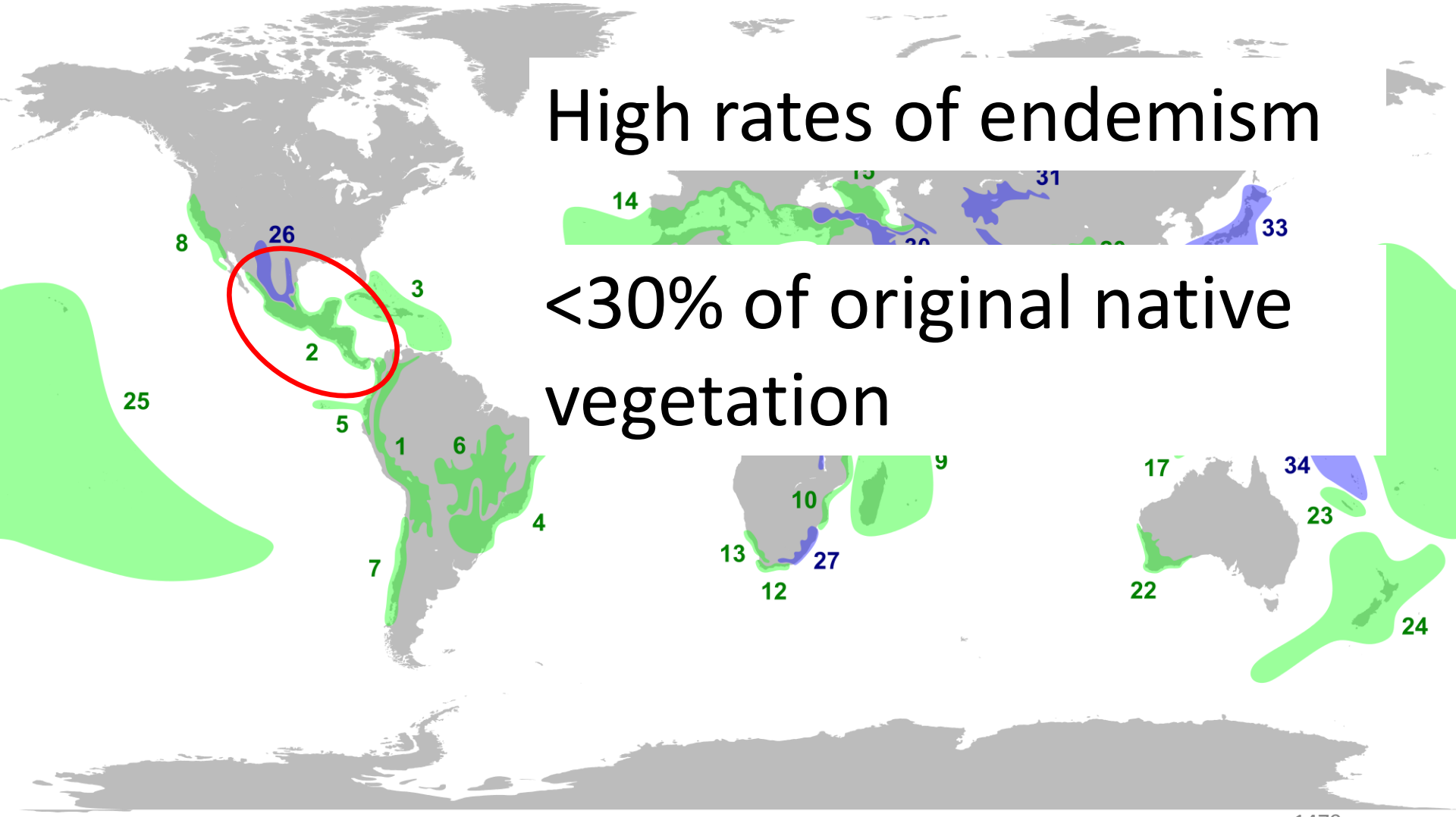


Why scientists must work together to save the world

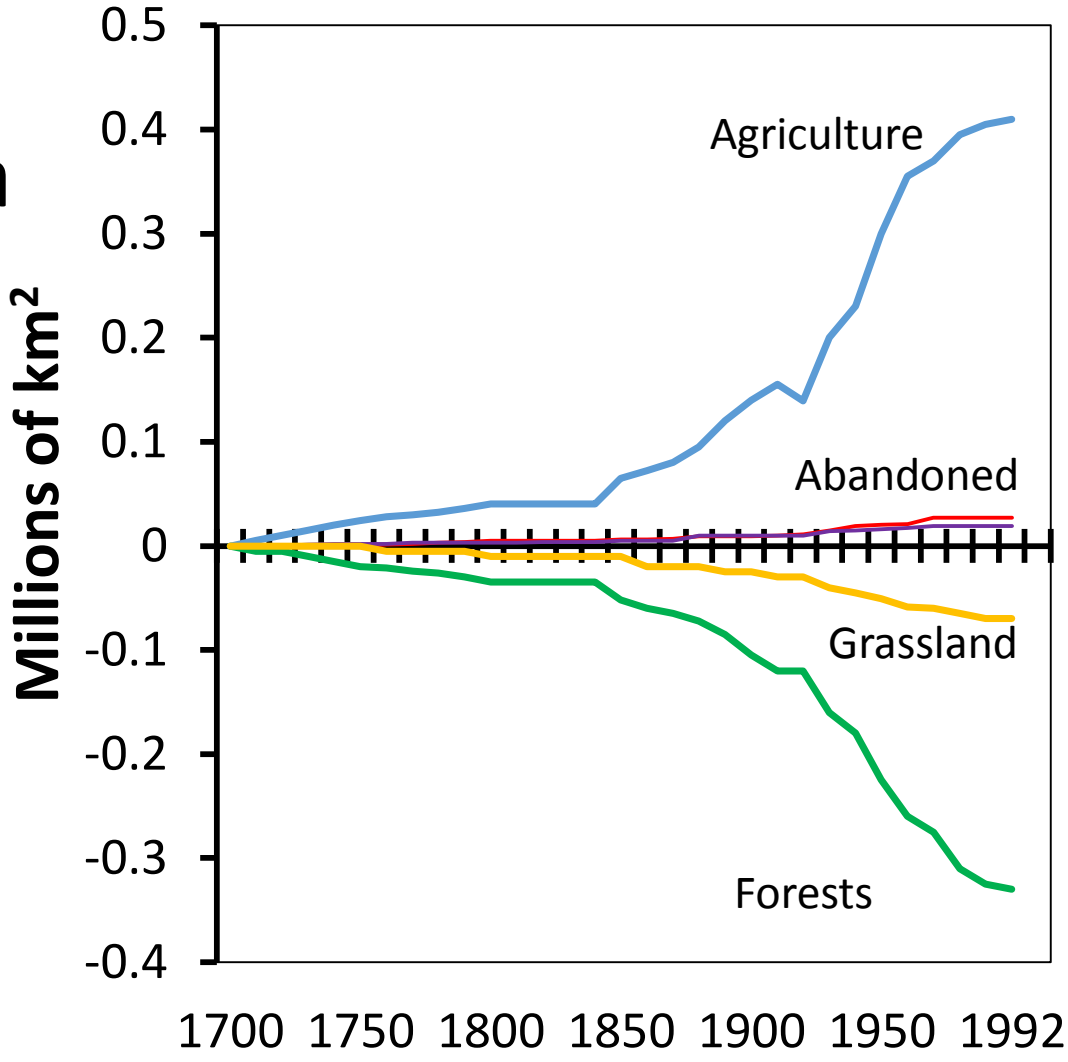
“The next century will, I believe, be the era of restoration in ecology”

E.O. Wilson (1992)

Biodiversity hotspots

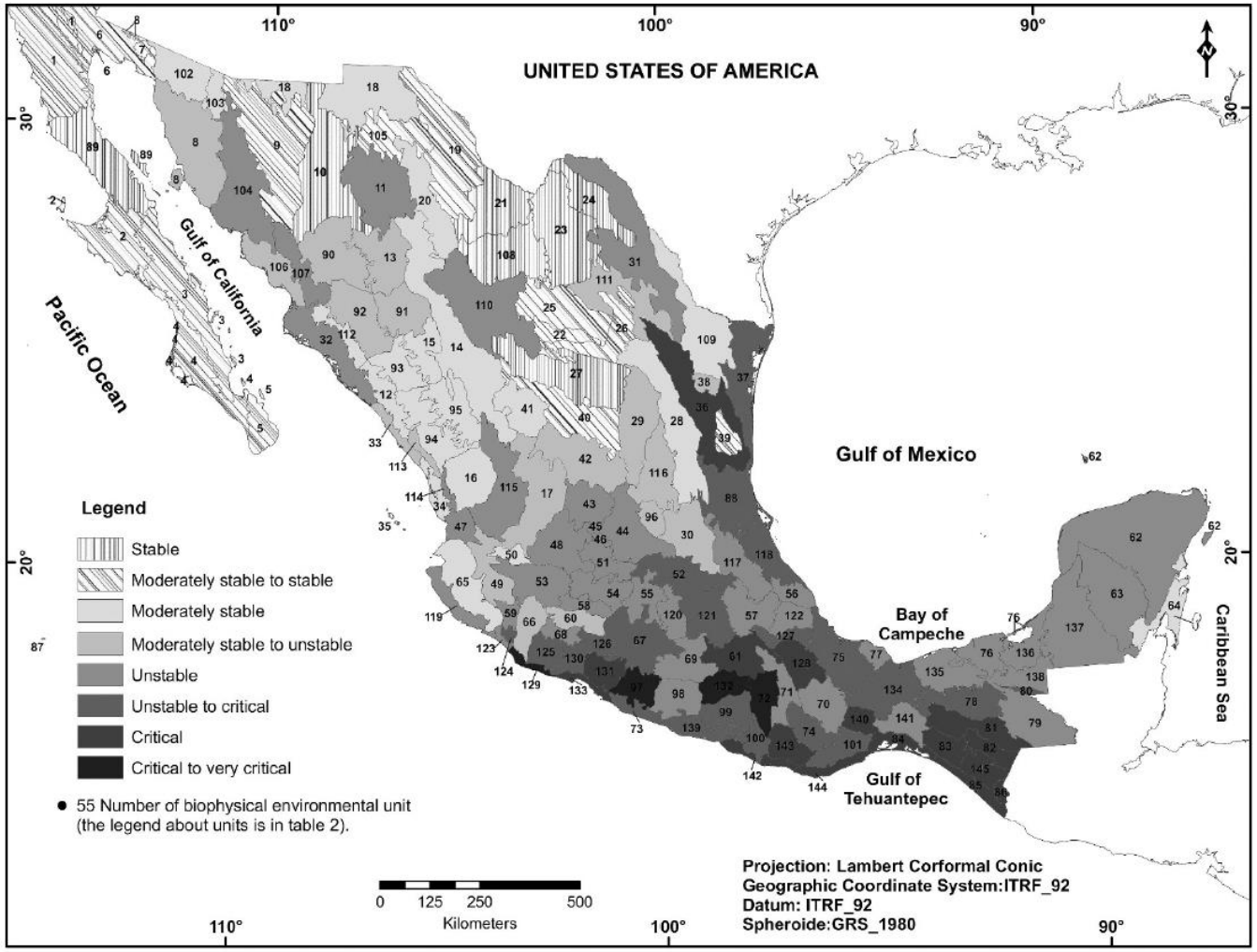


Land conversion in Mexico and Central America



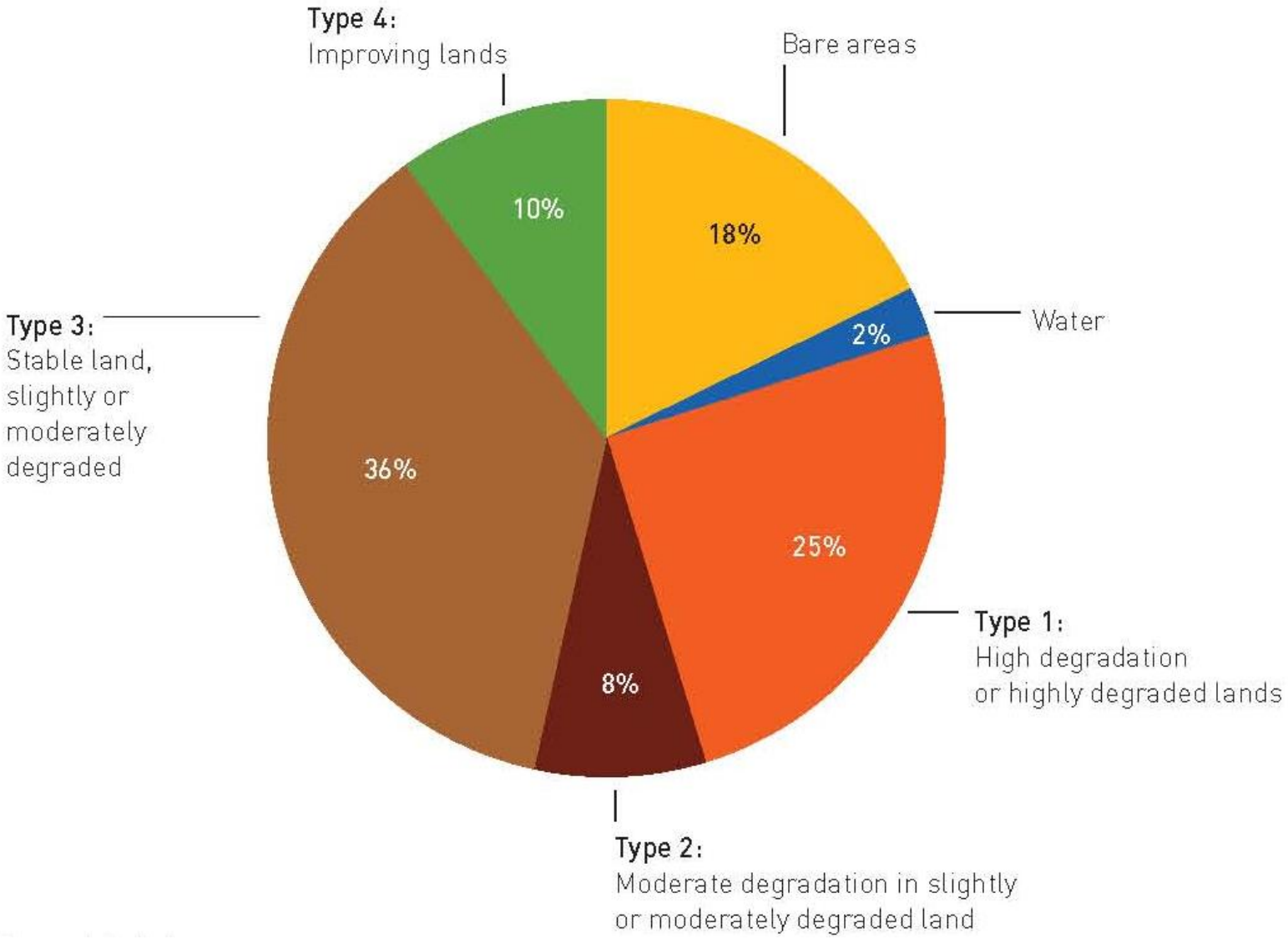
After Ramankutty and Foley. 1999. Global Biogeochem Cycles

47% of Mexico is environmentally degraded



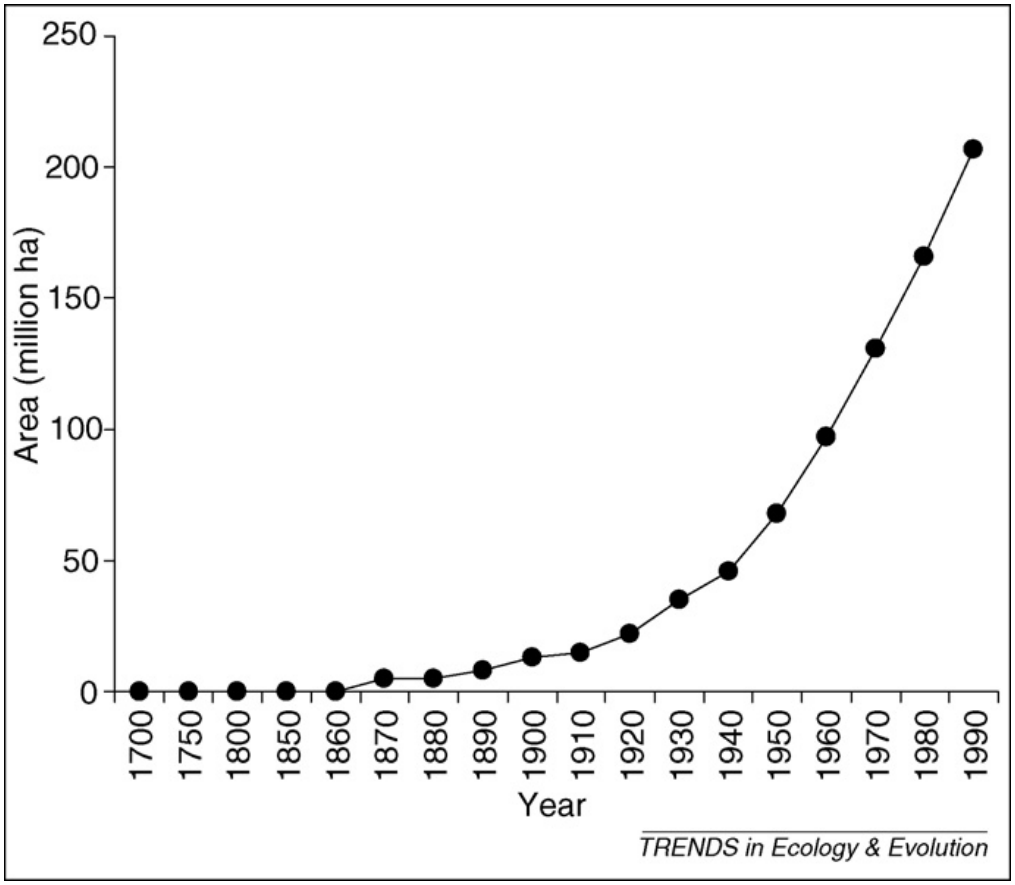
Bollo Manent et al. 2014. Cent. Eur. J. Geosci.

FAO land degradation 2011



Rate of abandonment of farmland

Losses have accelerated since 1950 worldwide



Cramer et al. 2008. TREE

Land degradation consequences

- Loss of biodiversity
- Increase in non-native invasive species
- Reduction or loss of ecosystem services necessary for human health, food and water security, and culture
- Strong relationship between poverty and degree of land degradation

Biodiversity loss and emerging infectious disease: An example from the rodent-borne hemorrhagic fevers

James N. Mills

Biodiversity. 2006.

Articles

Biodiversity Loss Affects Global Disease Ecology

MONTIRA J. PONGSIRI, JOE ROMAN, VANESSA O. EZENWA, TONY L. GOLDBERG, HILLEL S. KOREN, STEPHEN C. NEWBOLD, RICHARD S. OSTFELD, SUBHRENDU K. PATTANAYAK, AND DANIEL J. SALKELD

Bioscience. 2009.

Linkage between human health and biodiversity operates at many scales

- Genetic (gene frequencies)
  - Changes in host resistance or pathogen virulence
- Microbial (internal and external)
  - Host immune response change; range expansion
- Vector species
  - Contact rates; range expansion

Contents lists available at ScienceDirect

Ecosystem Services

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ecoser

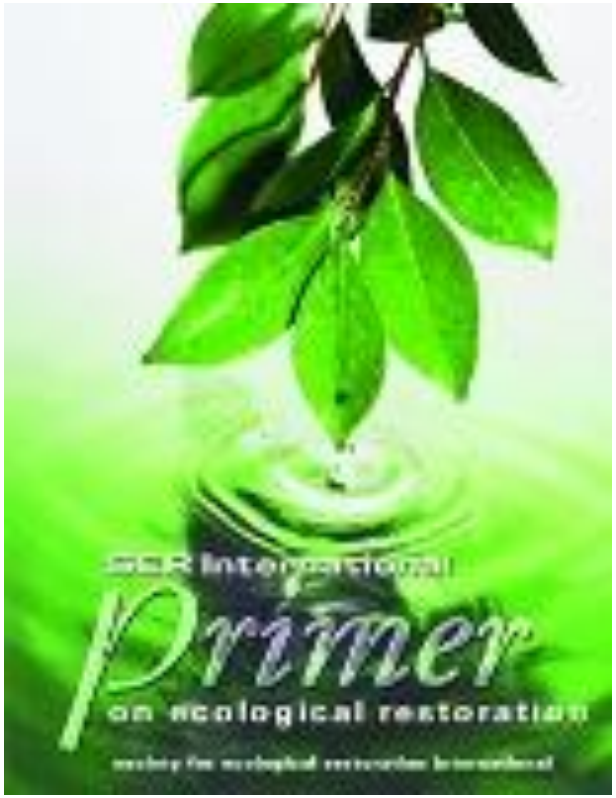
Exploring connections among nature, biodiversity, ecosystem services, and human health and well-being: Opportunities to enhance health and biodiversity conservation ☆

Paul A. Sandifer [a,*,1], Ariana E. Sutton-Grier [b,1], Bethney P. Ward [c]

[a] National Ocean Service, National Oceanic and Atmospheric Administration, Hollings Marine Laboratory, 331 Fort Johnson Road, Charleston, SC 29412, USA
[b] Cooperative Institute for Climate and Satellites, Earth System Science Interdisciplinary Center, University of Maryland and National Ocean Service, National Oceanic and Atmospheric Administration, 1305 East-West Highway, Rm 13614, Silver Spring, MD 20910, USA
[c] Coastal Services Center, National Ocean Service, National Oceanic and Atmospheric Administration, 2234 South Hobson Avenue, Charleston, SC 29405-2413, USA

Ecosystem Services 12 (2015) 1-15

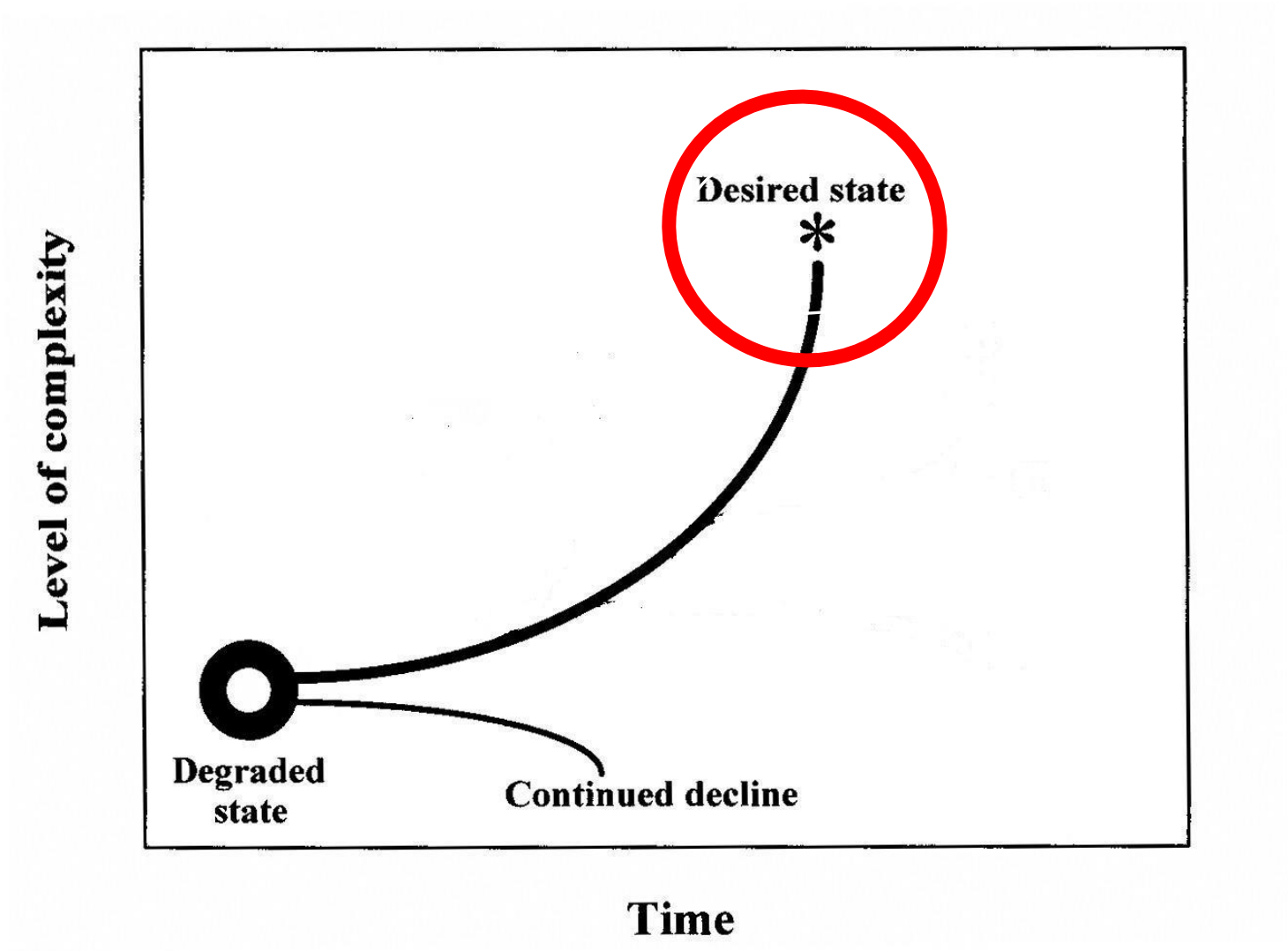
Ecological restoration defined:



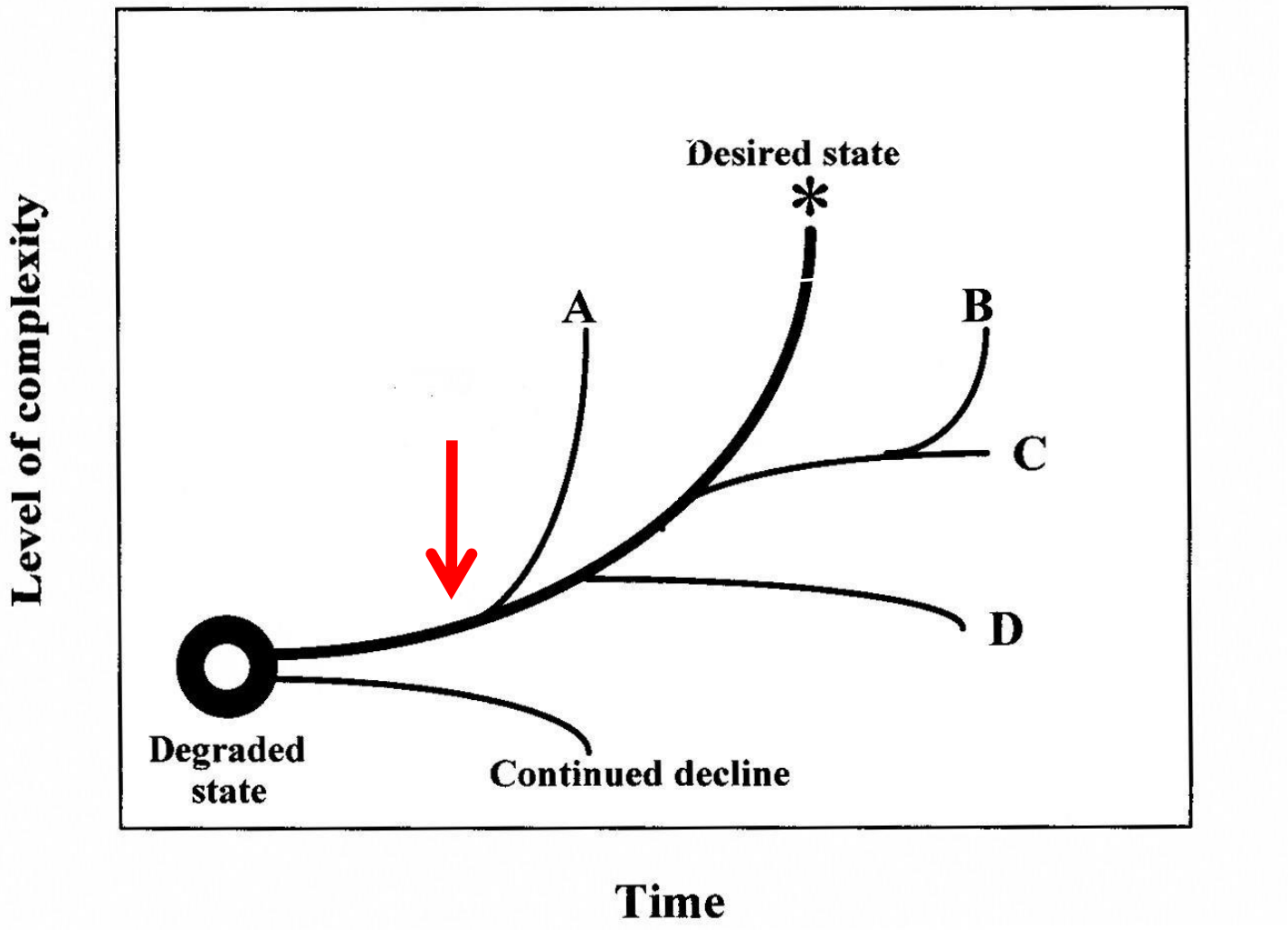
Ecological restoration is the process of ***assisting*** *the recovery of an ecosystem that has been degraded, damaged, or destroyed.*

Society for Ecological Restoration Primer (2004)

We attempt to move an ecological system from a degraded state to a “desired state”.”



Restoration trajectories may vary





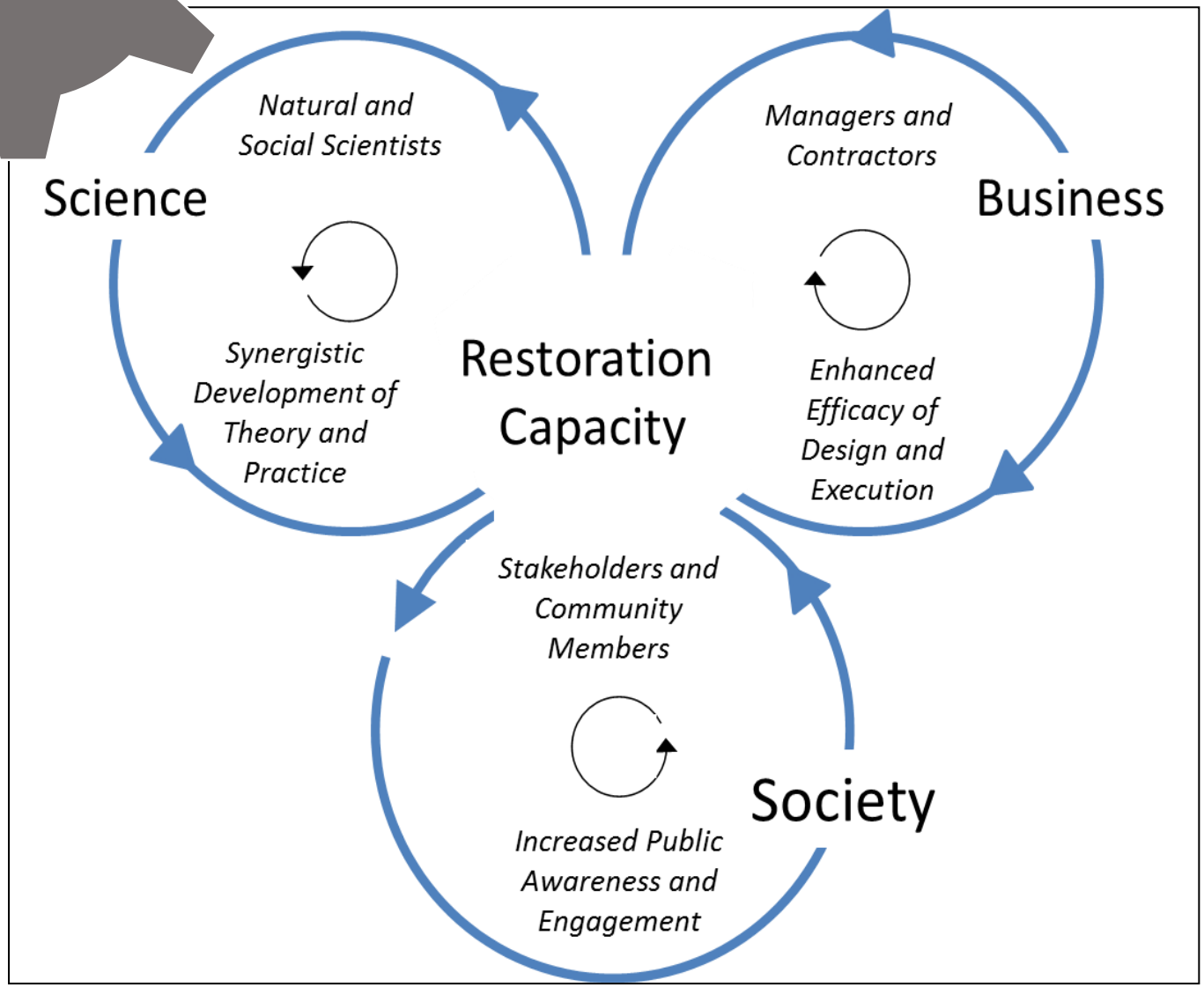


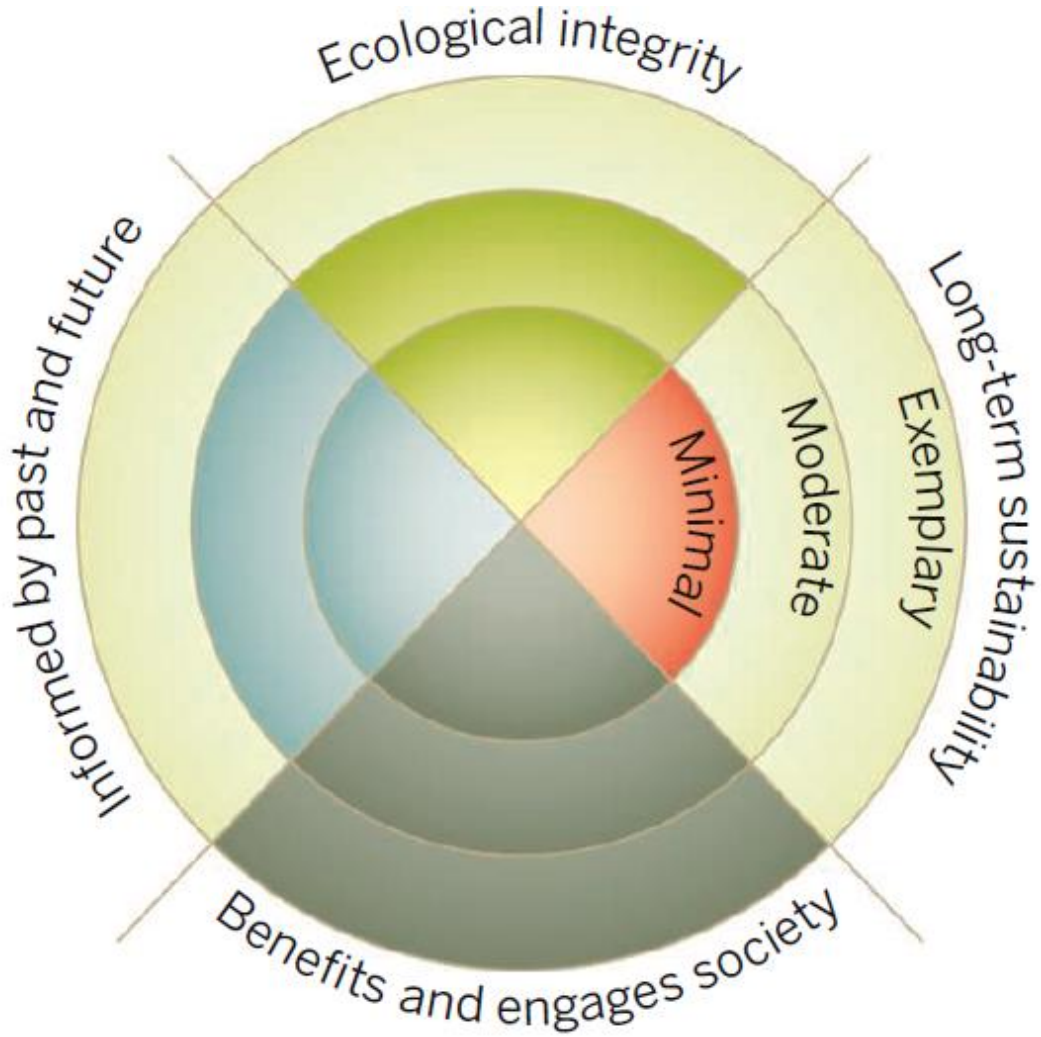
Cape Breton Island, Canada

Some questions

- *Why restore?*
  - Ecological services
  - Biodiversity
  - Cultural values
- *Who conducts the work?*
  - Private
  - Public
  - Partnership
- *How is success measured?*
  - Species composition
  - Vegetation structure
  - Ecosystem function
- *Who benefits?*
  - Stakeholders
  - Community
- *Context?*

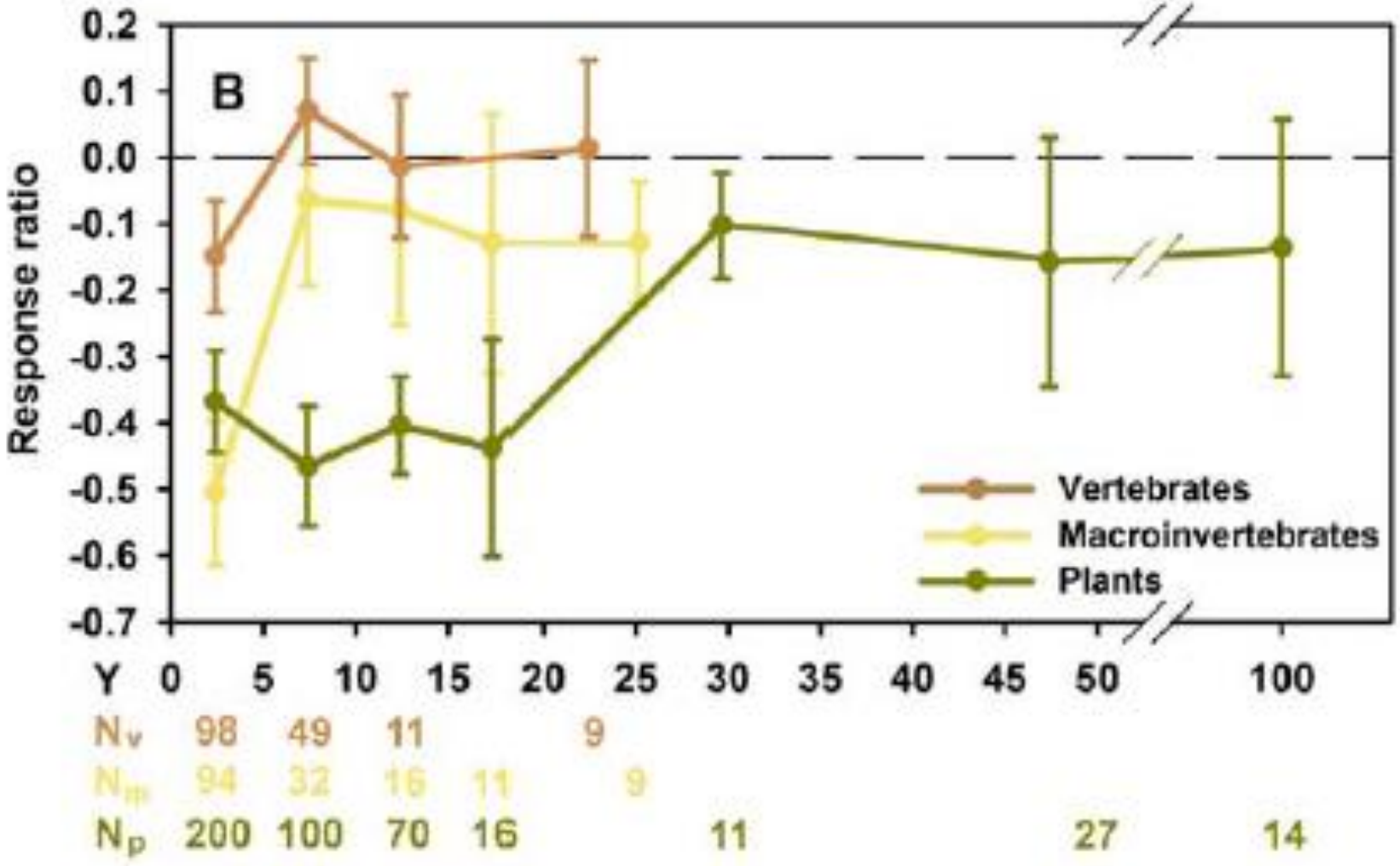
Knowledge needs





Suding et al. 2015. Science

Warning! Restoration is rarely 100%



Moreno-Mateos et al. 2012. PLOS

Measuring success of restoration

Meta-analysis of 89 projects in different ecosystems world-wide

- Ecological restoration increased provision of biodiversity (44%) and ecosystem services (25%)
- Lower relative to intact systems
- Timescales may be quite long

Benayas et al. 2009. Science

Disturbances of global concern are long-term and large-scale



Land-use change



Climate change



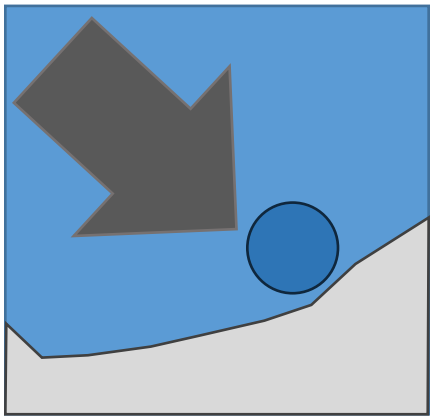
CO_2 enrichment



Nitrogen deposition



Biotic invasion



Synergistic effects

Sala et al. *Science* 287: 1770–1774.

Convention on Biological Diversity: Aichi Biodiversity Targets (2010-2020)

- 5 - Rate of loss of natural habitats is significantly reduced
- 11 - By 2020, >17% of terrestrial and inland water conserved through protected areas
- 15- By 2020, restoration of >15% of degraded ecosystems (carbon stocks)

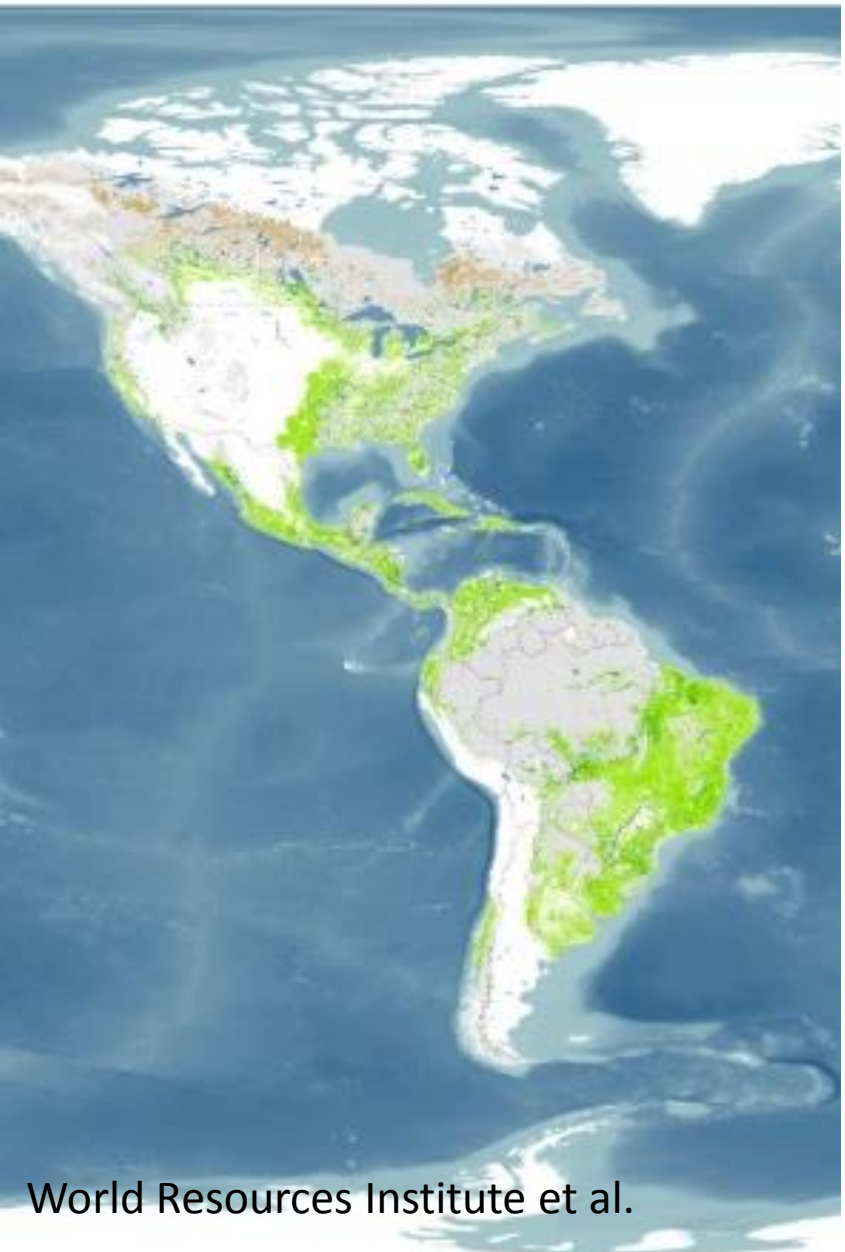
Remove forest and then “restore”



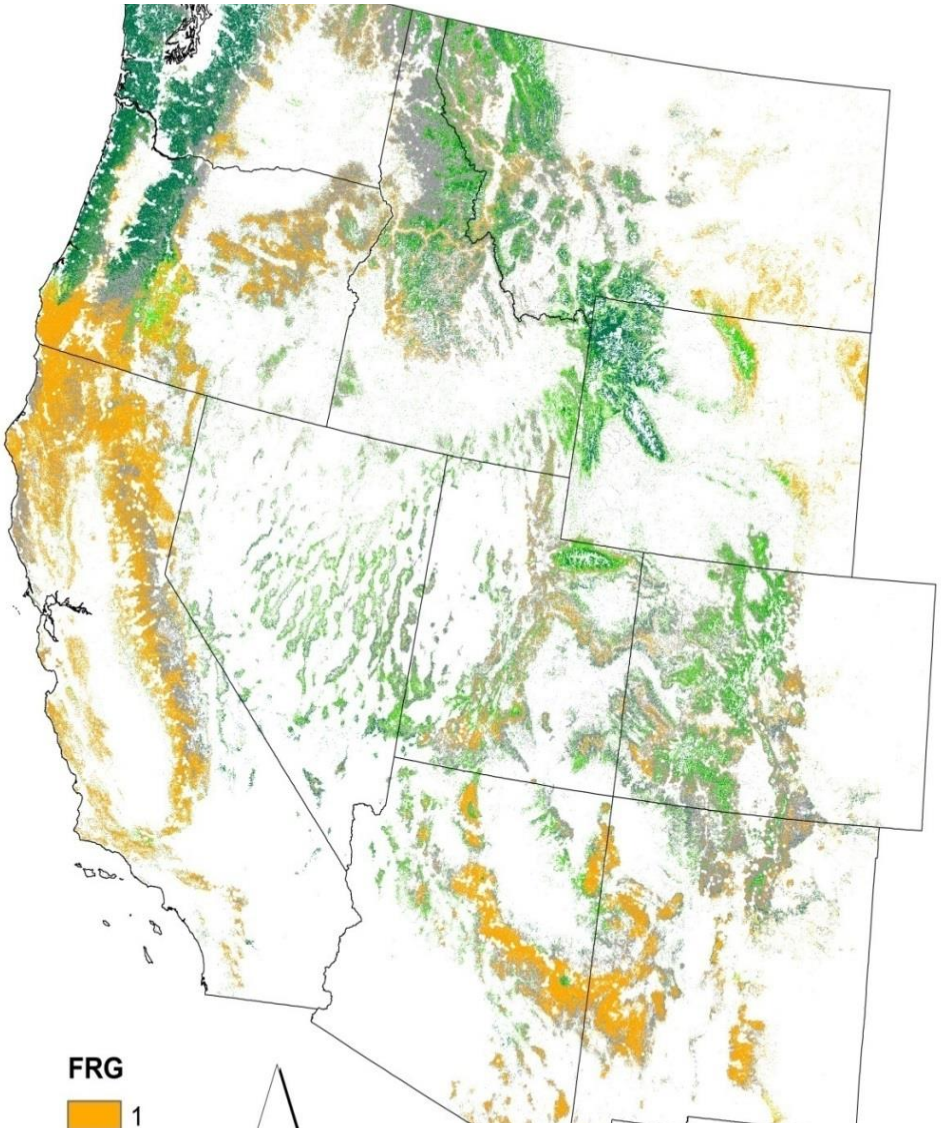
Global restoration initiatives

- Bonn Challenge to restore 150 million ha of deforested and degraded lands by 2020
  - Mexico participates in the 20x20 initiative
- New York Declaration on Forests to add 200 million ha by 2030
- Forest Ecosystem Restoration Initiative (Korea Forest Service)

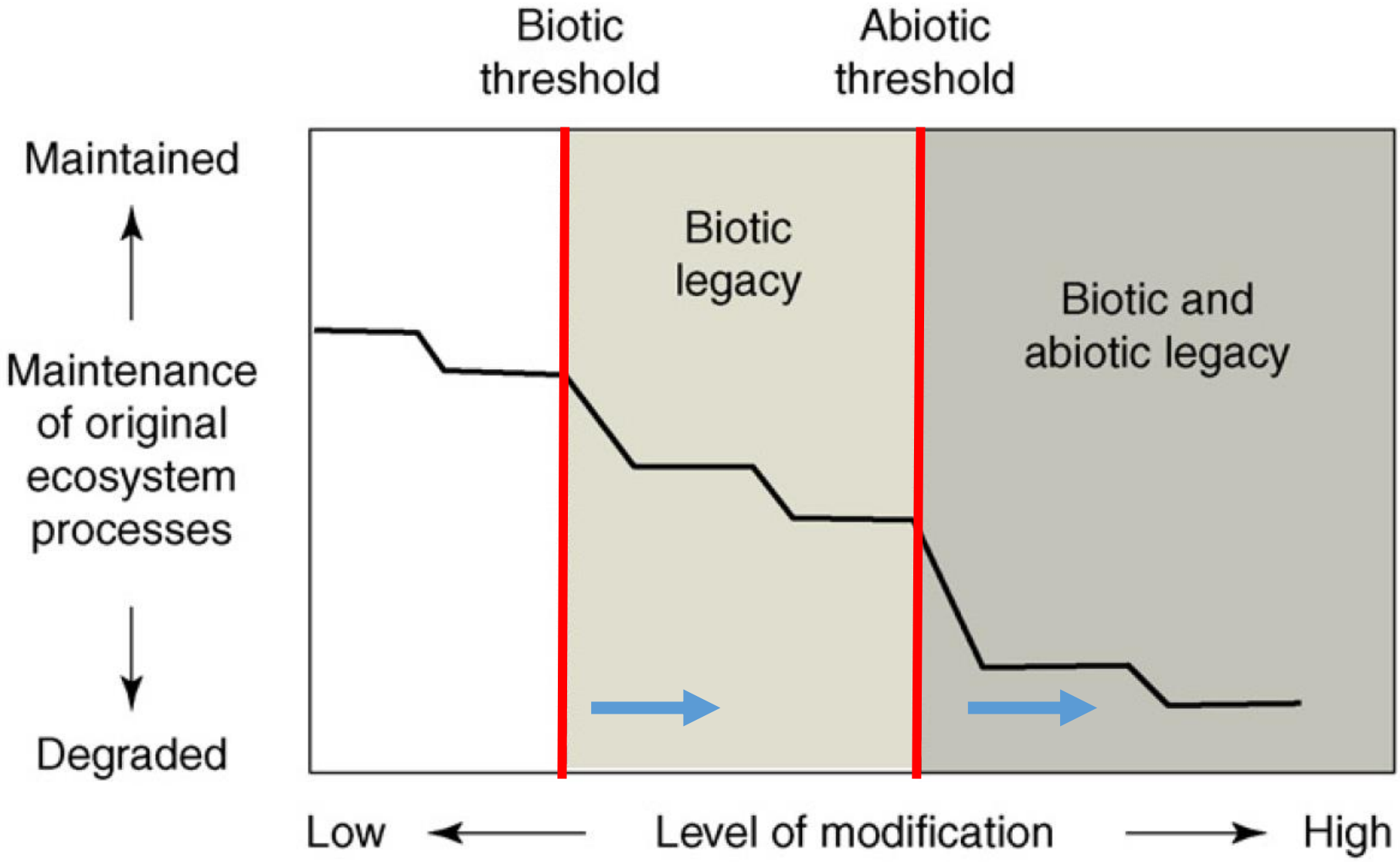
Priority Areas for Restoration



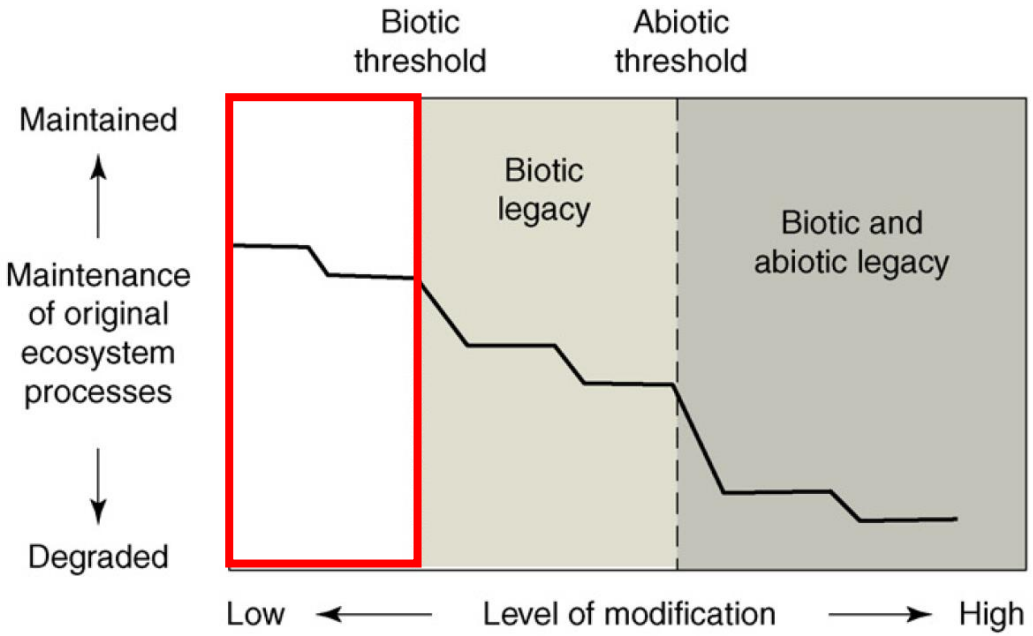
World Resources Institute et al.

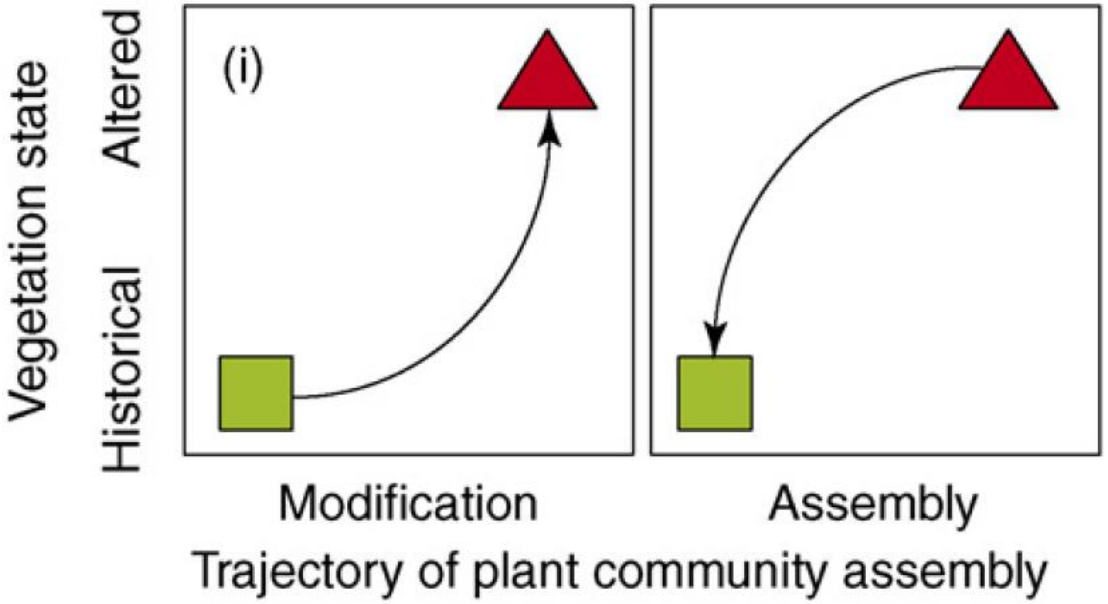


Schoennagel and Nelson 2011

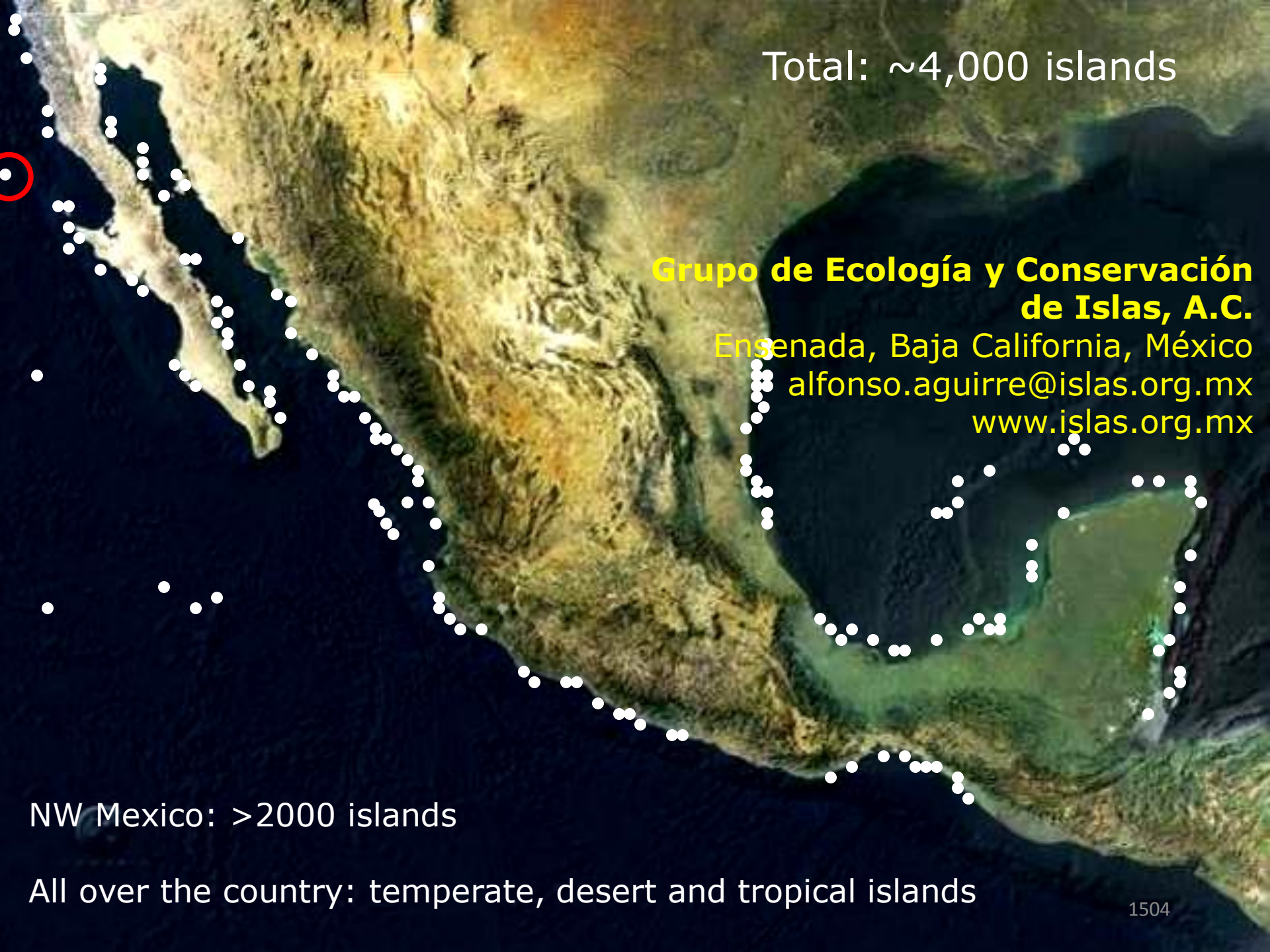


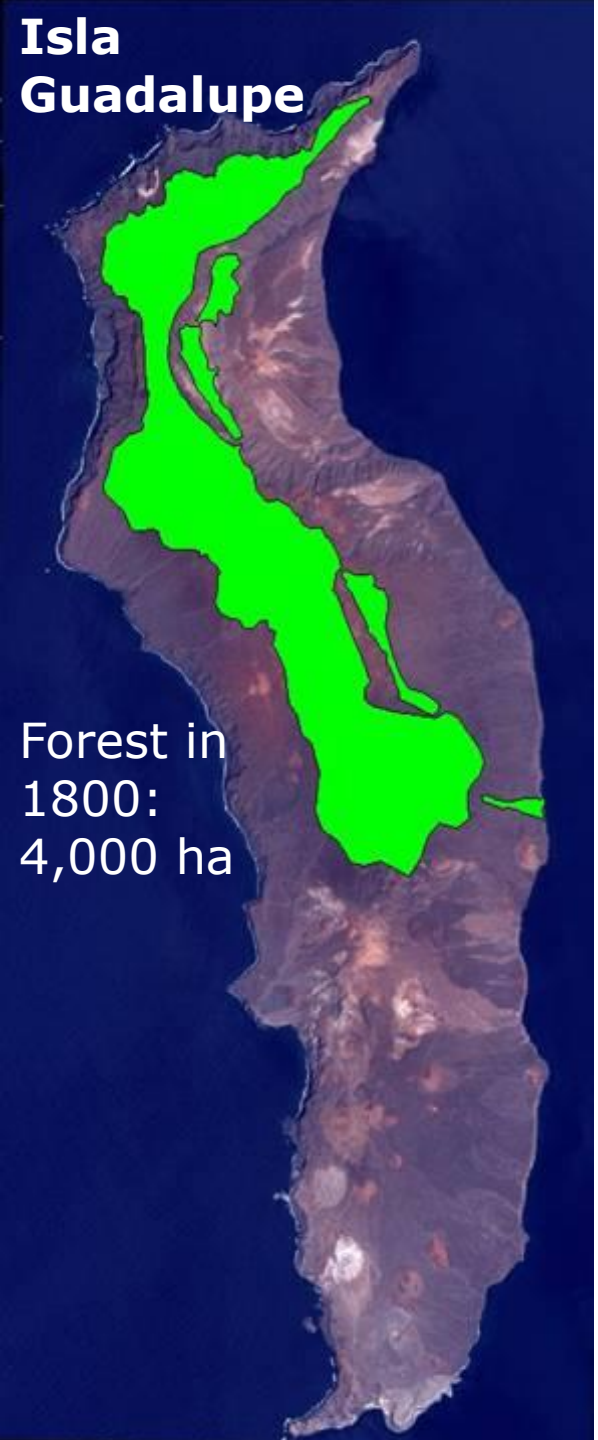
Cramer et al. 2008. TREE

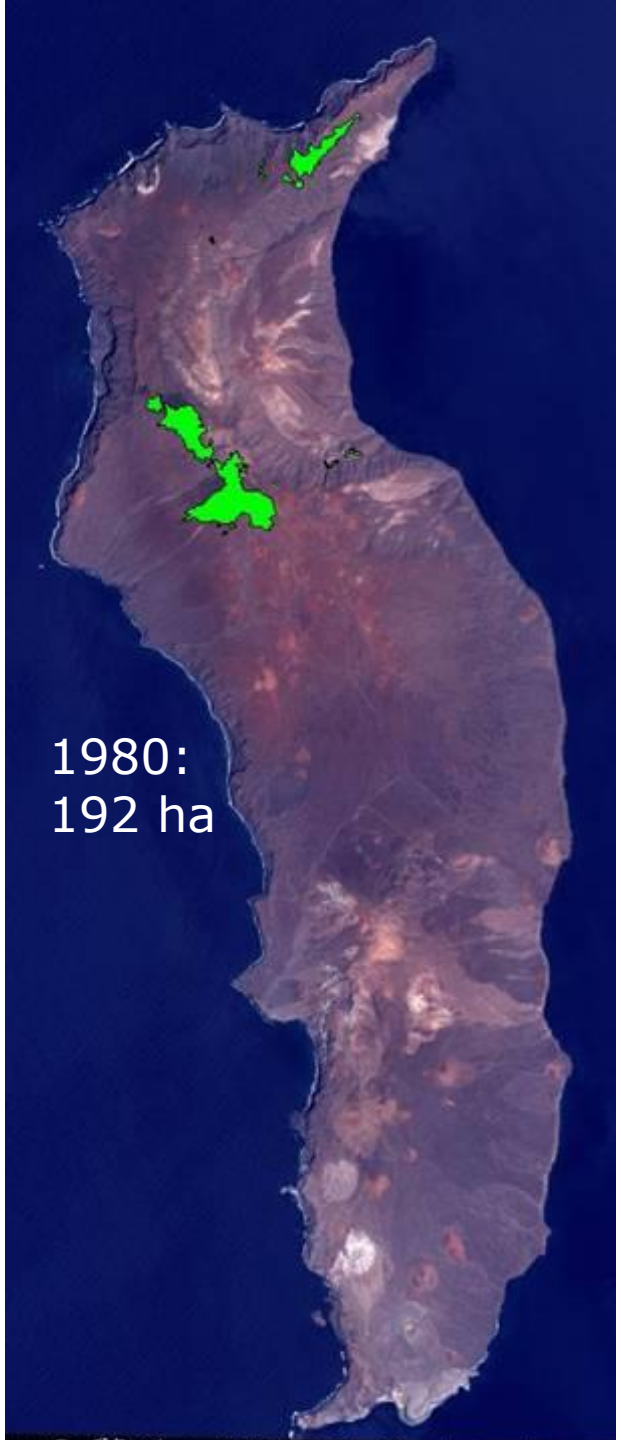


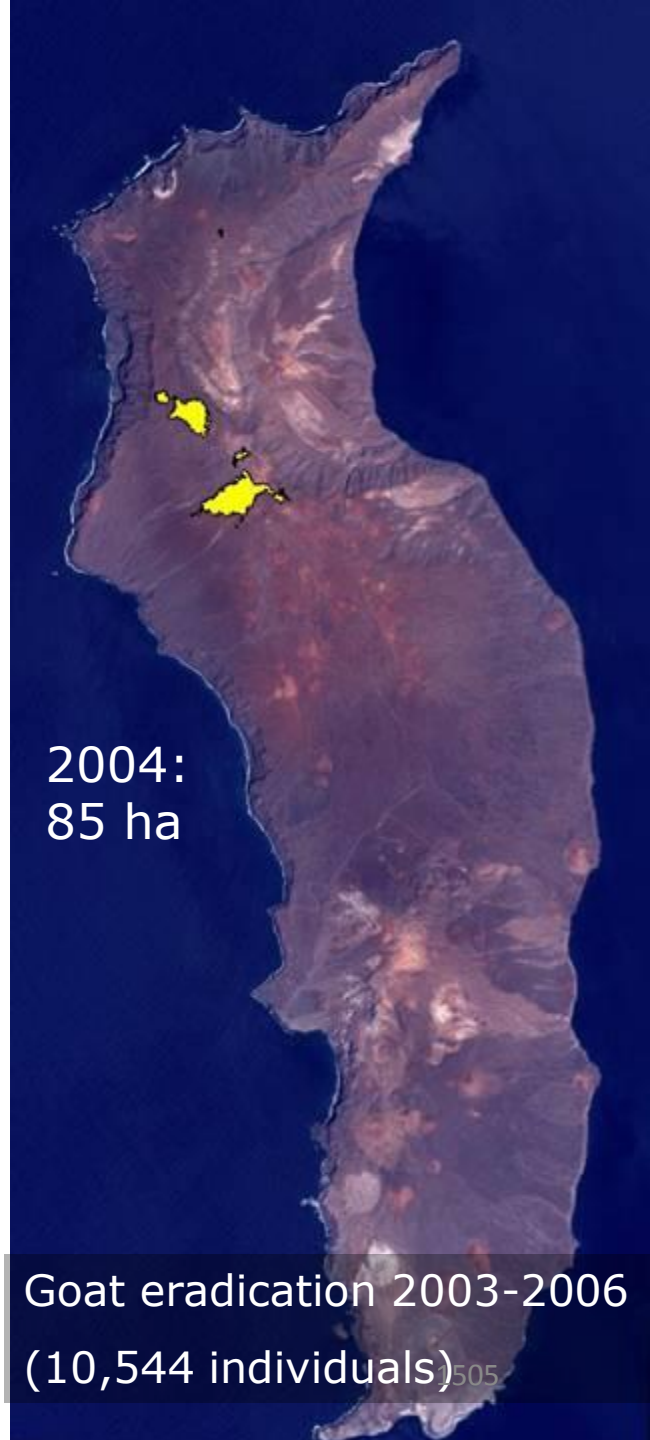


Cramer et al. 2008. TREE


Total: ~4,000 islands
Grupo de Ecología y Conservación de Islas, A.C.
Ensenada, Baja California, México
alfonso.aguirre@islas.org.mx
www.islas.org.mx
NW Mexico: >2000 islands
All over the country: temperate, desert and tropical islands
1504

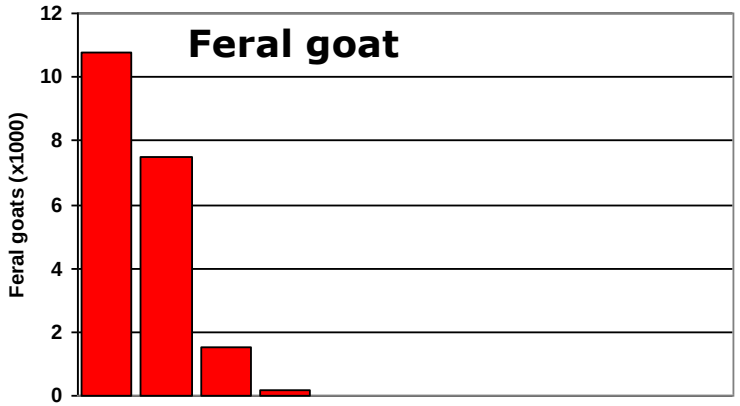

Isla
Guadalupe
Forest in
1800:
4,000 ha

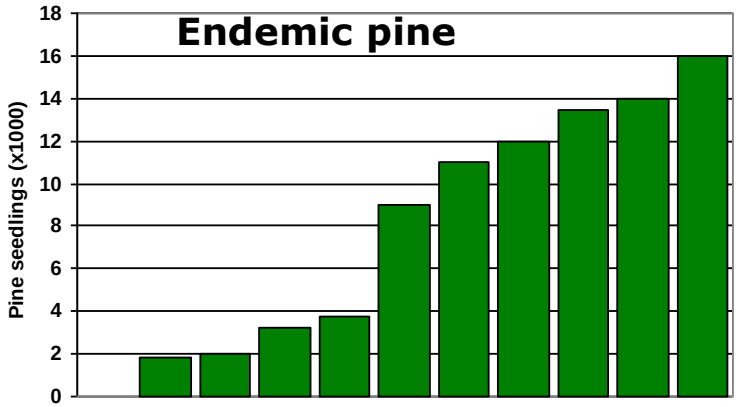

1980:
192 ha

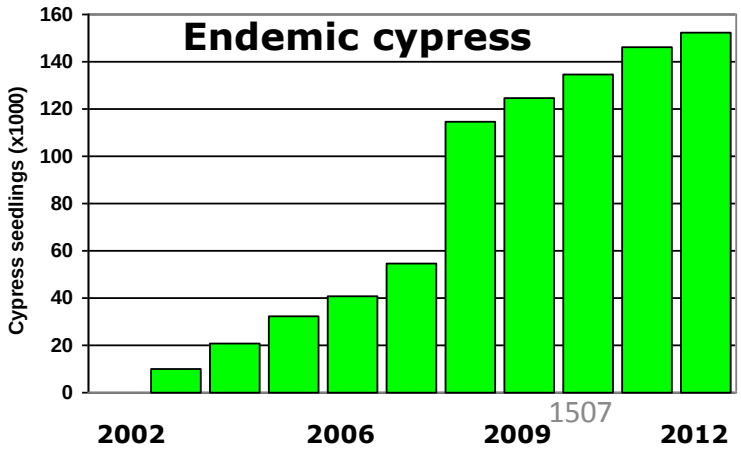

2004:
85 ha
Goat eradication 2003-2006
(10,544 individuals)


1506

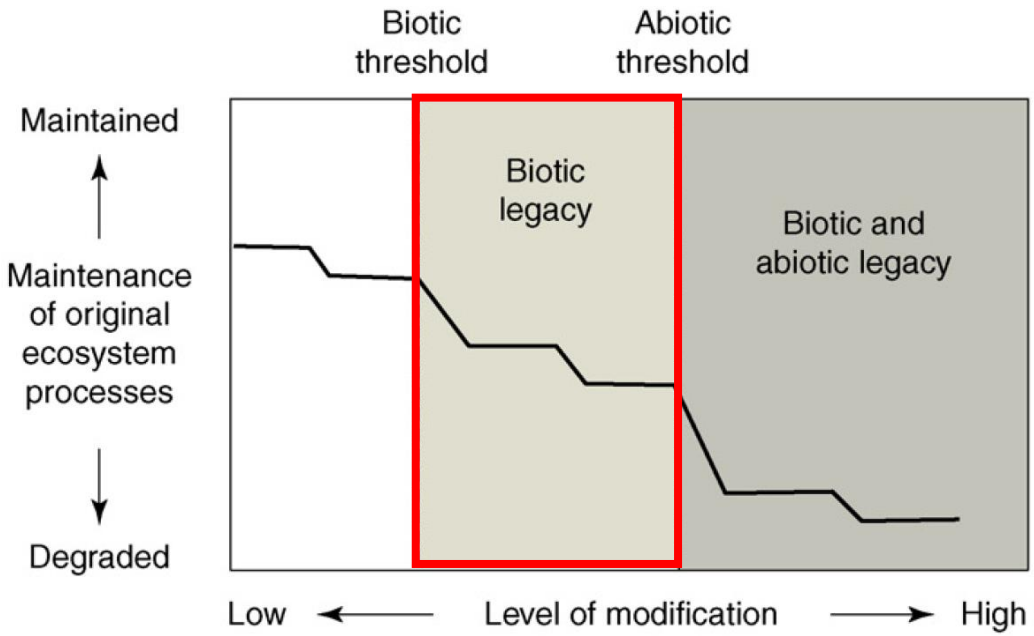


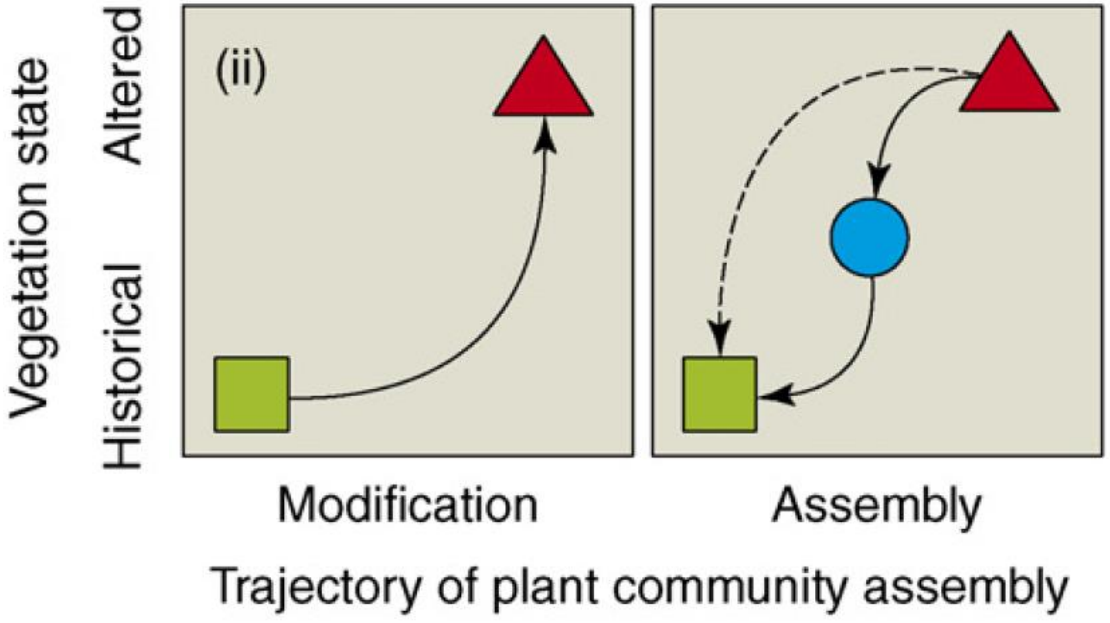

Feral goat
Feral goats (x1000)
0
2
4
6
8
10
12


Endemic pine
Pine seedlings (x1000)
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18


Endemic cypress
Cypress seedlings (x1000)
0
20
40
60
80
100
120
140
160
2002
2006
2009
2012

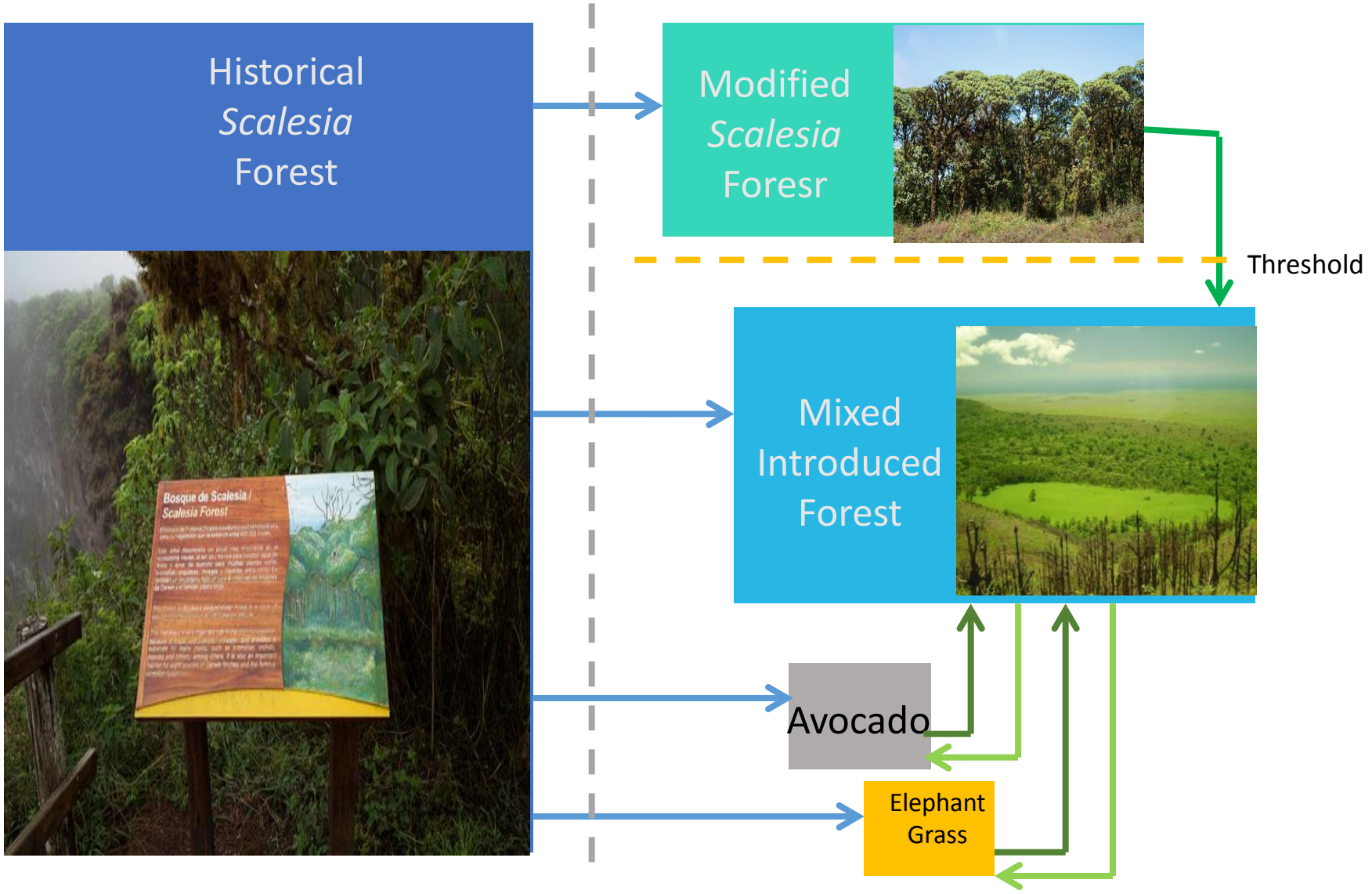

1508



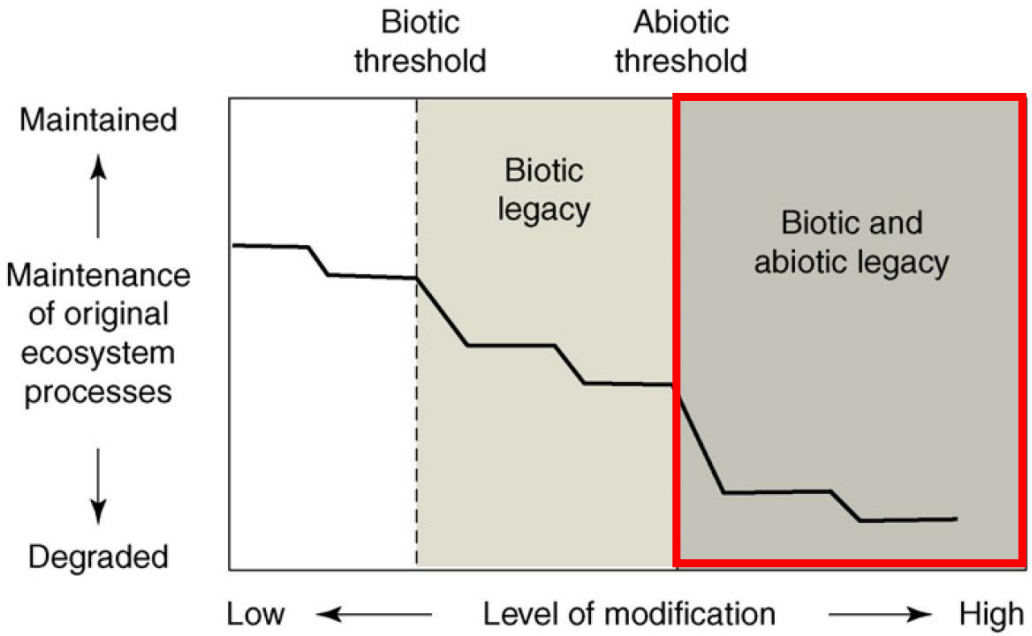


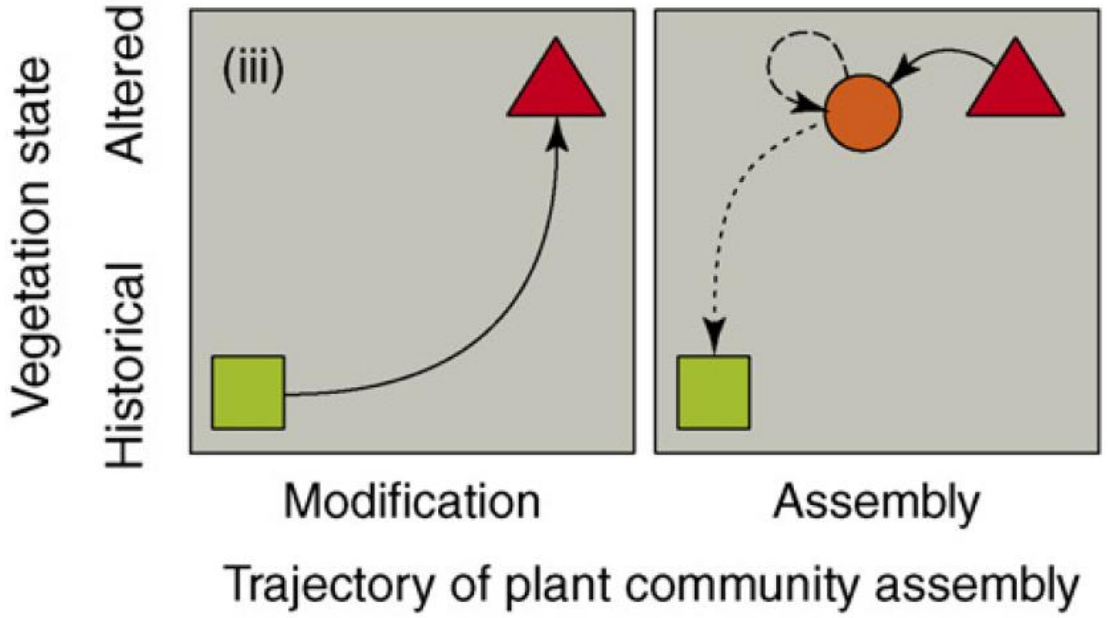
Cramer et al. 2008. TREE

Defining thresholds between multiple states: the Galapagos Islands



Trueman, Standish & Hobbs 2014 *Biological Conservation* 172: 37–48





Cramer et al. 2008. TREE



Lake Toolibin, Western Australia. Ramsar freshwater wetland



Lake Tarbleen, Western Australia. Salinized wetland

Crossed thresholds

- Vernal dams in remote eastern Ontario hardwood forests seems to have undergone a rapid and likely permanent shift 2004-2006

- Drop in the mean nitrification rate from 13.7 g/m^2/year to 5.6 g/m^2/year

- Cumulative stresses – acid rain legacy, 1998 ice storm, over-development creating edge effects and erosion, diseases, climate shifts in temperature and precipitation that are not buffered by bedrock based nutrient refreshment

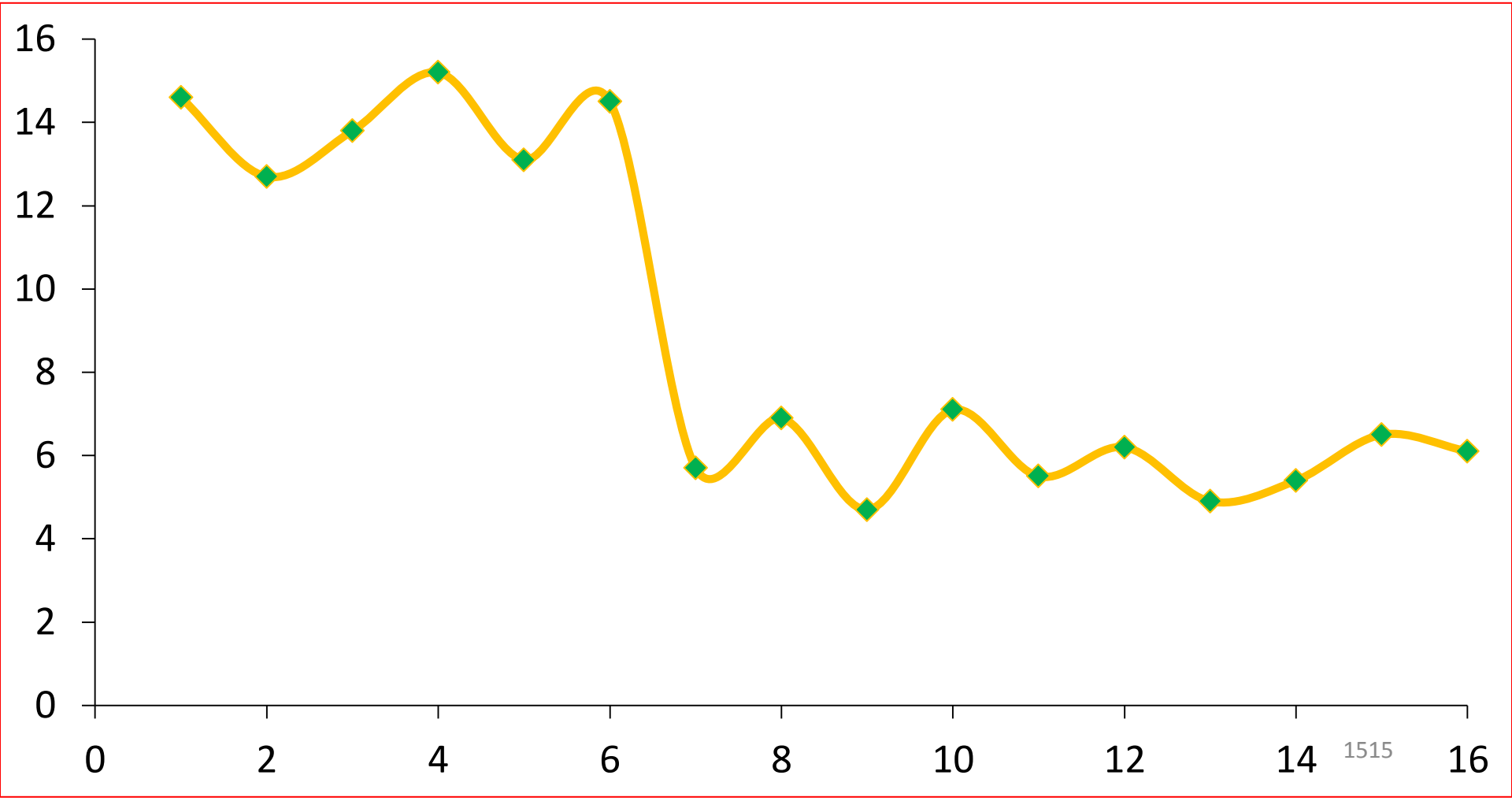


Beech bark disease caused here by Cryptococcus fagisuga and *Neonectria faginata*





Reduced nitrogen is destroying the nitrogen dependent plants



We can restore the nitrification components – from the key bacteria via inoculation to the mycorrhizal fungi via the “chop-slop-drop-inoc” method

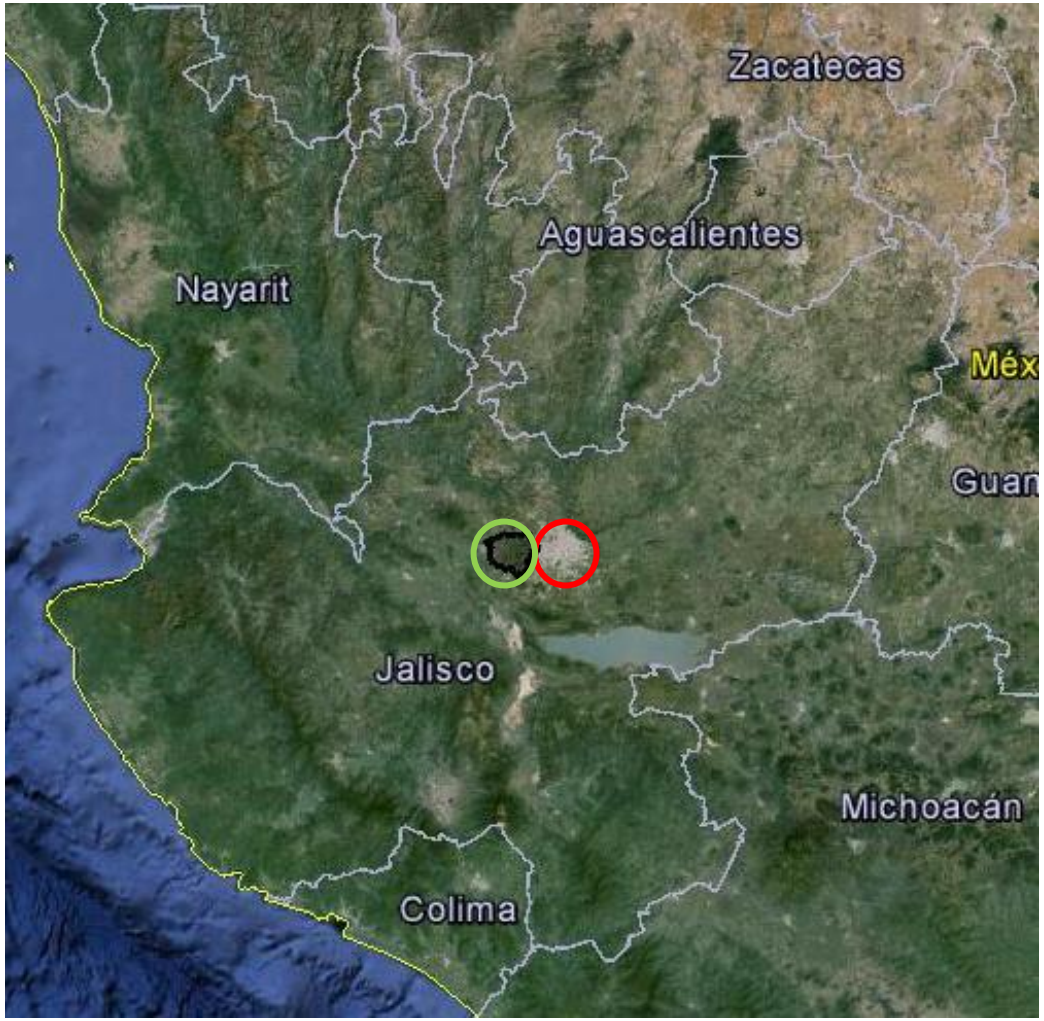
It can work for awhile – locally – but if the whole regime of ‘attractors’ like nutrient cycling has changed then the system will revert to its degraded state



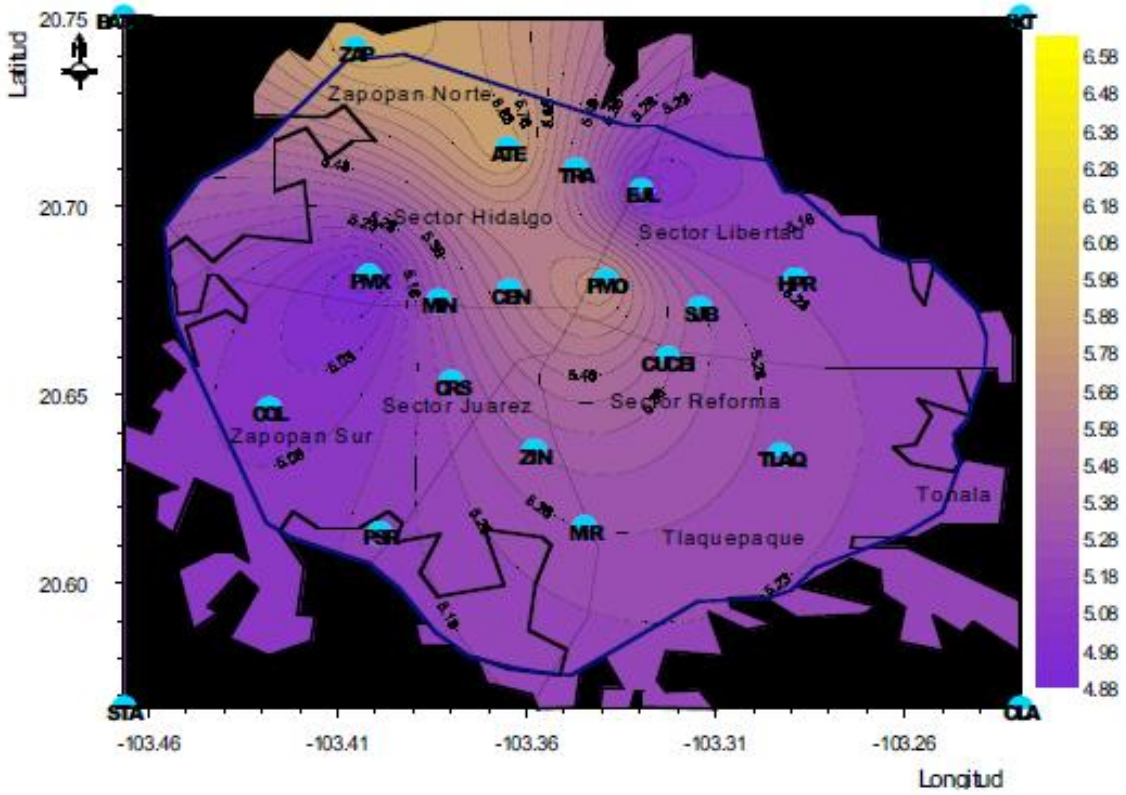


A local problem

Guadalajara Metropolitan Area is east of Bosque La Primavera

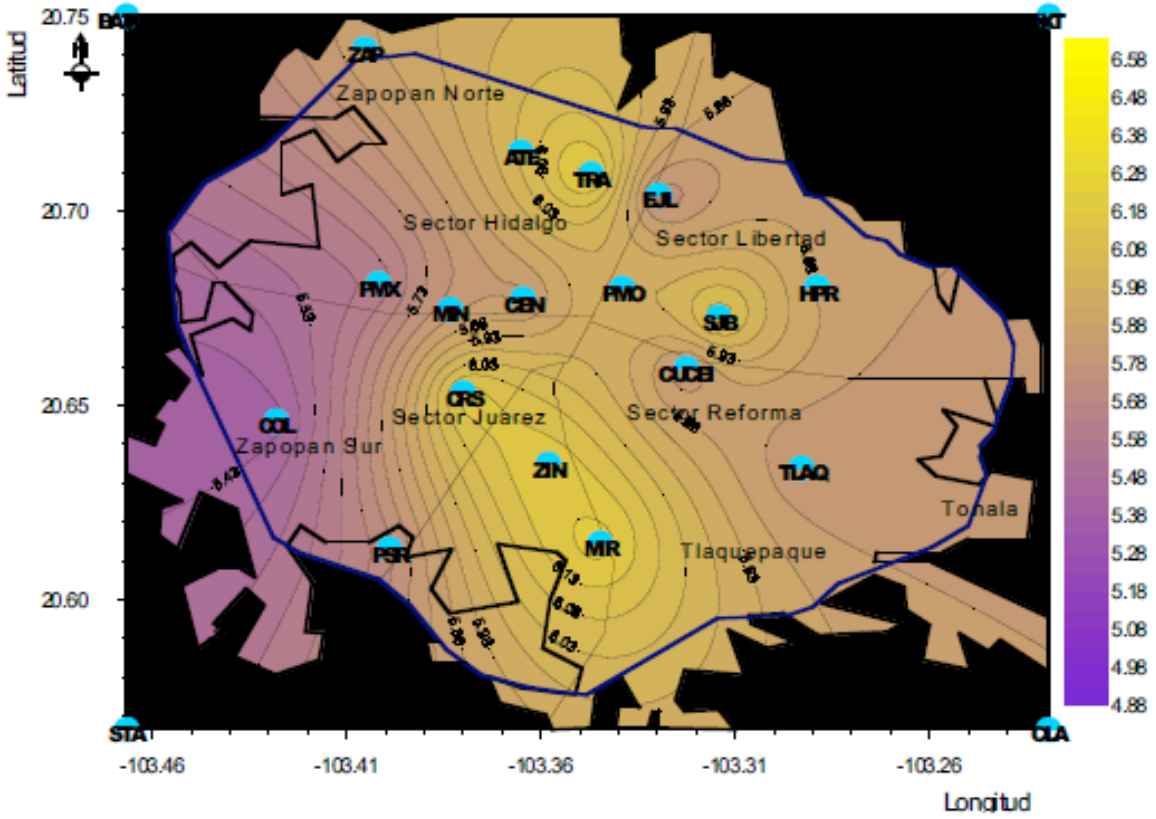


Atmospheric pollution of city creates acid rain



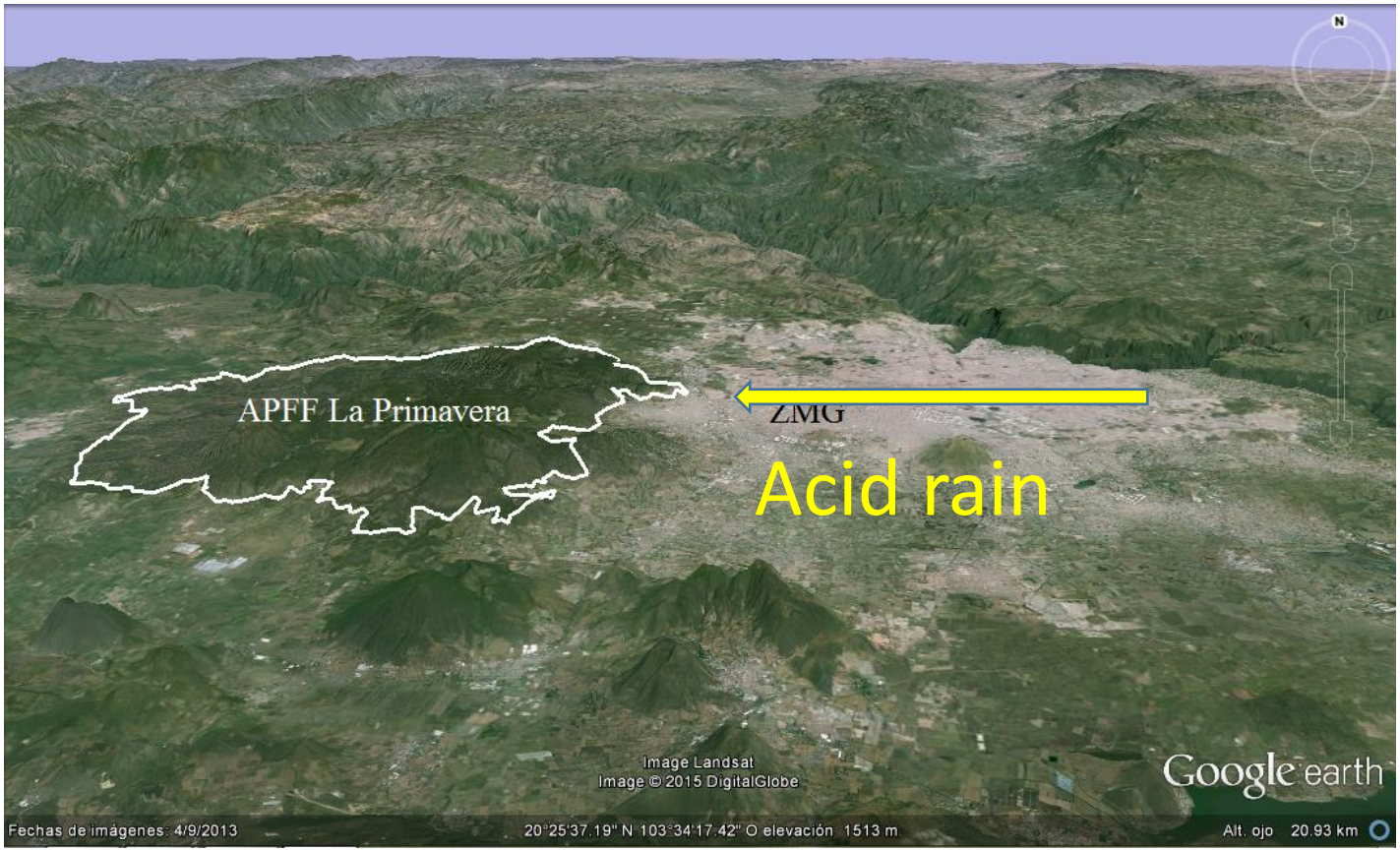
Example of acid rain distribution on GMZ during 1999 rainy season. Figure from García et al., (2006).

Acid rain is deposited to the west



Acid rain distribution at GMZ during the 1994 – 2002 period. Figure from García et al., (2006).

Winds blow west during the rainy season



Severe fires in the forest

Organic matter may not decompose



Is acid rain changing biodiversity and ecosystem function?

Experiment: Manipulate soil chemistry by adding lime.

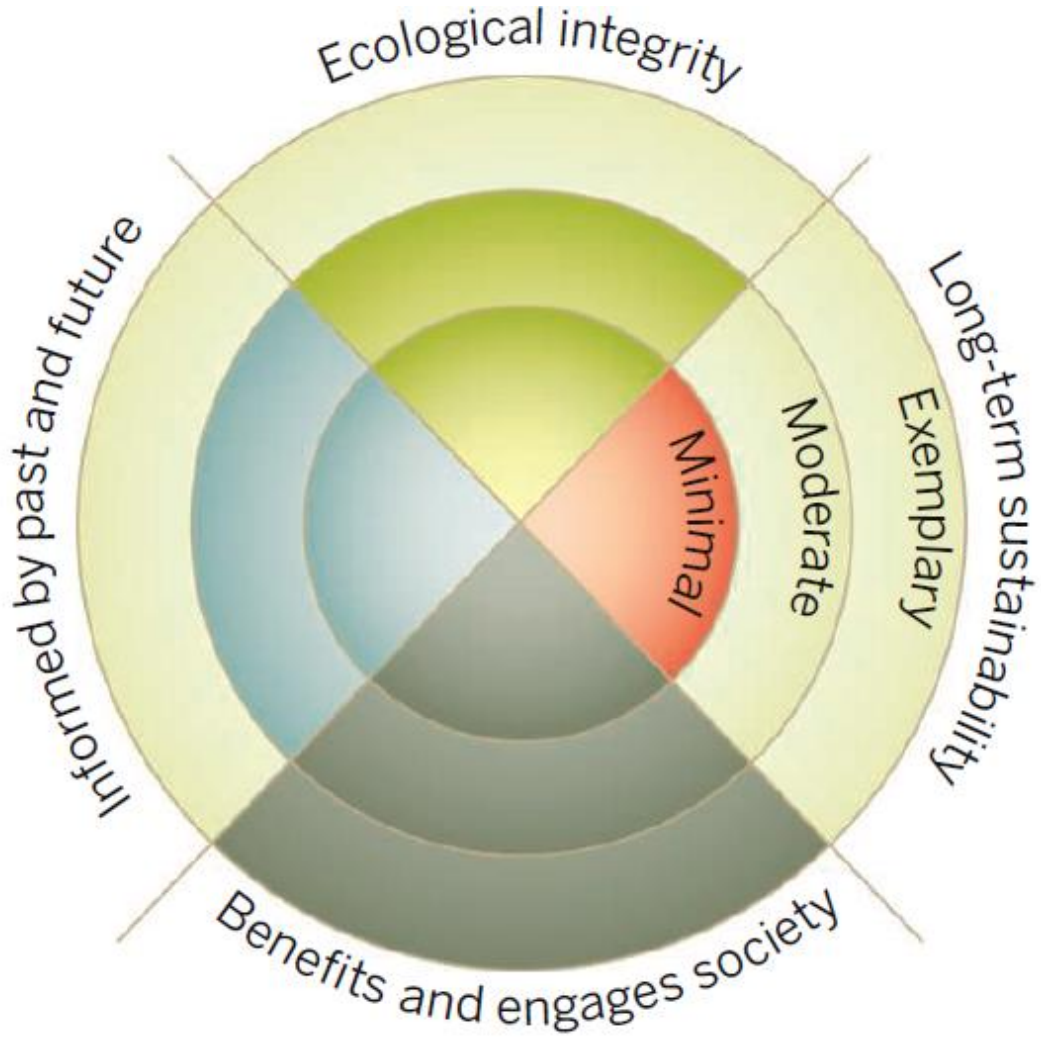
Monitor: Response of plants, microbes, and animals



Student opportunity?

Contact:

Dr. José Luis Zavala Aguirre
joseluis.zavala@mail.uag.mx
Escuela de Biología
UAG



Suding et al. 2015. Science

Restoration Ecology
THE JOURNAL OF THE SOCIETY FOR ECOLOGICAL RESTORATION

OPINION ARTICLE

The socioecological complexity of ecological restoration in Mexico

Eliane Ceccon[1], José I. Barrera-Cataño[2], James Aronson[3,4], Cristina Martínez-Garza[5,6]

Almost half of Mexican territory has been classified as environmentally degraded. The main response for the last 60 years has been reforestation to combat soil erosion and loss of forest cover, mostly carried out on private lands where negotiations with local stakeholders were critical. Despite four legal instruments referring to ecological restoration, no specific instrument that

Restoration Ecology 23 (2015) 332-336

For more information

REPARA
Red de Restauración Ambiental
Mexican Network for Ecological Restoration
Started Nov. 2014

SIACRE
Ibero-American and Caribbean Society of Ecological Restoration
Siacre.org

SER
Society for Ecological Restoration
SER.org

Liming for the mitigation of acid rain in freshwaters: A review of recent results

Thomas Clair

With contributions from

Shannon Sterling

Marley Geddes

Jillian Haynes

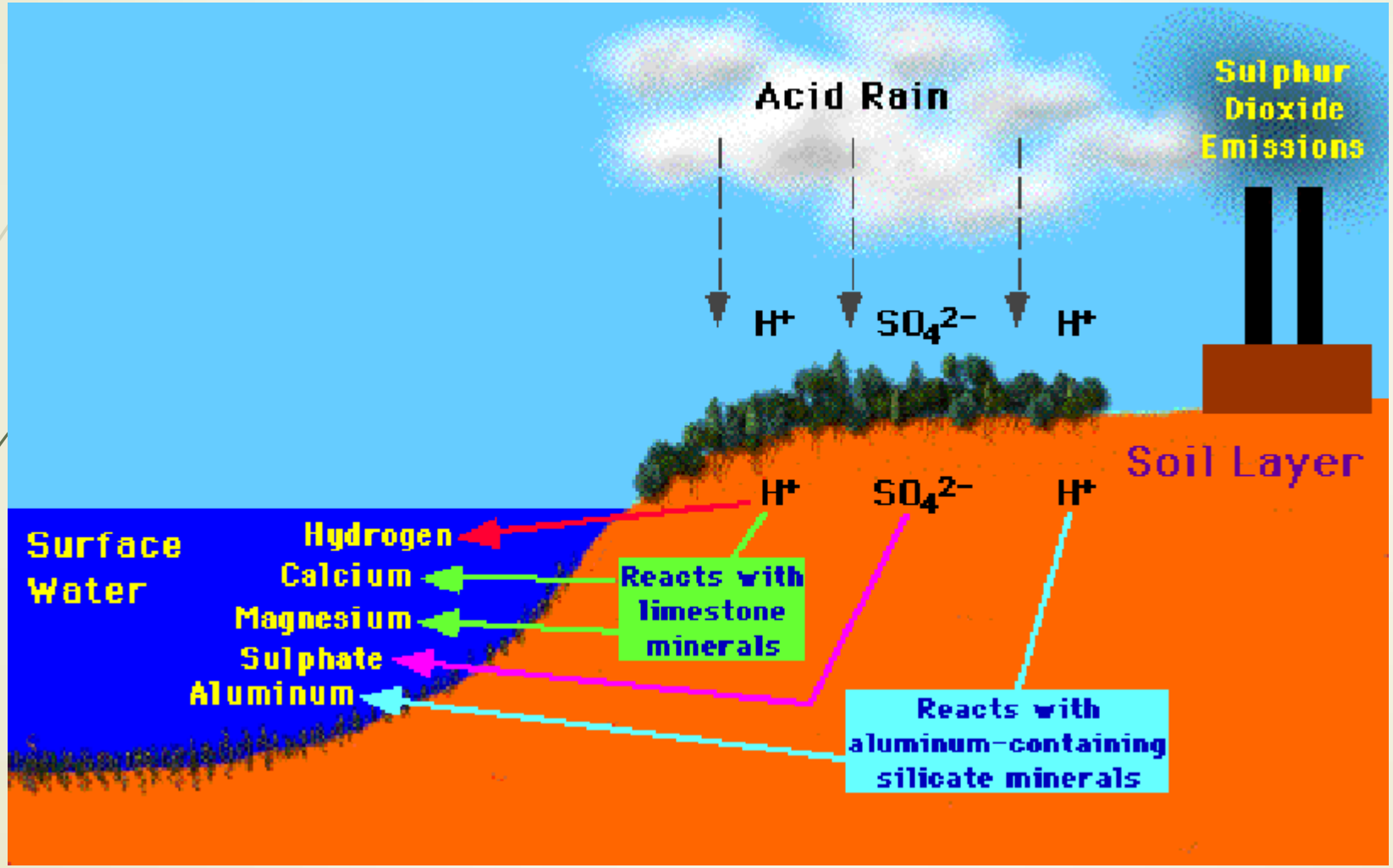
(Dalhousie University)

Approach used in a case study of liming in Nova Scotia, Canada

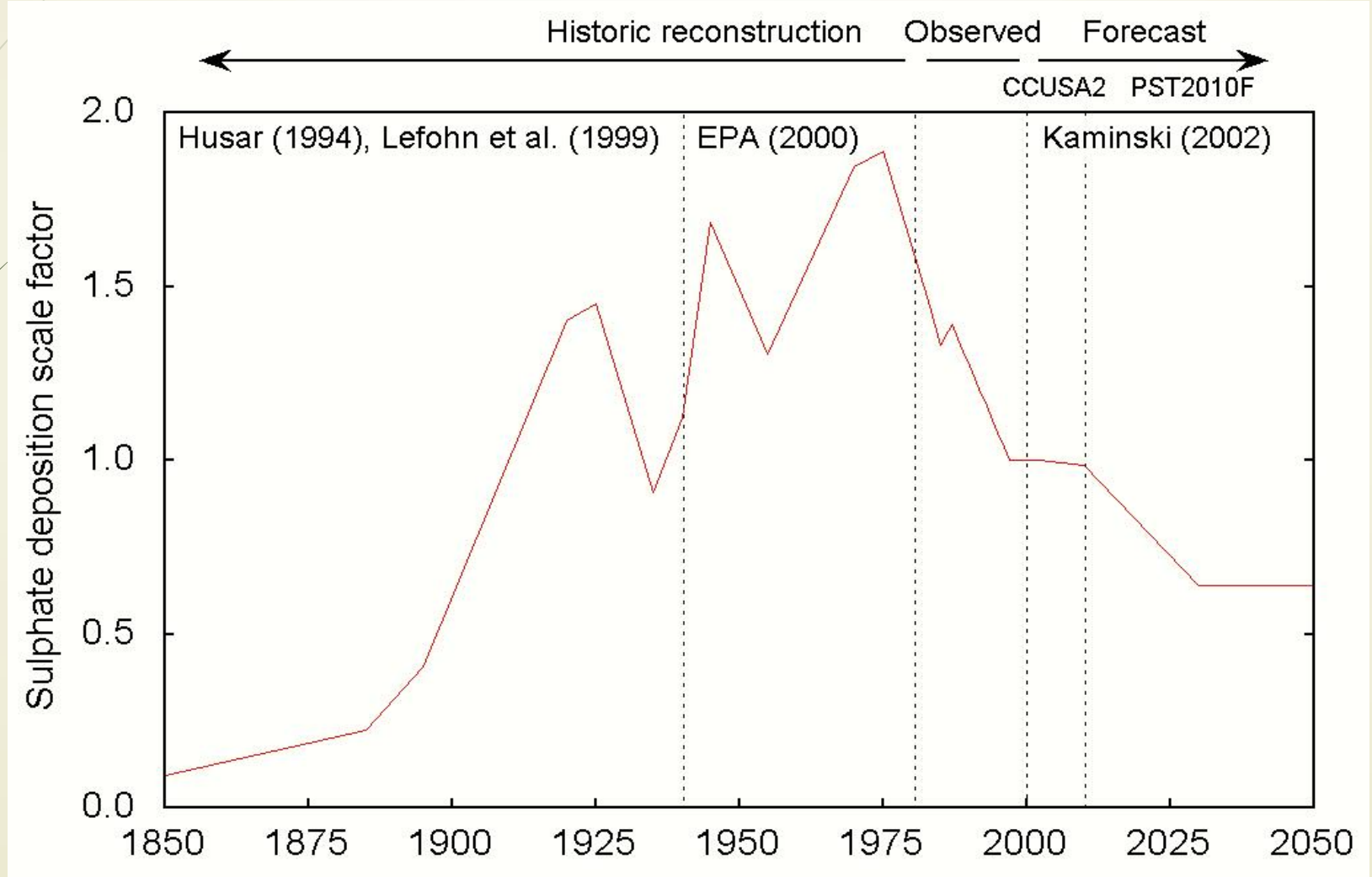
- To present the logic involved in

a) the decision to lime a catchment (why),
b) the selection of catchments to be limed (where)
c) The methods used (how) and
d) The expected outcomes of the approach(when)

Generation and transport of acid rain

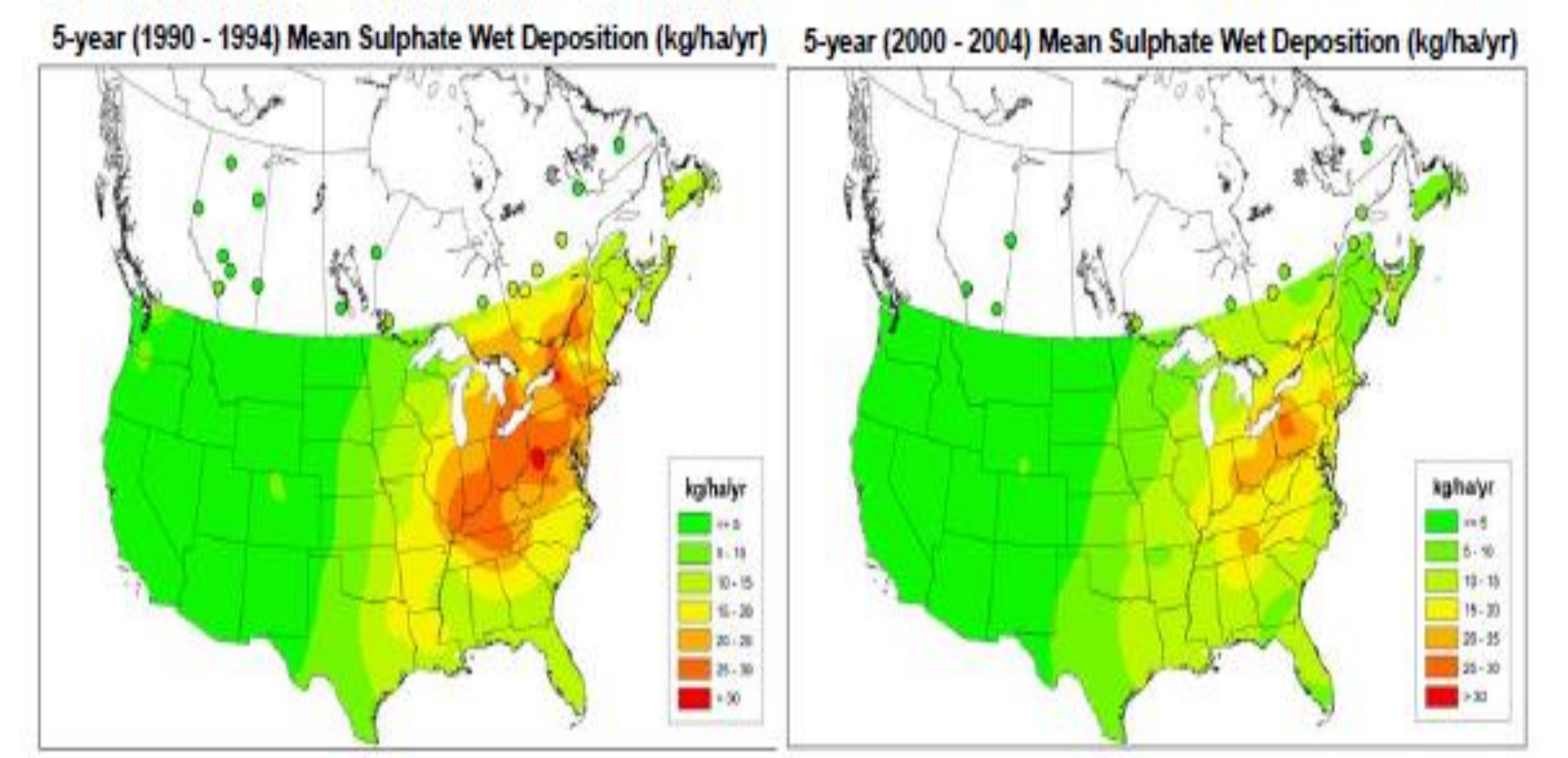


Historical acid emission trends in North America

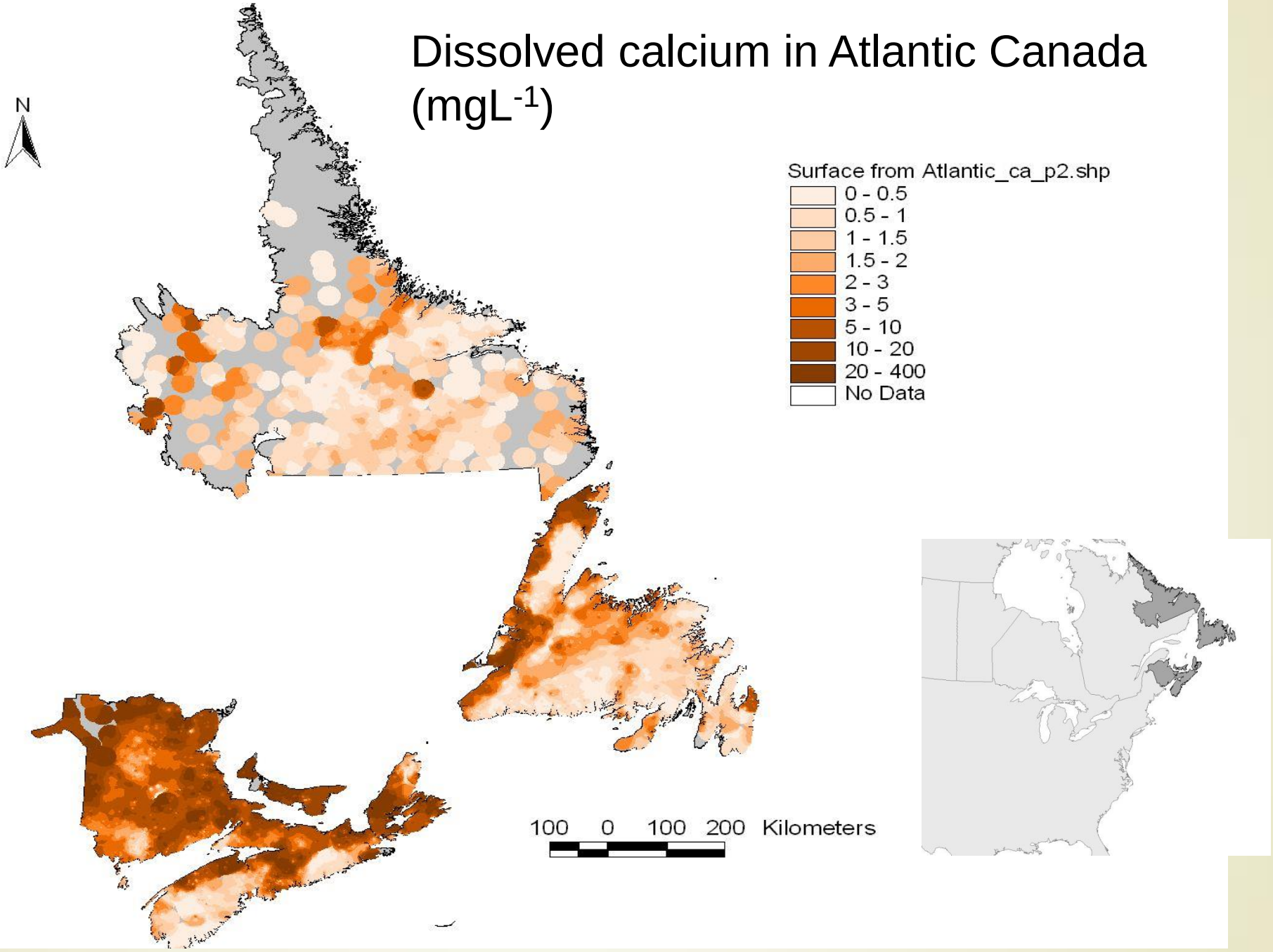


1531

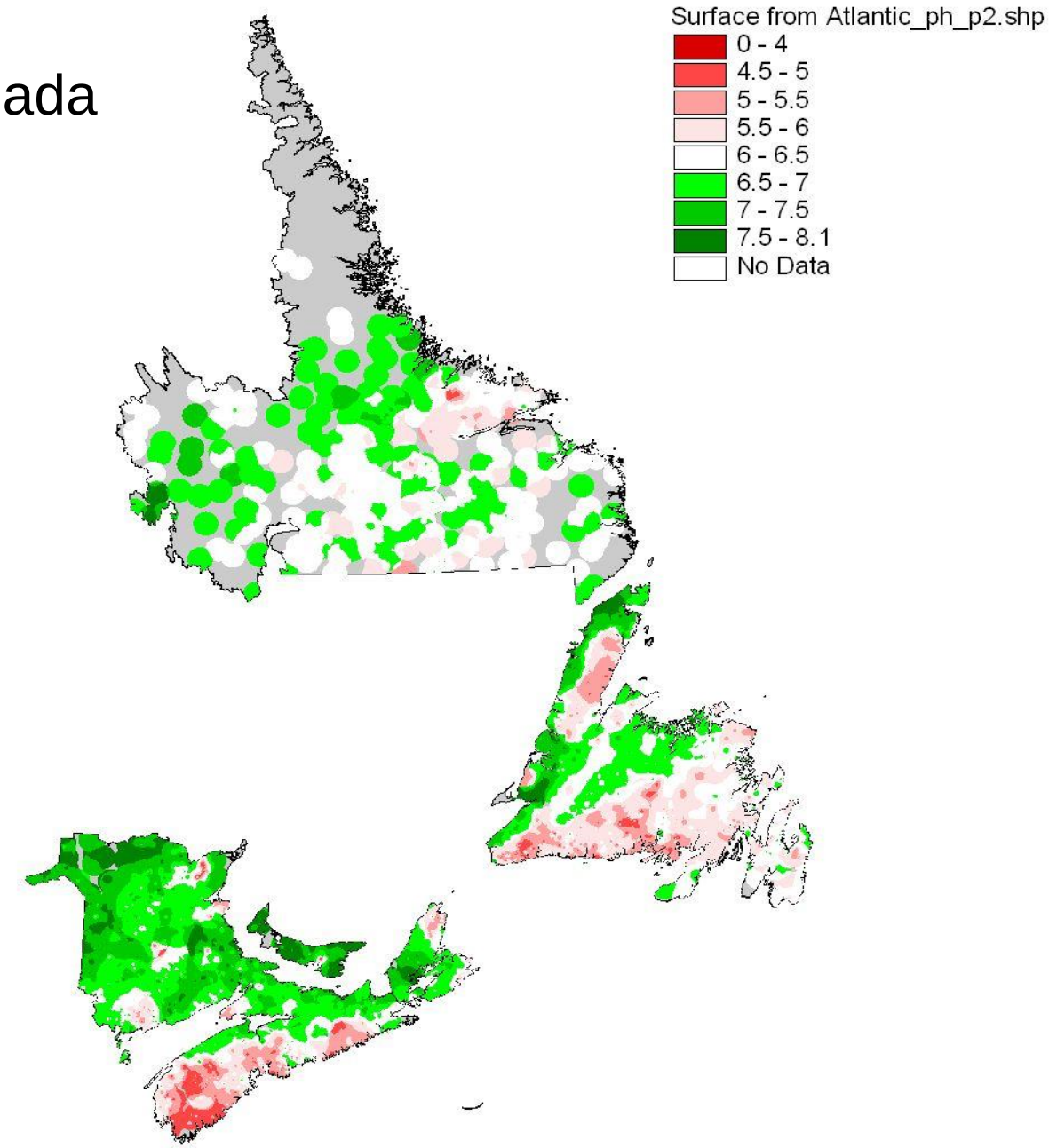
Sulfur deposition changes

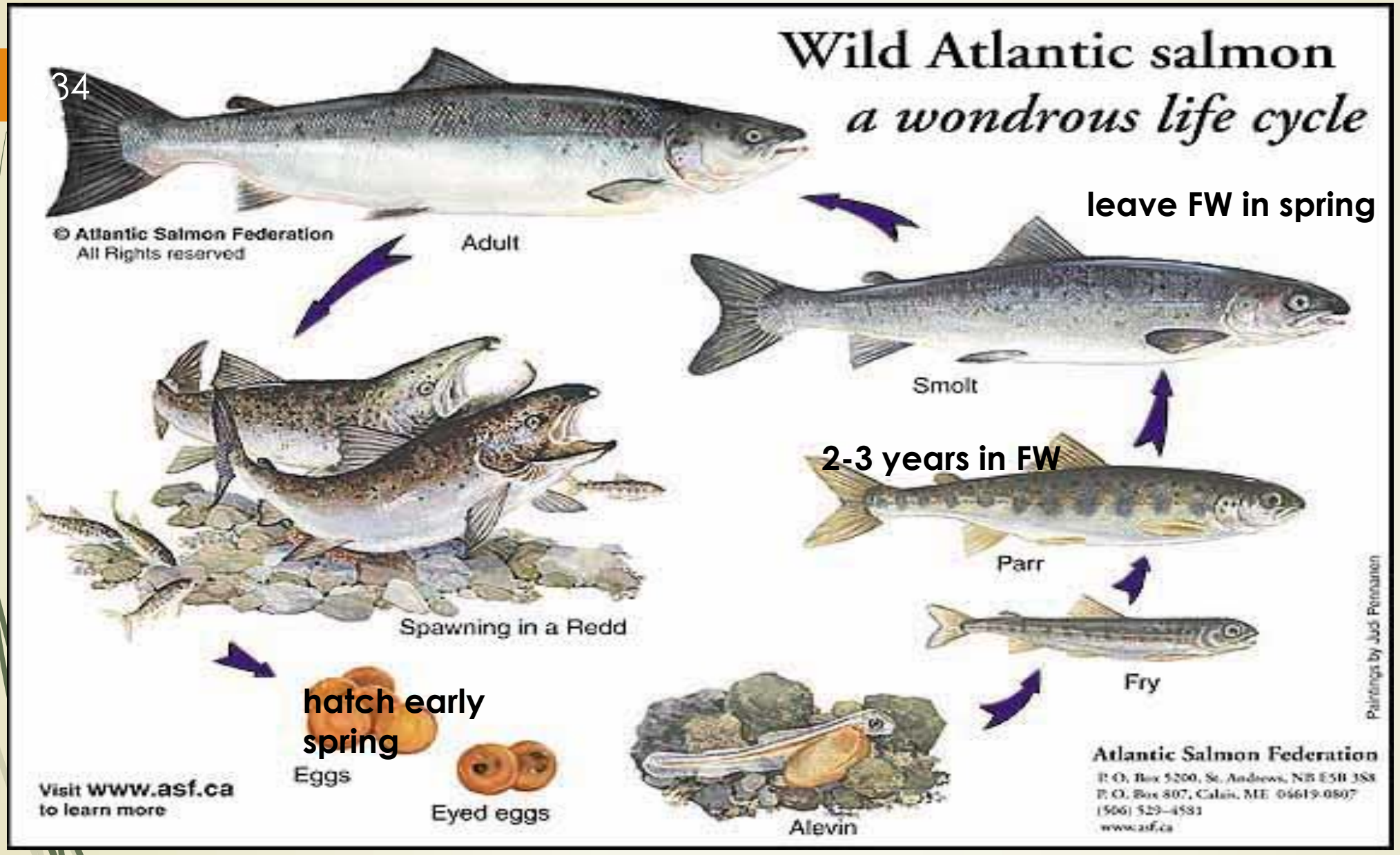


Dissolved calcium in Atlantic Canada (mgL^{-1})



pH in Atlantic Canada

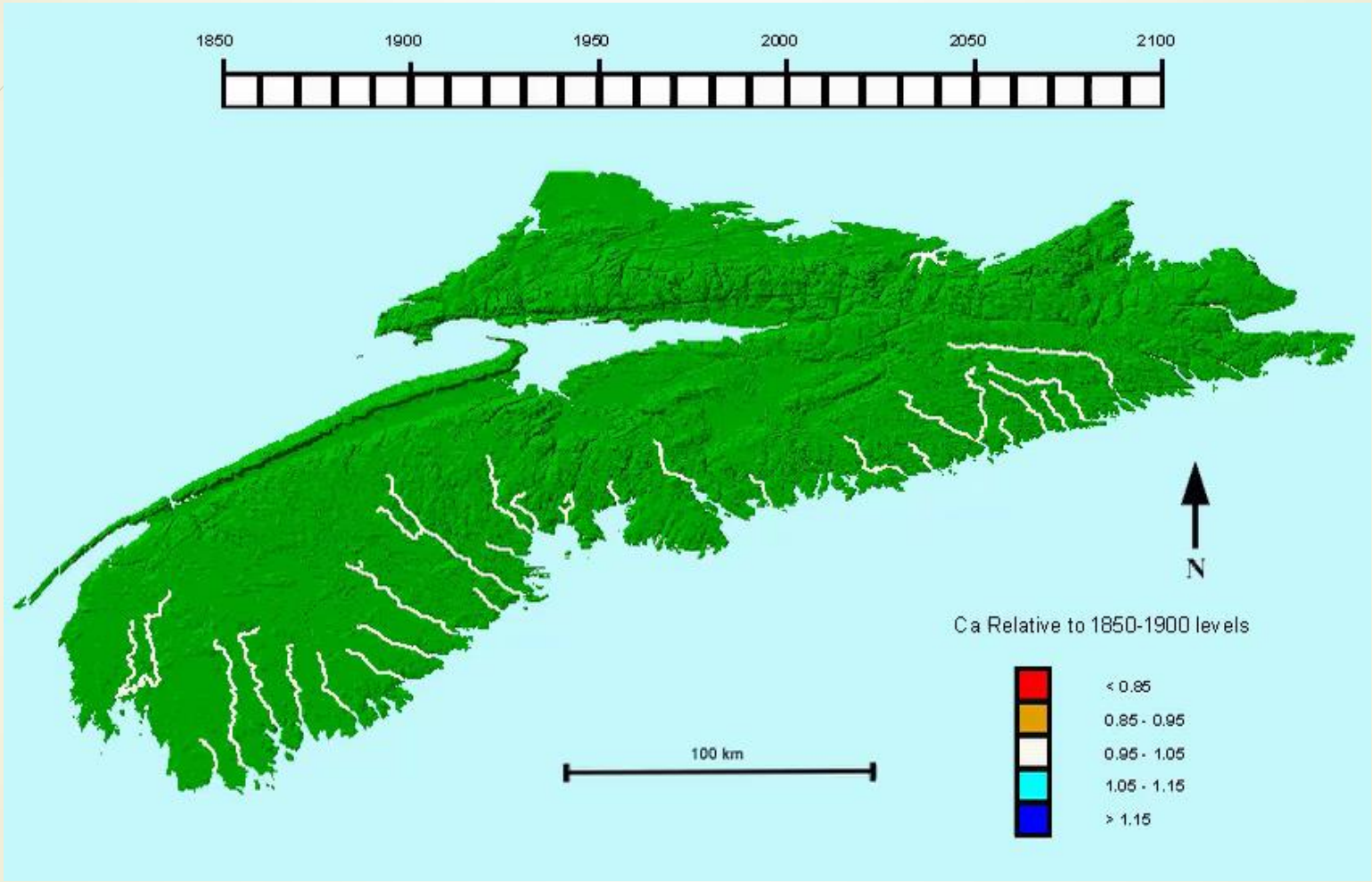



Wild Atlantic salmon
a wondrous life cycle
© Atlantic Salmon Federation
All Rights reserved
Adult
leave FW in spring
Smolt
2-3 years in FW
Parr
Fry
Spawning in a Redd
hatch early spring
Eggs
Eyed eggs
Alevin
Visit www.asf.ca to learn more
Paintings by Judi Pennanen
Atlantic Salmon Federation
P. O. Box 5200, St. Andrews, NB E5B 3S8
P. O. Box 807, Calais, ME 04619-0807
(506) 529-4581
www.asf.ca

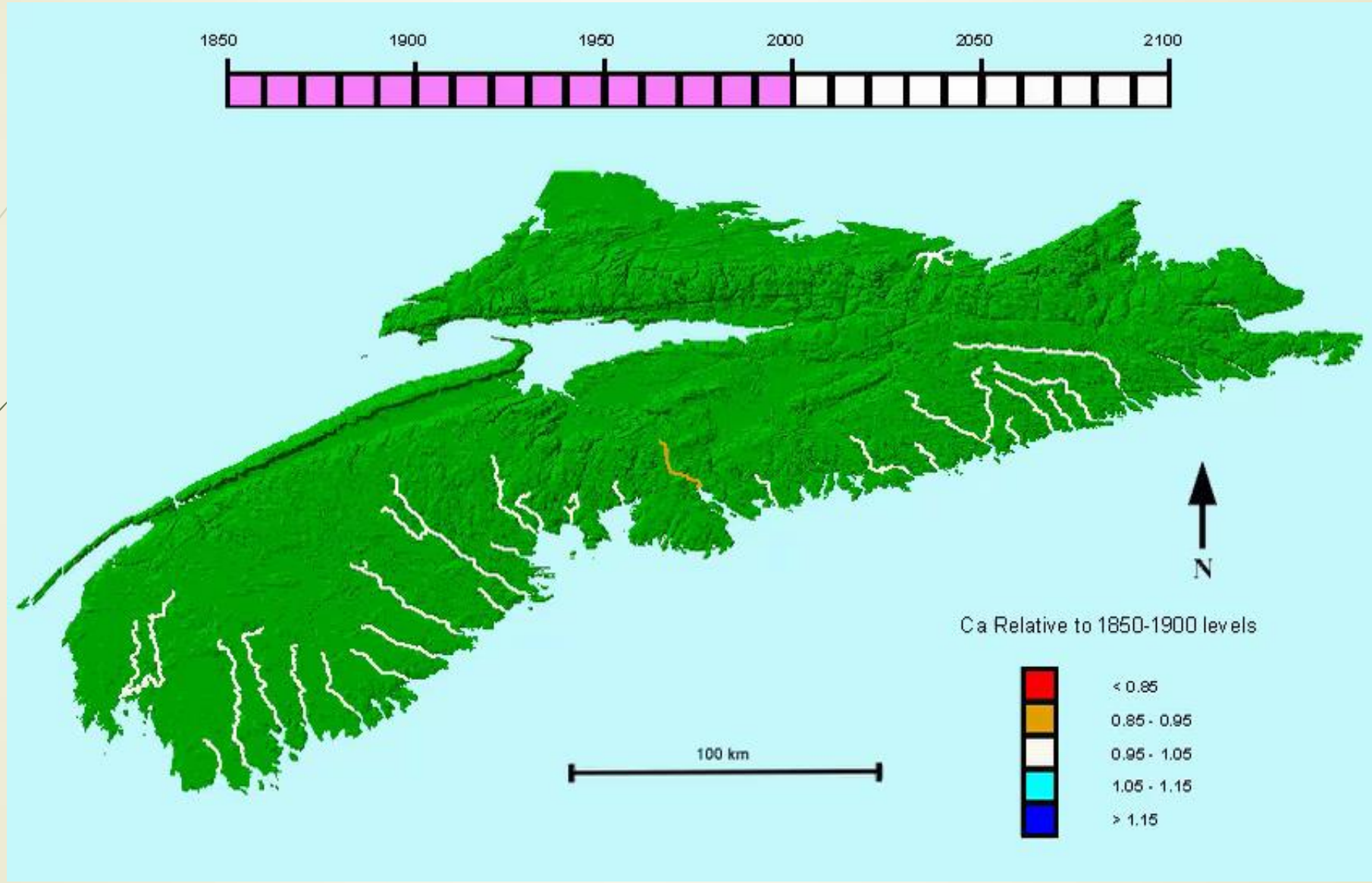
Calcium in rivers 1850-20000

estimated using the Model of Acidification of Groundwaters in Catchments (MAGIC)

1535



Calcium in rivers 2000-2100



Objective of our liming exercise?

- To allow the restoration of economically useful or endangered species
- Gene banking of endangered species
- Restauration of the habitat to previous historical conditions to allow recolonization by ‘natural’ populations
- It is not to ‘improve’ the habitat

Liming methods (how)

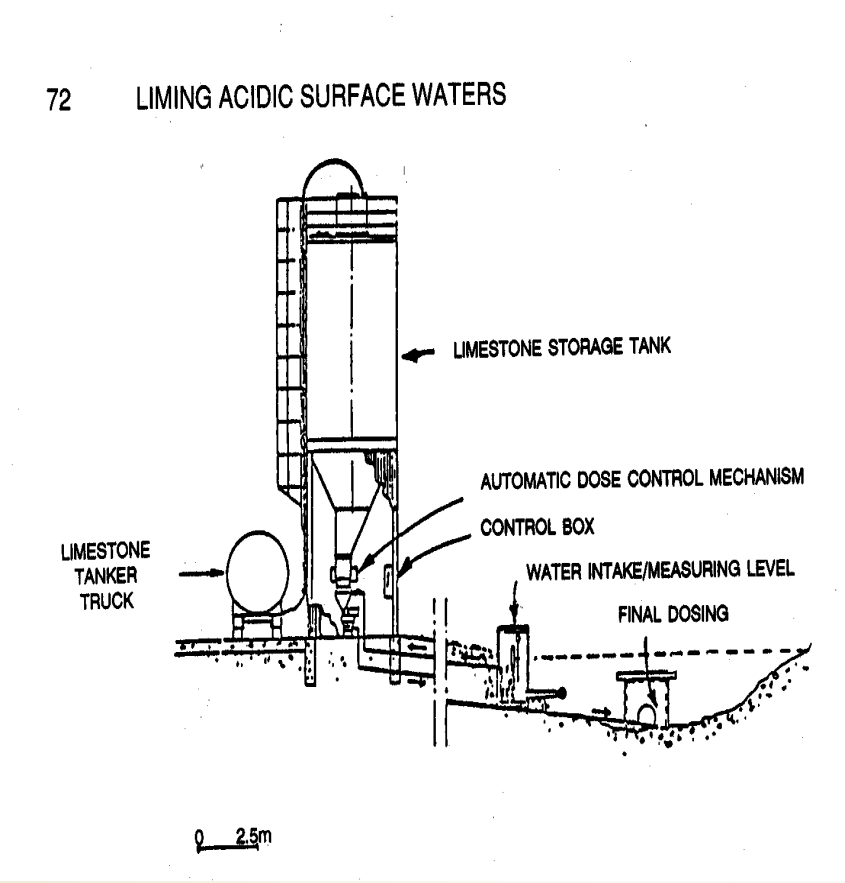
Buffering minerals (from Olem 1991)

Table 2.3 Theoretical Neutralization Equivalents of Selected Materials

Common Name	Formula	Formula Weight	Theoretical Neutralization Equivalent (%)[a]
Limestone	$CaCO_3$	100.09	100
Dolomite	$CaCO_3$-$MgCO_3$	184.42	109
Sodium carbonate	Na_2CO_3	106.00	94
Sodium bicarbonate	$NaHCO_3$	84.00	119
Calcined lime	CaO	56.08	179
Calcined dolomite	CaO-MgO	96.40	207
Hydrated lime	$Ca(OH)_2$	74.10	135
Dolomitic hydrate	$Ca(OH)_2$-MgO	114.42	175
Pressure dolomitic hydrate	$Ca(OH)_2$-$Mg(OH)_2$	132.44	151
Caustic soda	NaOH	40.01	125

[a] Relative neutralization equivalent if pure $CaCO_3$ is assigned a value of 100%.

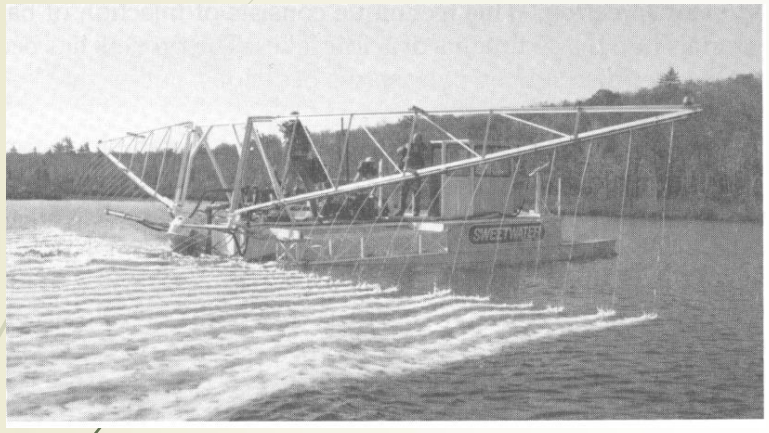
In-stream liming



- Advantages
- focused
- quickly acting
- easily adjustable to provide exact dosage required

- Disadvantages
- Long-term commitment
- mechanical equipment is prone to problems and failure can lead to immediate return to acidified conditions

Lake liming

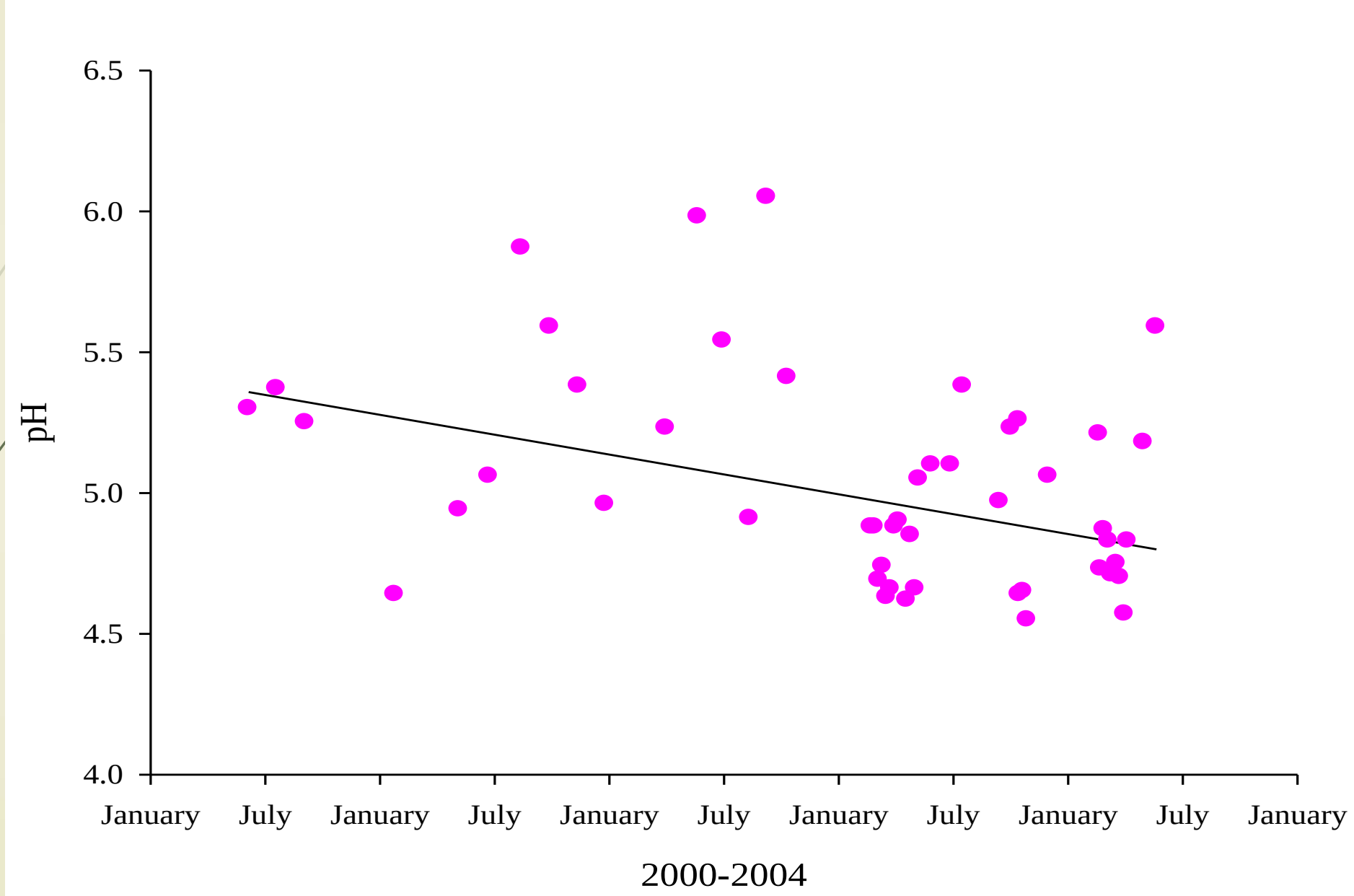


(from Olem 1991)

- Advantages
- direct application
- once every few years
- Disadvantages
- loss to sediments
- Dependent on lake water retention times
- Alkalinity ‘shock’

Big Lahave Lake liming

1542



Stream Bed liming

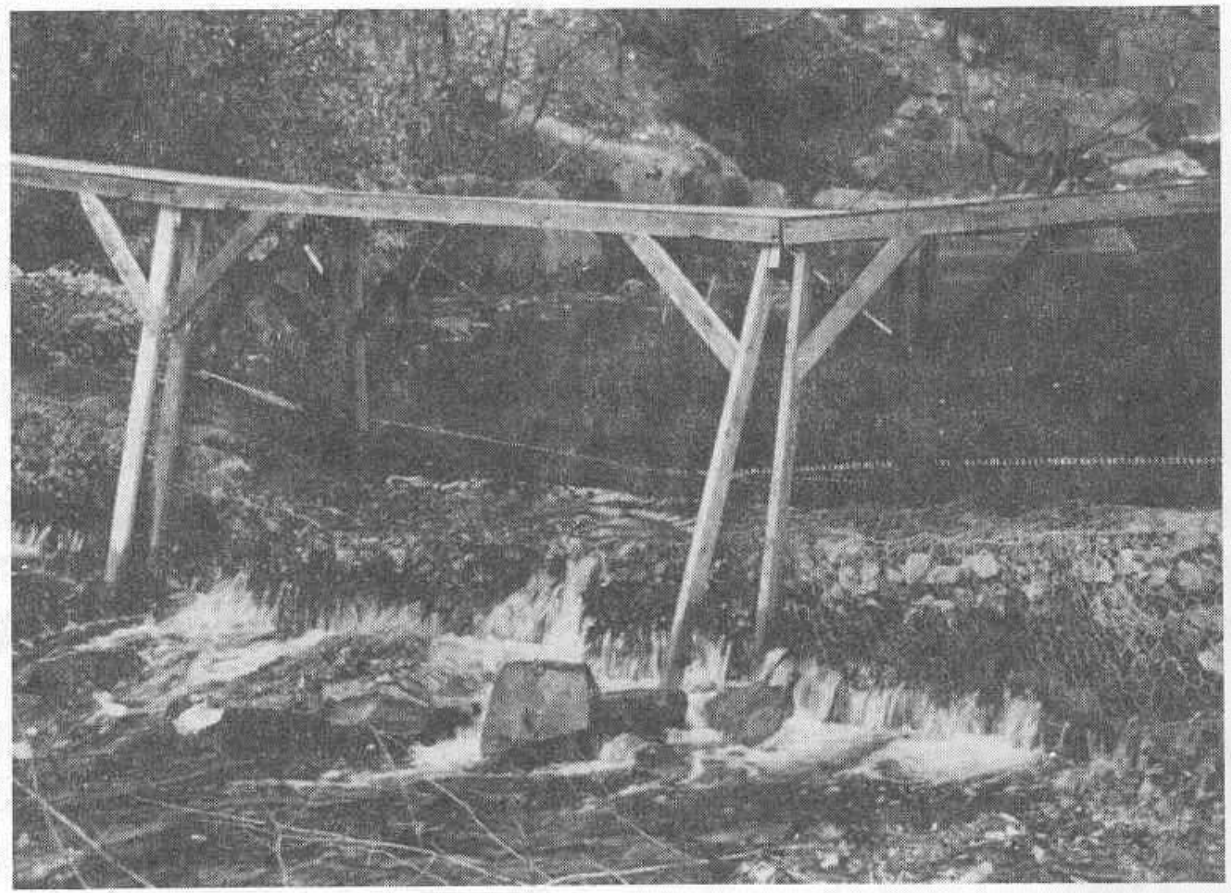
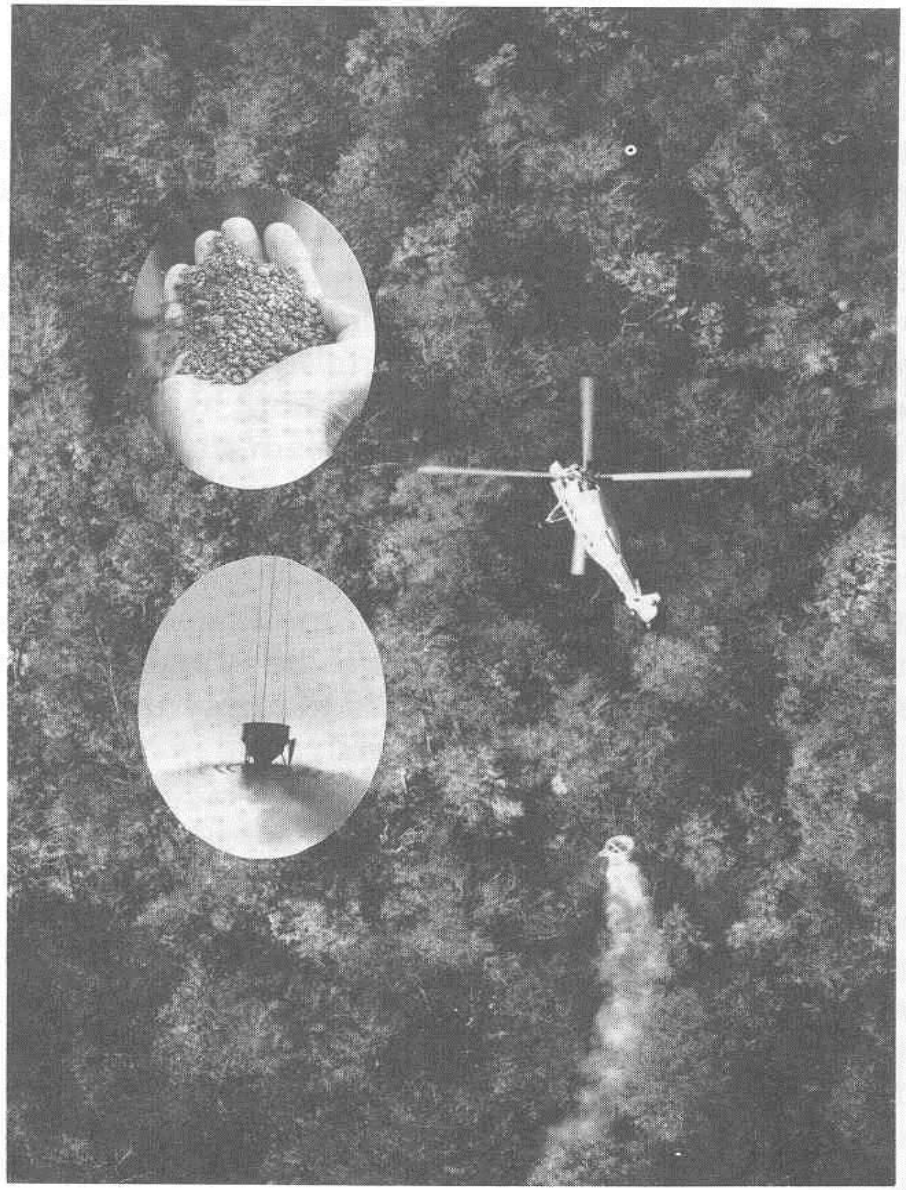


Figure 2.30 Limestone barrier operating on Gifford Run in Pennsylvania. (Photograph courtesy of Dean Arnold.)

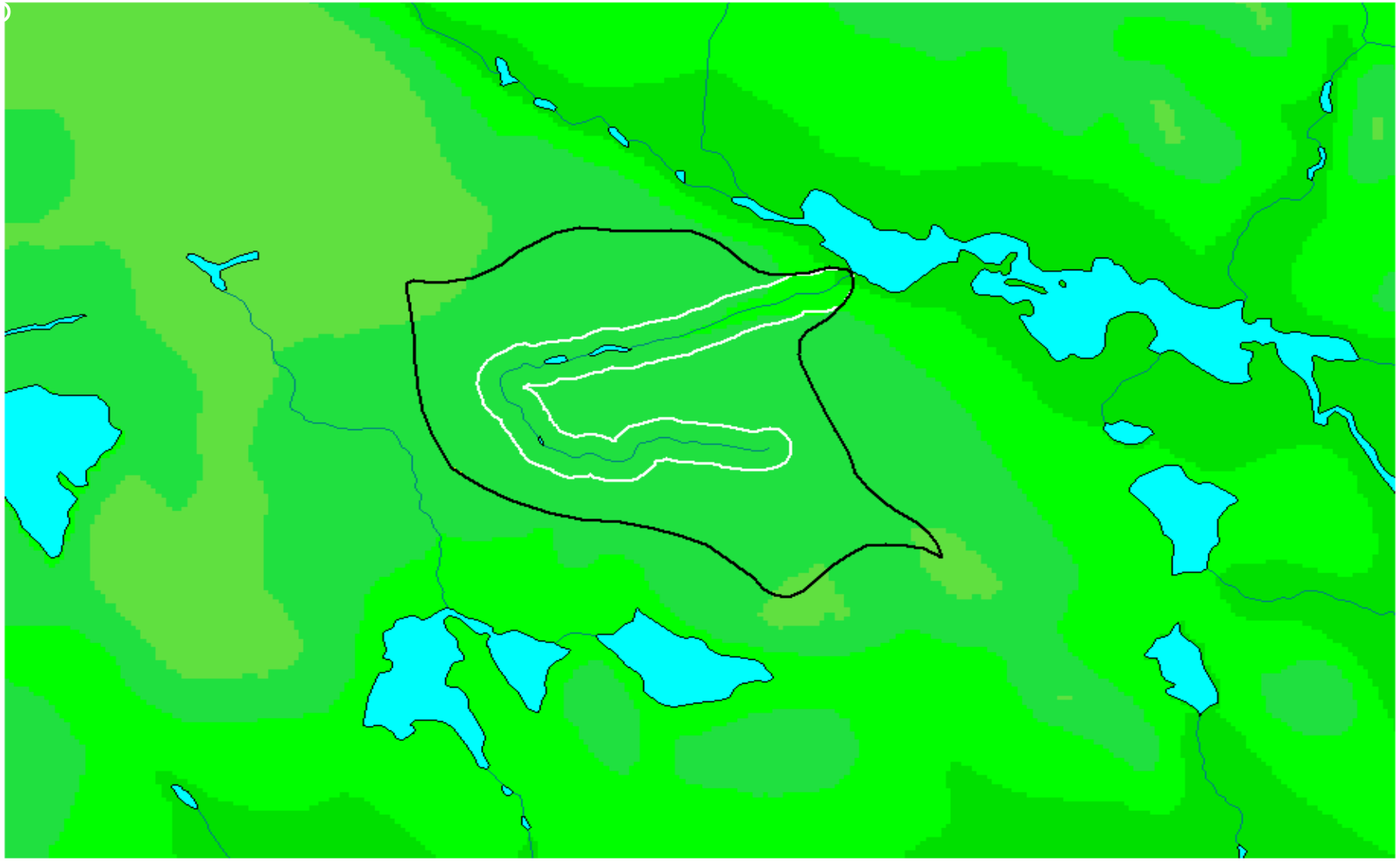
- Advantages:
- Long lasting, very focused, useful esp. with egg hatching
- Disadvantages:
- Very local, disturbs the streambed
- Is affected by peak floods
- Fouling by algae

Catchment liming



- Advantages:
  - other co-benefits
  - needs to be done less frequently
- Disadvantages
  - slower acting
  - more expensive at first
  - works only in good weather

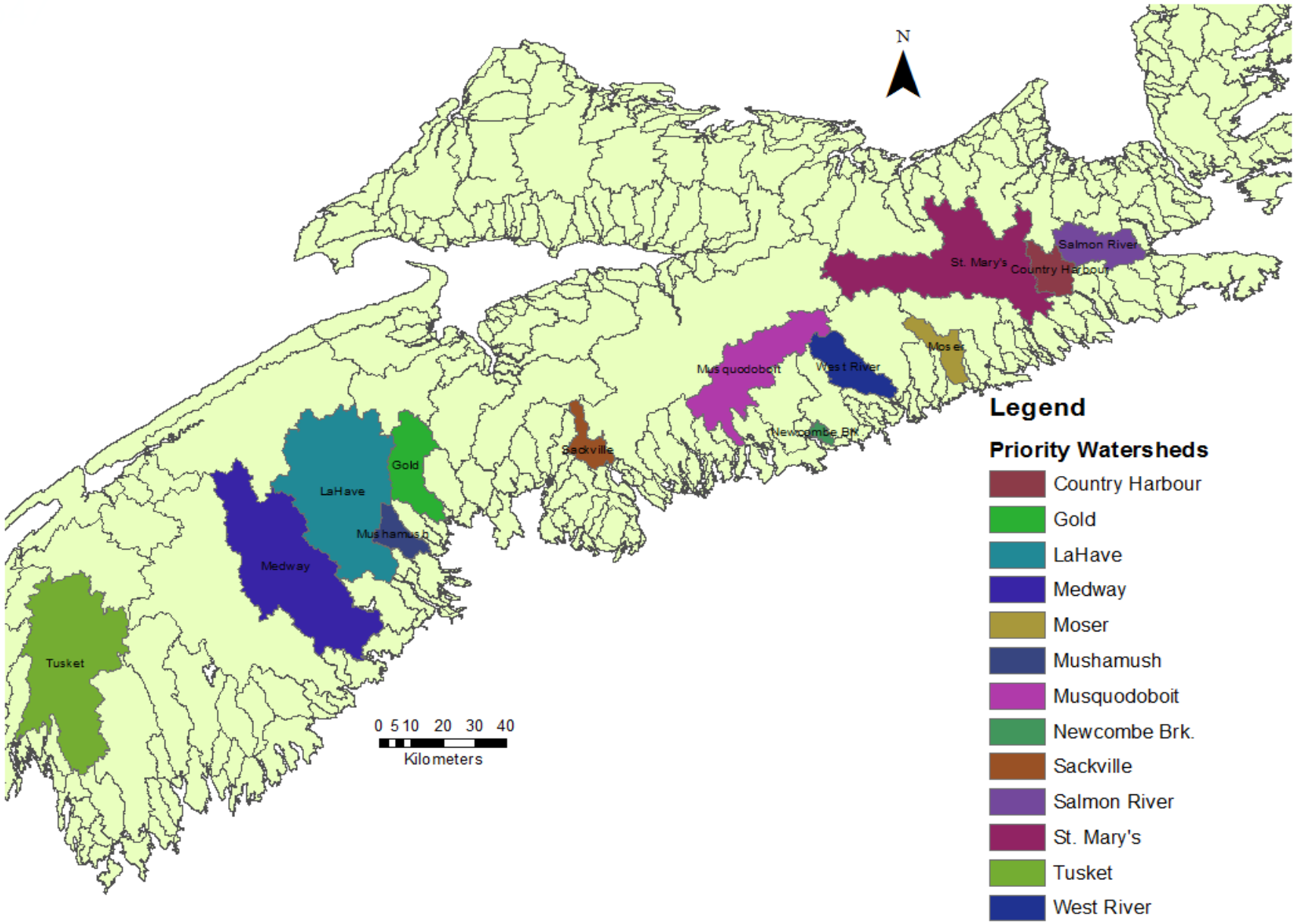
Example of catchment liming approaches



Watershed Area = 2.819 km2
River 100m buffer Area= 0.667 km2

Selection of catchments for liming(where)

Methods: study area



Methods: GIS Decision model

Four step Model:

Method	Outcome
1. Exclusionary analysis	Exclude catchments that do not support effective liming or the SU population
2. Identification of catchments	Identity catchments that meet the critical area requirement for salmon and support effective liming
3. Prioritization analysis	Assess catchments based on prioritization criteria that support feasible liming and the SU population
4. Site scoring	Score catchments based on prioritization analysis results and identify the priority catchments

Selection criteria

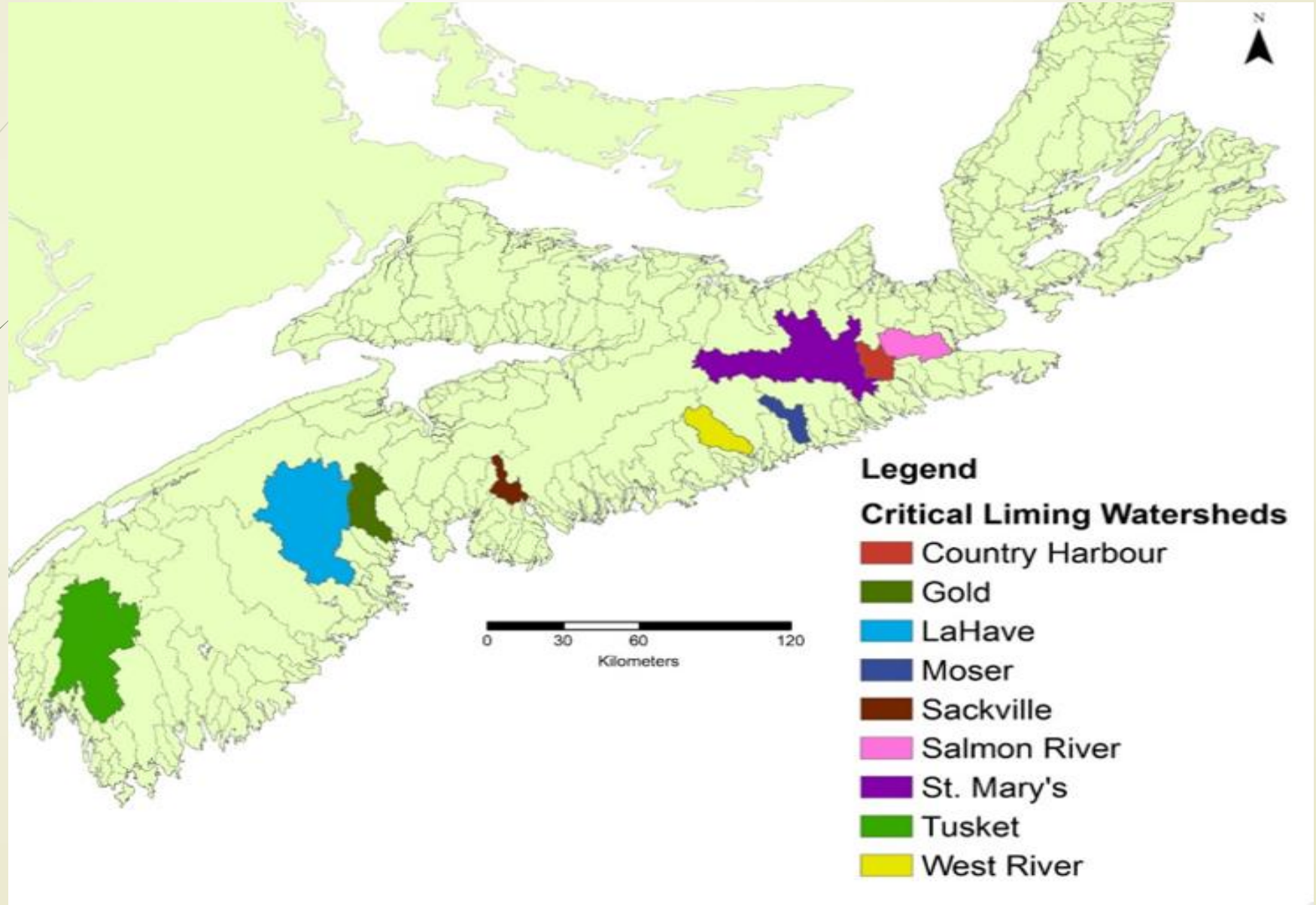
1549

Criterion	Unit of Measurement	Description
Acidification	Acid neutralization capacity (ANC)	Excluded basins with ANC > 5 mgL^{-1}
Acid rock drainage (ARD)	Proportion of area currently exposed to pyrite bearing slates	Excluded catchments exposed to > 5% ARD
Accessibility	GIS map with road network	Excluded catchments not accessible by road
Lake location	Lakes with > 100,000 m2 area	Excluded catchments draining into large lakes
Connectivity	Distance from catchment mouth to primary river emptying in ocean	Basins with greater connectivity are highest priority
Land ownership	Proportion privately owned	Catchments with lower private ownership have highest priority

Priority liming watersheds

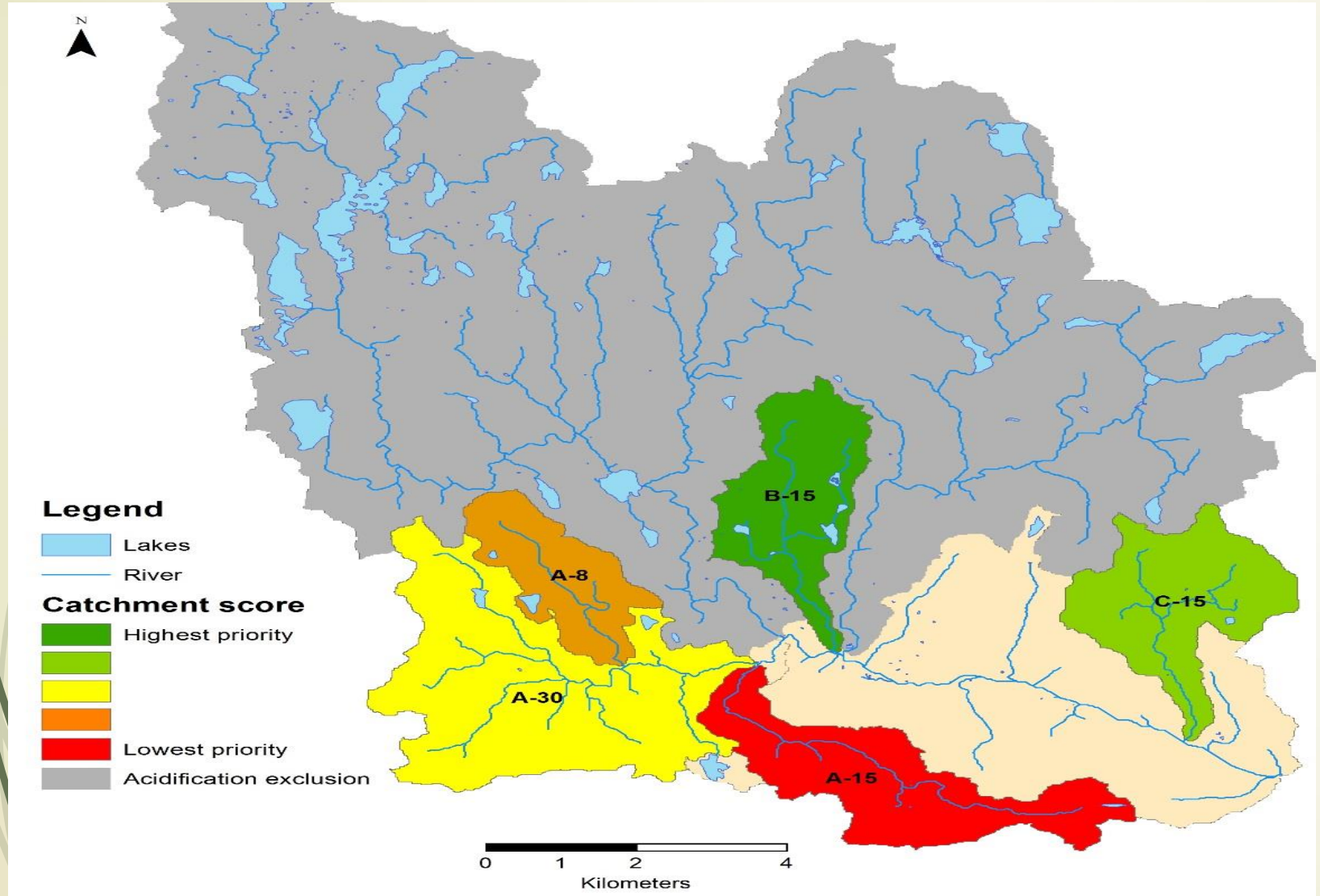
Watersheds remaining following the exclusions

1550



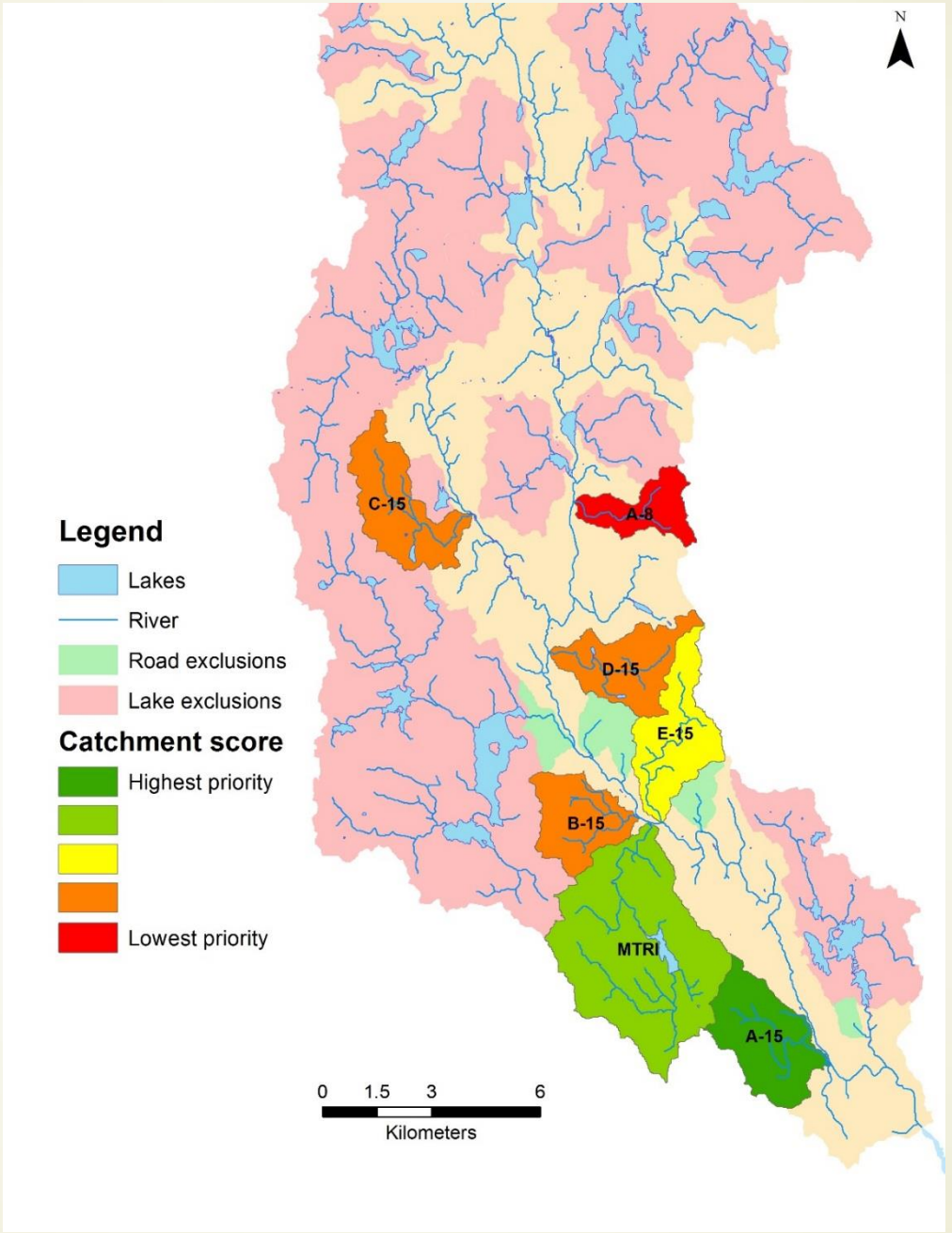
1551

Country Harbor Watershed



Gold River Watershed

1552



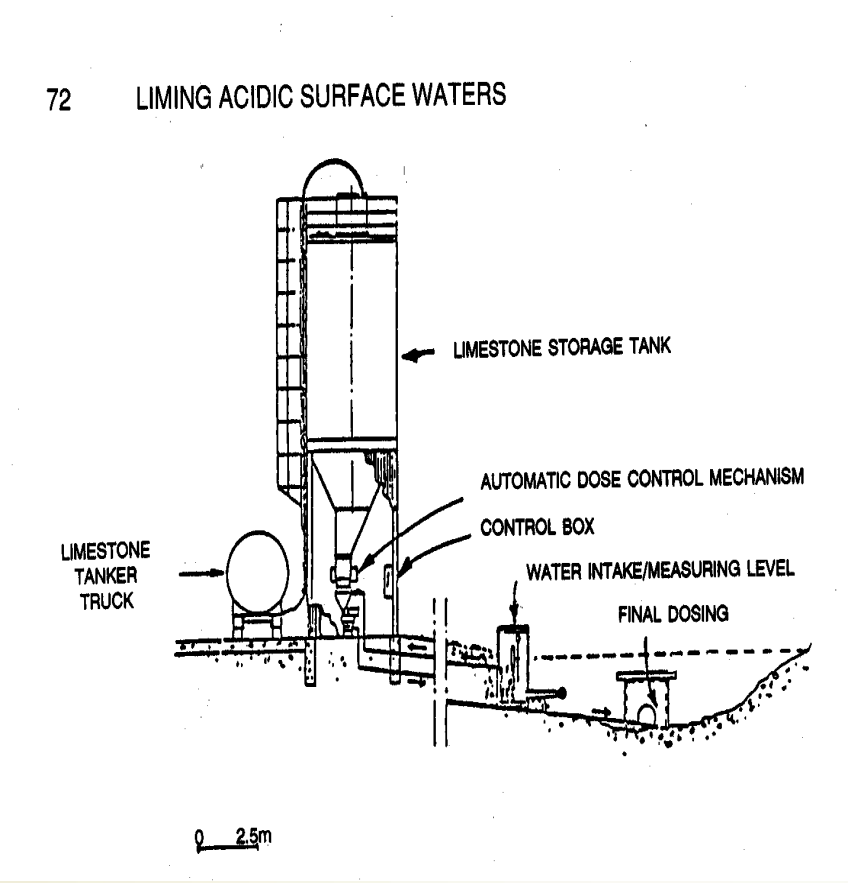
How do we estimate how much lime is needed? Literature estimates

Summary of selected catchment liming dosages and chemical effects

Location	Reference	Catch. size	dosage rate	reported effect
Norway	Traaen et al 1997	25 ha	3t ha^{-1} $CaCO_3$	pH from 4.5 to 7.0. Improvements lasting for at least 20 years
Norway	Hindar et al. 2003	80 ha	3t ha^{-1} $MgCO_3$	pH inc to 6.0, Ca, Mg, ANC also increase,
Wales	Jenkins et al. 1991	34 ha	9t ha^{-1} $CaCO_3$	incr. pH, lasting at least 10 years
Wales	Waters et al. 1991	recharge area	16t ha^{-1} $CaCO_3$	same effect as liming whole catchments
Scotland	Howells 1991	various sizes	5 to 30t ha^{-1} $CaCO_3$	pH from 4.5 to >6.0 and Ca^{+2} from 50 to 150 $ueqL^{-1}$
Germany	Kreutzer 1994		2-4t ha^{-1} $CaCO_3$	5 to 10 years protection of drainage waters
Sweden	Fransman and Nihlgaard 1995	20 ha	5t ha^{-1} $MgCO_3$	incr. pH, Ca^{+2}, ANC
NY State	Driscoll et al 1996 Blette et al. 1996	100 and 200 ha	6.9t ha^{-1} $CaCO_3$	gradual incr in pH, Ca^{+2}, ANC, prob lasting 50 years
Sudbury, Ontario	Gunn et al. 2001	38 ha,	10.8t ha^{-1} $MgCO_3$	incr. pH, base cations, reduced metals to background

How do we estimate how much lime is needed? Calculation

In-stream liming West River



Annual lime dosage into the river to maintain a pH of 6.0 = 375 ton/yr

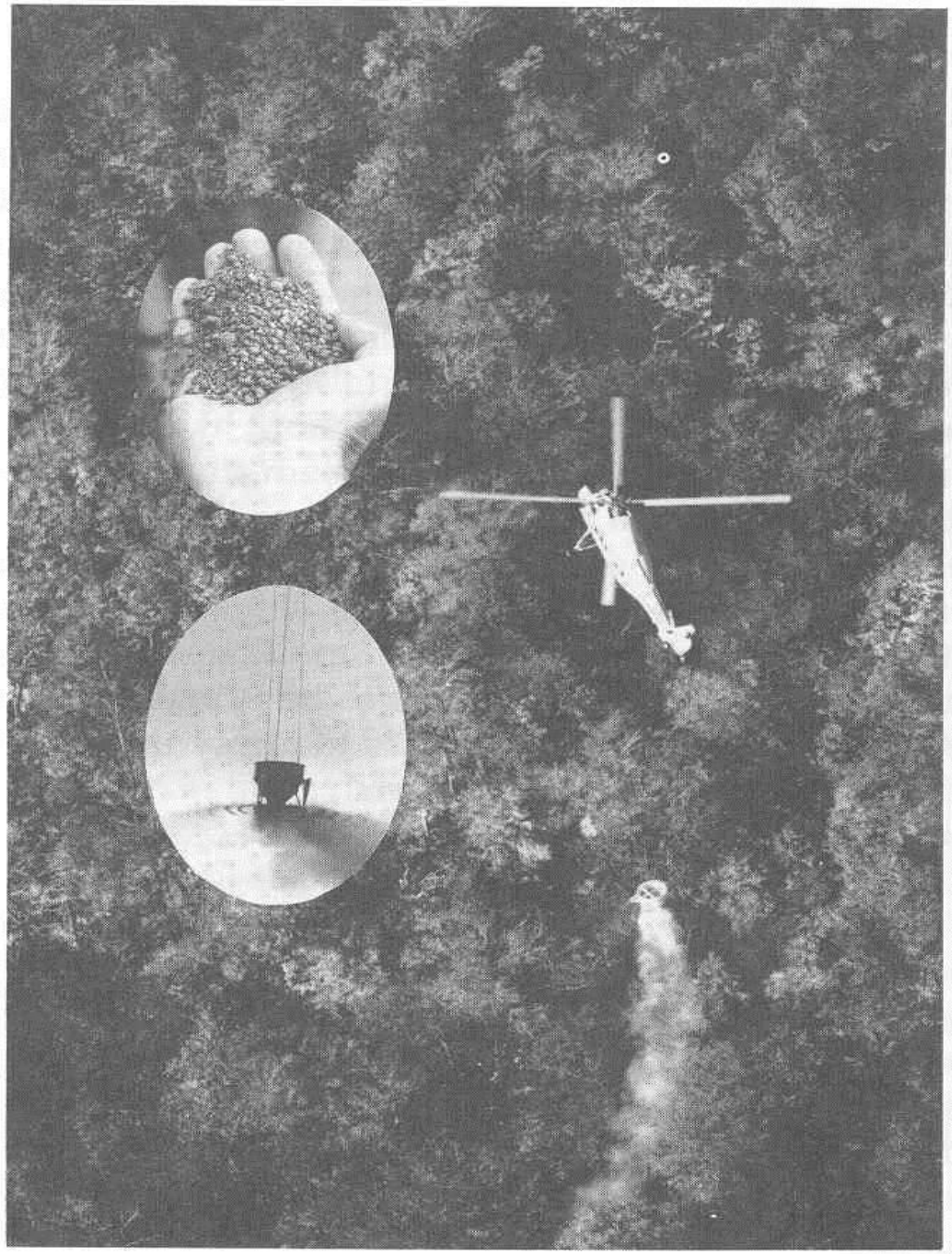
- Catchment size 317,000 ha
- Dosage/ha/yr = 0.0012 t/ha

Dosage/ha/yr = 0.0012 t/ha
= 0.12 t/100 yrs

- Compared to typical dosage applied in field studies (~3-10 kg/ha) this is 1000-10,000 times smaller
- If this is accurate, then it would mean that most of the liming material applied is tied up in soils or plants
- However, this calculation must be re-evaluated to make certain that the assumptions are correct

How to lime a catchment cheaply

1558



- Helicopter swinging a concrete bucket with the opening calibrated to allow a measured amount to be released over a catchment
- Very expensive

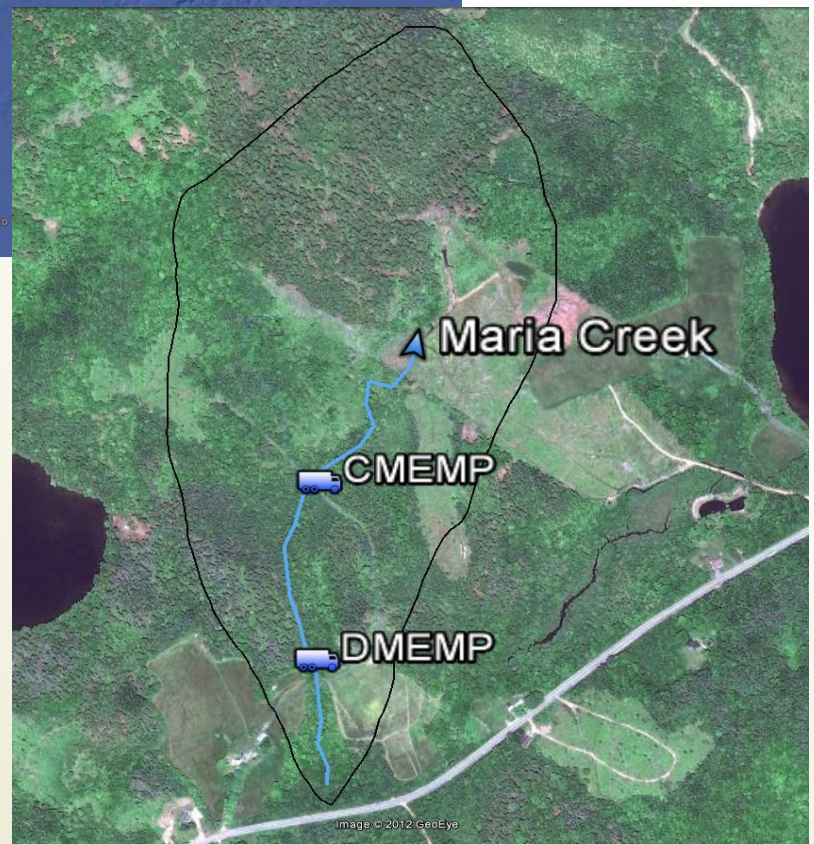
Maria Brook in central Nova Scotia: criteria for catchment selection

- We chose Maria Brook catchment based on:
  - Land cover (typical regional forest)
  - No roads or development in the basin
  - Well defined headwater catchment
  - low invasive species,
  - high connectivity to salmon/trout stream
  - Supportive land owners

Maria Creek catchment liming study

1561







Maria Brook Statistics

- 4700 ha
- Recharge area 8.1 ha
- South aspect
- Elevation: 190-225 m ASL
- Abutting an access road at the stream mouth



Liming – First phase

- First installment of lime May 2012
- 5 tonnes of $CaCO_3$ per hectare in the recharge area – 17% of total catchment

Liming

1564







All photos of the limestone application with the New Germany High School students and BCAF at Maria Brook. Taken in May 2012

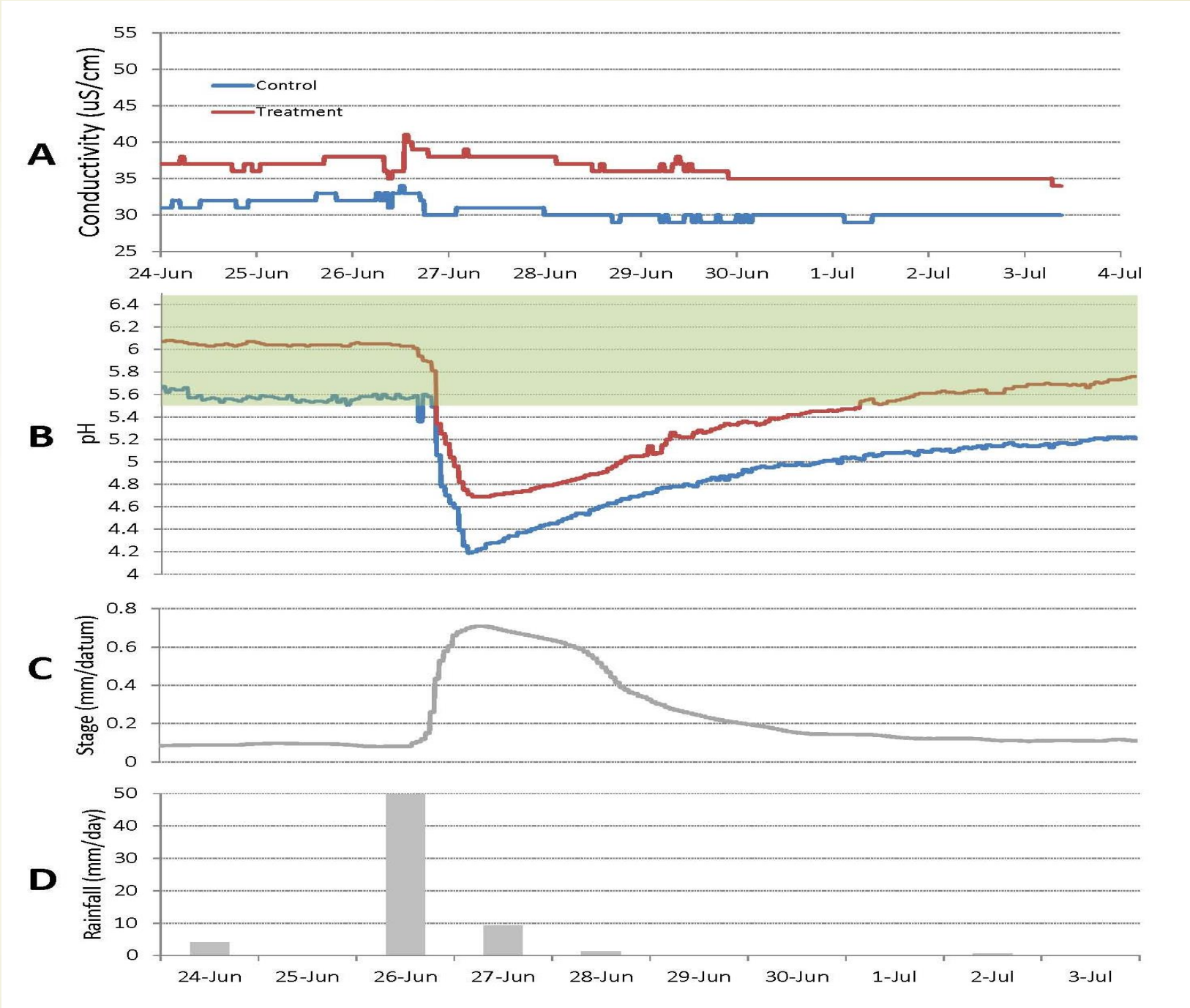
How did this work?

- Advantages: cheap, accurate
- Disadvantage: limited area which can be treated, dependent on topography

Results of liming effort

1566

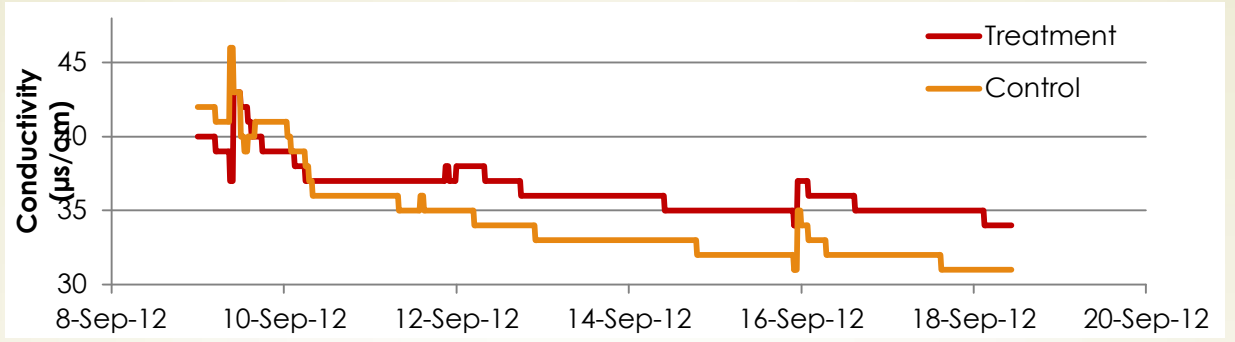
Episode amelioration June-July

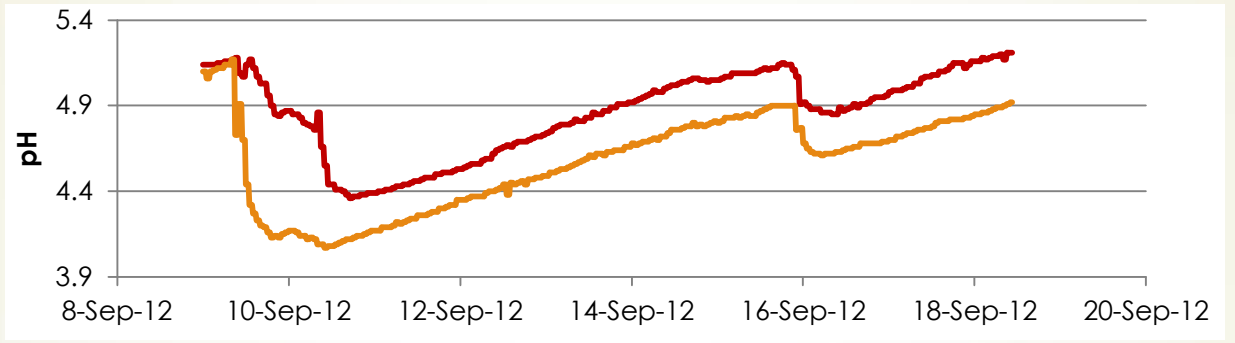


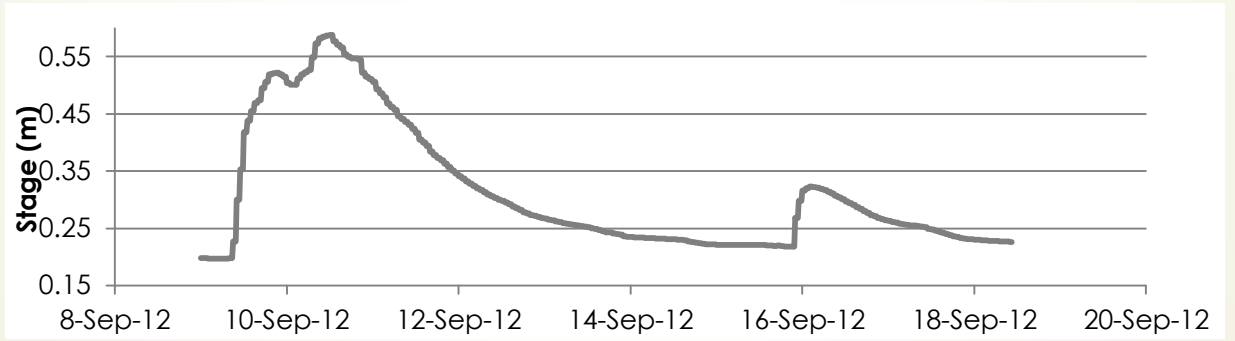
1568

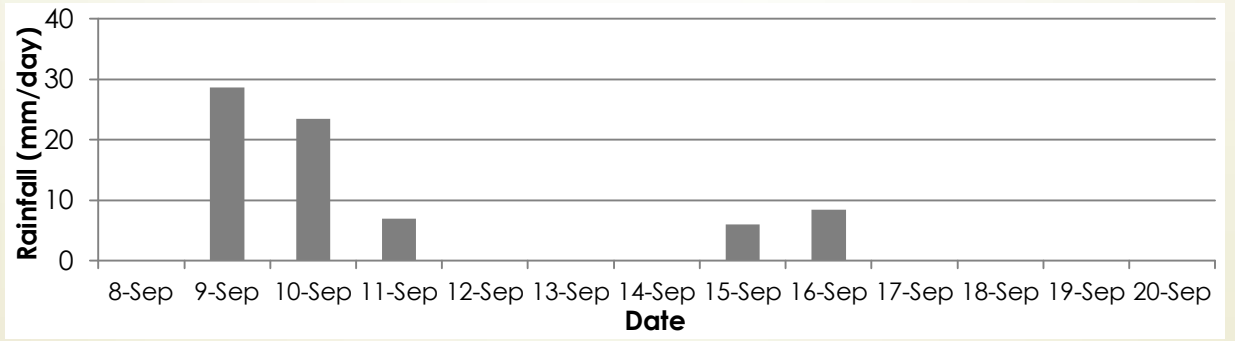
Graphs of conductivity, pH, stage and rainfall amount depicting an acidic episode. The treatment site is red, control site is blue.

September





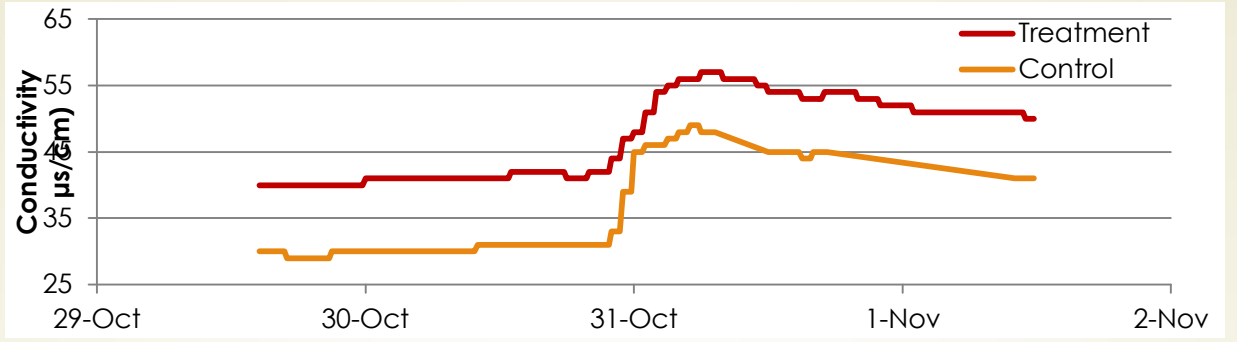


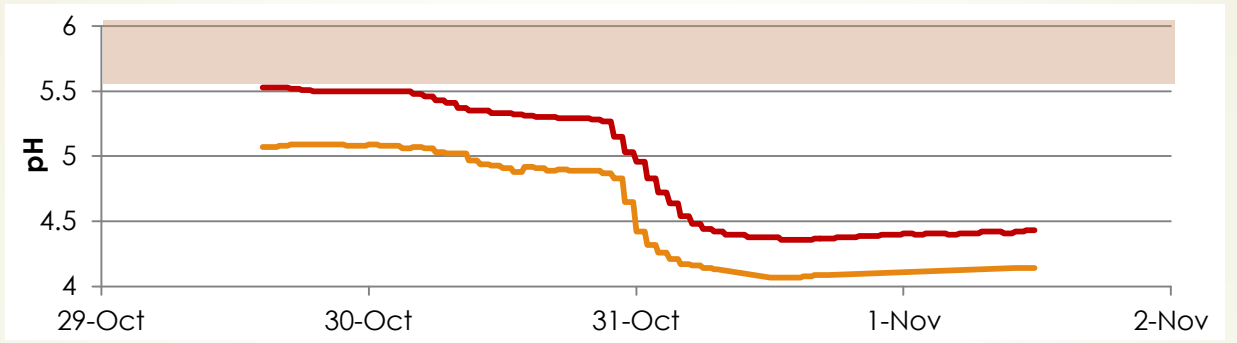


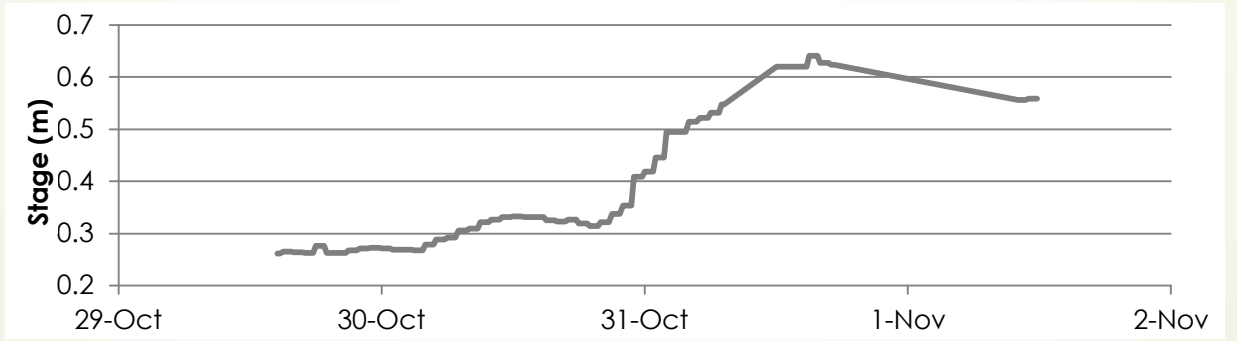
1569

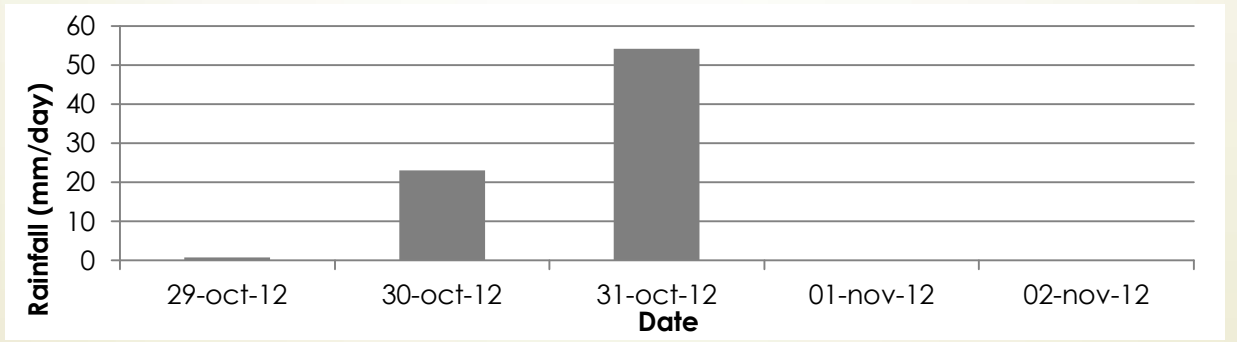
Graphs of conductivity, pH, stage and rainfall amount depicting an acidic episode. The treatment site is red, control site is blue.

October-November









Lessons learned

- It is very difficult to predict the alkalinisation needs of forest soils in order to reach a desired outcome, especially when little is known about the region's soil chemistry, but
- Catchment selection must be done carefully to ensure that the treatment to the site will be doable and will achieve the required results
- The goal of liming should be ecosystem restauration and not improvement. Acidic wetlands should not be limed as they are only a reflection of the surrounding catchment

Lessons Learned – part 2

- Catchment liming as a mitigation approach is still in the experimental stage for several reasons:
- Cost – the application of lime over natural areas, as opposed to agricultural systems is difficult and requires more resources to accomplish
- Reproducibility – we are not yet at the stage where we can assess forest soil and plant cover and then quantitatively determine how much should be applied, unlike simple agricultural systems
- Nevertheless, there is a great deal of information on changes to damaged ecosystems with improvements environment quality which can be learned from catchment mitigation studies



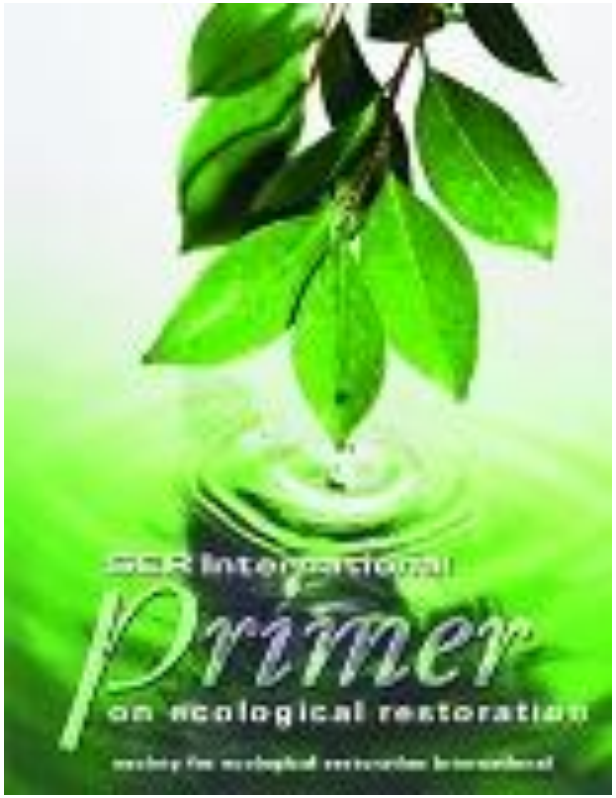
Emerging ideas about temperate forest restoration in the western United States

James G. Hallett

Eastern Washington University
Cheney, Washington



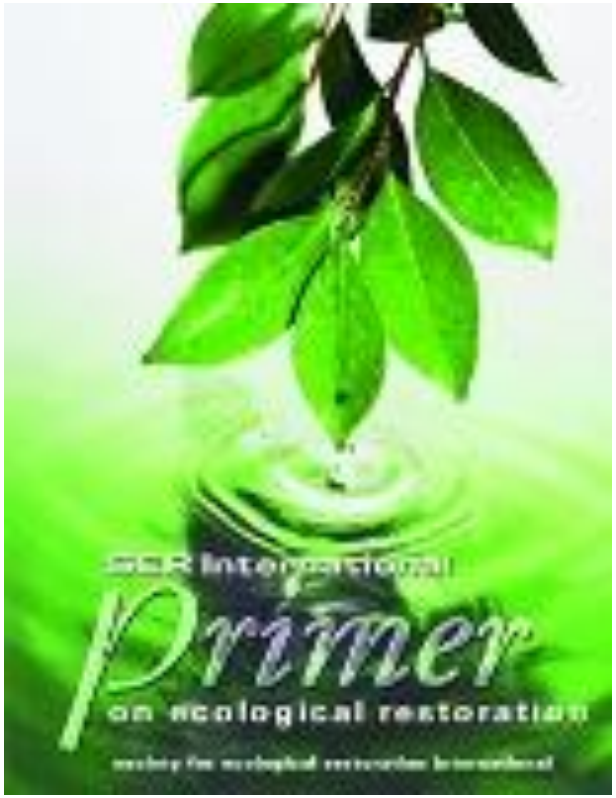
Ecological restoration defined



Ecological restoration is the process of ***assisting*** *the recovery of an ecosystem that has been degraded, damaged, or destroyed.*

Society for Ecological Restoration Primer (2004)

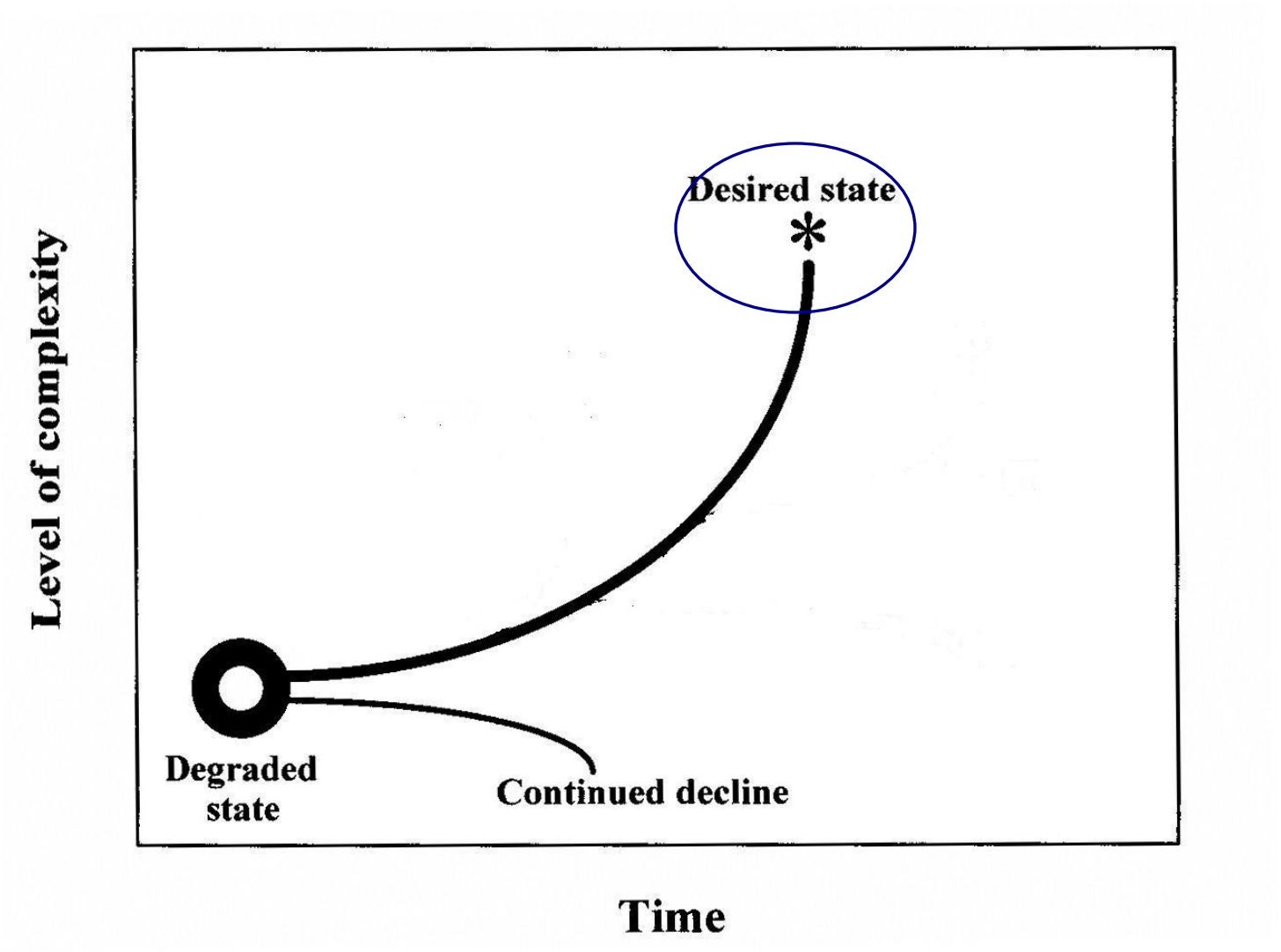
What is the restoration target?



Ecosystem resumes a trajectory that follows the historic continuity for that ecosystem as guided by a ***reference*** *model.*

Society for Ecological Restoration Primer (2004)

We attempt to move an ecological system from a degraded state to a “desired state.”



“Desired state” = Reference system

- Representation from nature to guide planning and implementation
- Species composition, community structure, abiotic environment, flows of organisms and materials across the landscape
- Representation can take numerous forms

Ecological objectives of restoration

Category	Attribute
Form	Similarity to reference
	Indigenous species

Society for Ecological Restoration Primer (2004)

Ecological objectives of restoration

Category	Attribute
Form	Similarity to reference
	Indigenous species
Function	All functional groups present
	Physical environment can sustain populations
	Normal ecosystem functioning
	Integrated in landscape

Society for Ecological Restoration Primer (2004)

Ecological objectives of restoration

Category	Attribute
Form	Similarity to reference
	Indigenous species
Function	All functional groups present
	Physical environment can sustain populations
	Normal ecosystem functioning
	Integrated in landscape
Stability	Threat elimination
	Resilience
	Self-sustaining

Society for Ecological Restoration Primer (2004)

Ecological objectives of restoration

Category	Attribute
Form	Similarity to reference
	Indigenous species
Function	All functional groups present
	Physical environment can sustain populations
	Normal ecosystem functioning
	Integrated in landscape
Stability	Threat elimination
	Resilience
	Self-sustaining

Society for Ecological Restoration Primer (2004)

Ecological objectives of restoration

Category	Attribute
Form	Similarity to reference
	Indigenous species
Function	All functional groups present
	Physical environment can sustain populations
	Normal ecosystem functioning
	Integrated in landscape
Stability	Threat elimination
	Resilience
	Self-sustaining

Society for Ecological Restoration Primer (2004)

Steps in the restoration process

Assessment

Ecological condition and context

Stakeholders

Steps in the restoration process

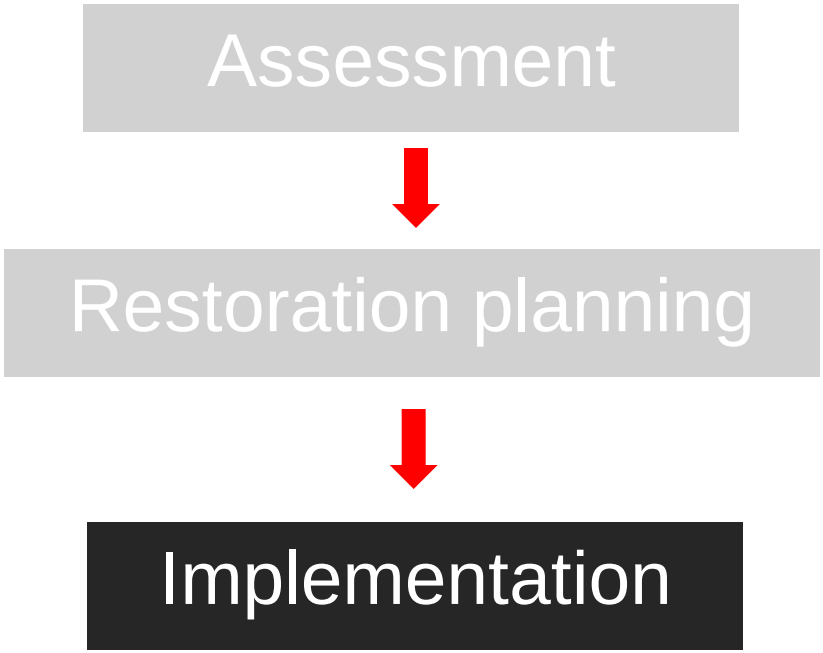
Assessment



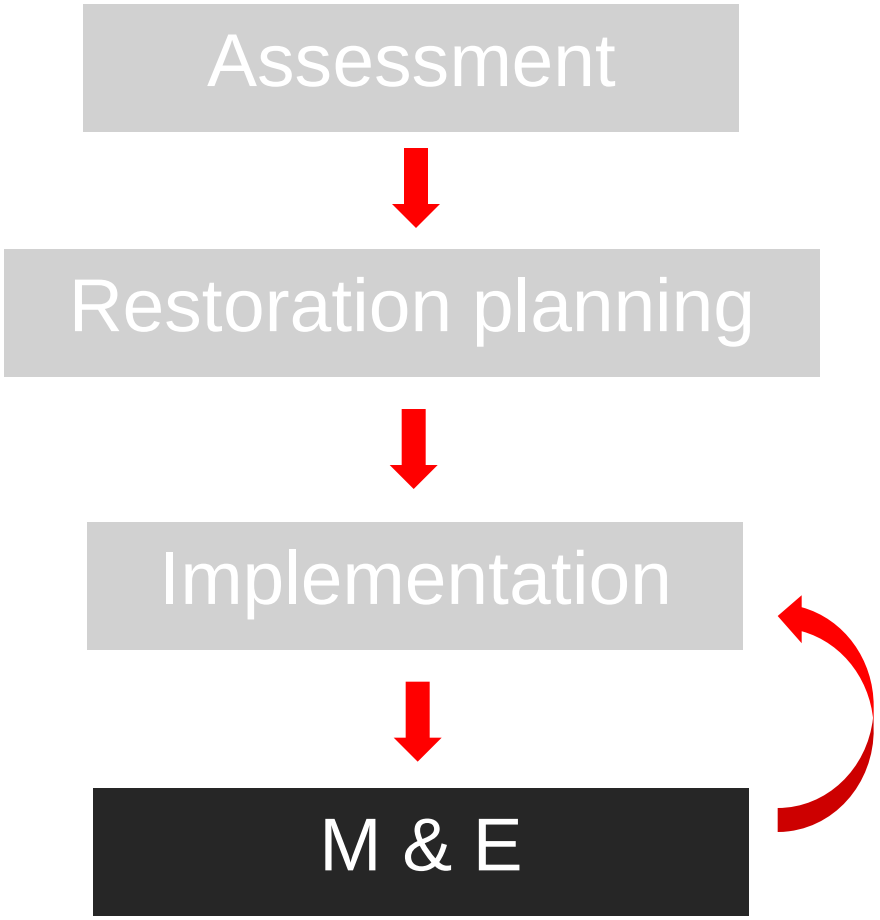
Restoration planning

- Reference system
- Definition of objectives
- Selection of restoration measures
- Implementation plan
- Monitoring and evaluation plan

Steps in the restoration process

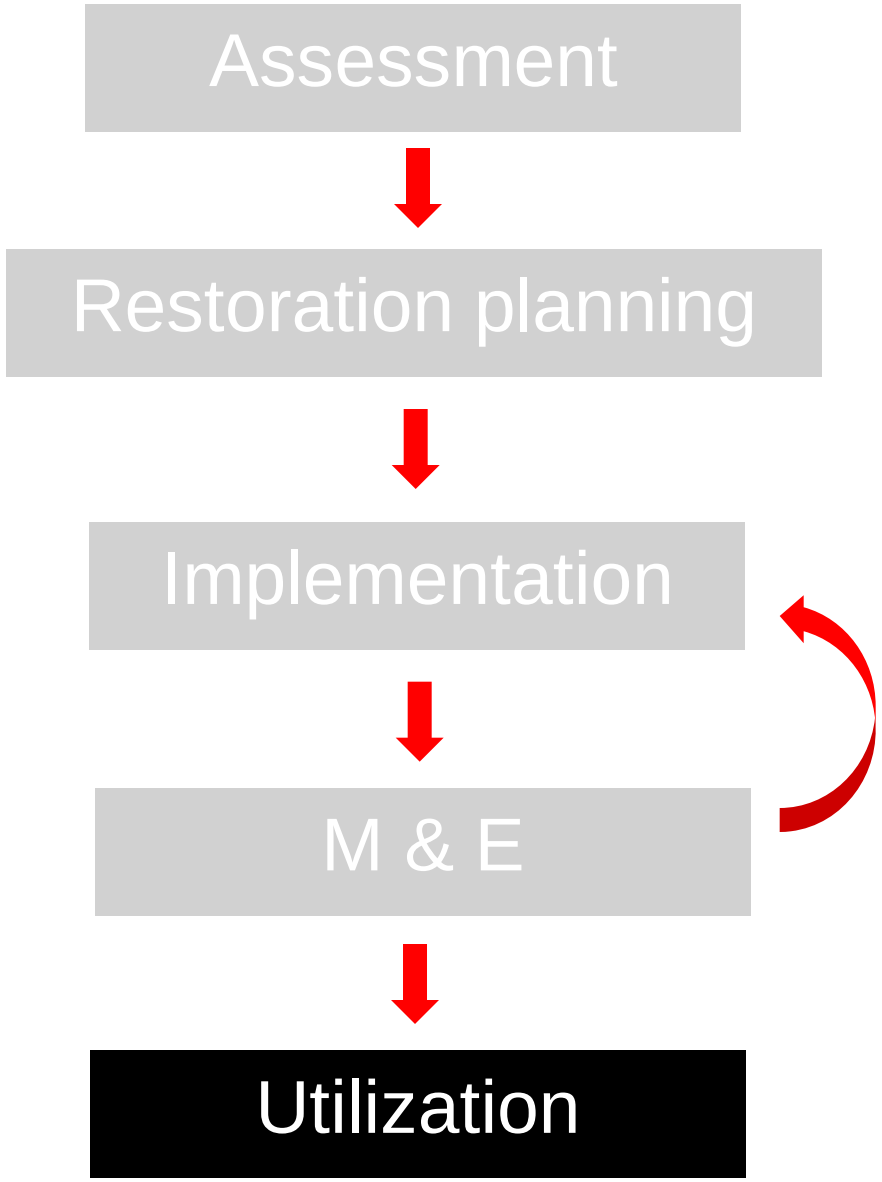


Steps in the restoration process



Evaluation allows modification of implementation plan and depends on comparison to a *reference* model

Steps in the restoration process



Maintenance

Communication of results

Recommendations for future projects

POLICY FORUM

ECOLOGY

Synthesizing U.S. River Restoration Efforts

E. S. Bernhardt,[1*†] M. A. Palmer,[1] J. D. Allan,[2] G. Alexander,[2] K. Barnas,[3] S. Brooks,[4] J. Carr,[5] S. Clayton,[6] C. Dahm,[7] J. Follstad-Shah,[7] D. Galat,[8,9] S. Gloss,[10] P. Goodwin,[6] D. Hart,[5] B. Hassett,[1] R. Jenkinson,[11] S. Katz,[3] G. M. Kondolf,[12] P. S. Lake,[4] R. Lave,[12] J. L. Meyer,[13] T. K. O'Donnell,[9] L. Pagano,[12] B. Powell,[14] E. Sudduth[13]

The importance of rivers and streams for fresh water, food, and recreation is well known, yet there is increasing evidence that degradation of running waters is at an all-time high (*1*). More than one-third of the rivers in the United States are listed as impaired or polluted (*2*), and freshwater withdrawals in some regions are so extreme that some major rivers no longer flow to the sea year round (*3*). Extinction rates of freshwater fauna are five times that for terrestrial biota (*4*, *5*). Fortunately, stream and river restoration can lead to species recovery, improved inland and coastal water quality,

We found that existing restoration databases are highly fragmented and often rely on ad hoc or volunteer data entry. Thus, we developed methods for the unbiased collection and cataloging of river and stream restoration projects. Here, we report a synthesis of information on 37,099 projects in the National River Restoration Science Synthesis (NRRSS) database.

The NRRSS database includes all stream and river restoration projects present in national databases as of July 2004, as well as a large sample of river and stream restoration projects from seven geographic regions (see

cess or failure of the
priori 13 categories o
fied each project acc
[see table, page 637 a

The number of ri
increased exponen
decade, paralleling
media and scientific
d]. However, restorati
geographic regions. M
from the Pacific Nor
Bay watershed, or C
below). Data from na
[(*17*) part b] made up
NRRSS database. Thu
supports some trac
restoration database
majority of projects a
the regional differenc
effort found with our

The most comm
river restoration in th
to enhance water q
riparian zones, (iii)
habitat, (iv) for fish
bank stabilization (
Projects with these g

POLICY FORUM

ECOLOGY

Synthesizing U.S. River Restoration Efforts

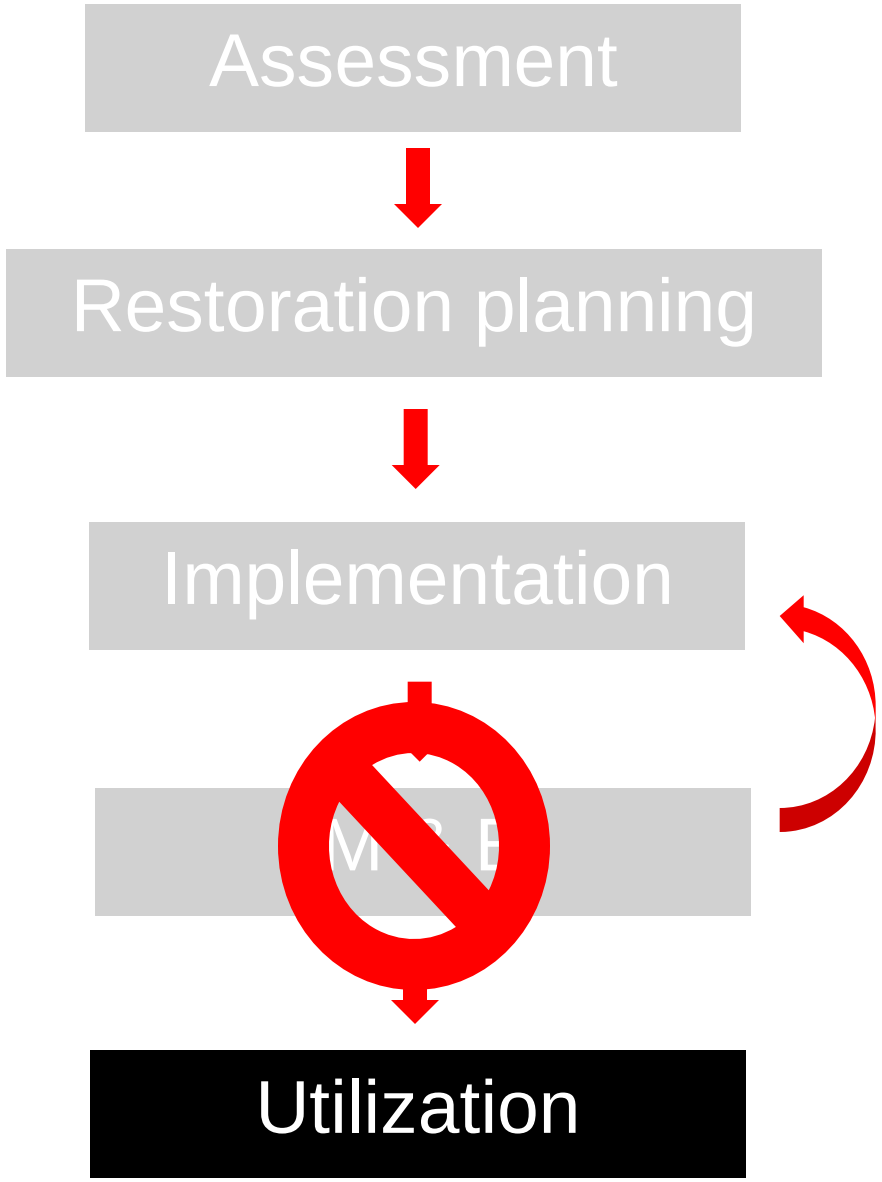
E. S. Bernhardt,[1*†] M. A. Palmer,[1] J. D. Allan,[2] G. Alexander,[2] K. Barnas,[3] S. Brooks,[4] J. Carr,[5] S. Clayton,[6] C. Dahm,[7] J. Follstad-Shah,[7] D. Galat,[8,9] S. Gloss,[10] P. Goodwin,[6] D. Hart,[5] B. Hassett,[1] R. Jenkinson,[11] S. Katz,[3] G. M. Kondolf,[12] P. S. Lake,[4] R. Lave,[12] J. L. Meyer,[13] T. K. O'Donnell,[9] L. Pagano,[12] B. Powell,[14] E. Sudduth[13]

CONCLUSIONS

- **comprehensive assessment of restoration progress not possible with available information**
- **< 10% of projects included any type of monitoring.**

1588

Steps in the restoration process

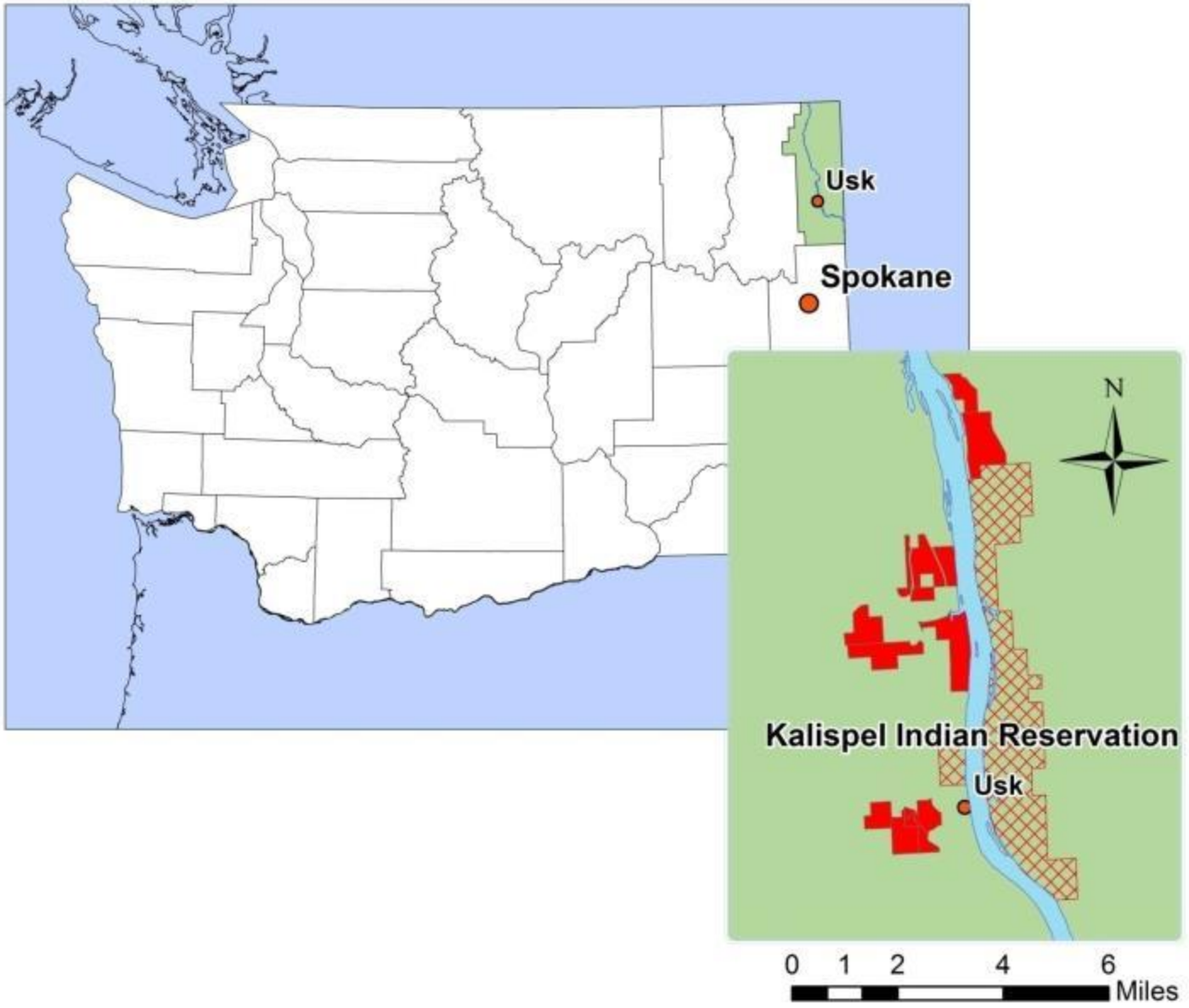


Maintenance

~~Communication of results~~

~~Recommendations for future projects~~

Kalispel Indian Reservation, Pend Oreille County, WA



1590

Albeni Falls dam in Idaho converted 2627 ha of wetlands to open water





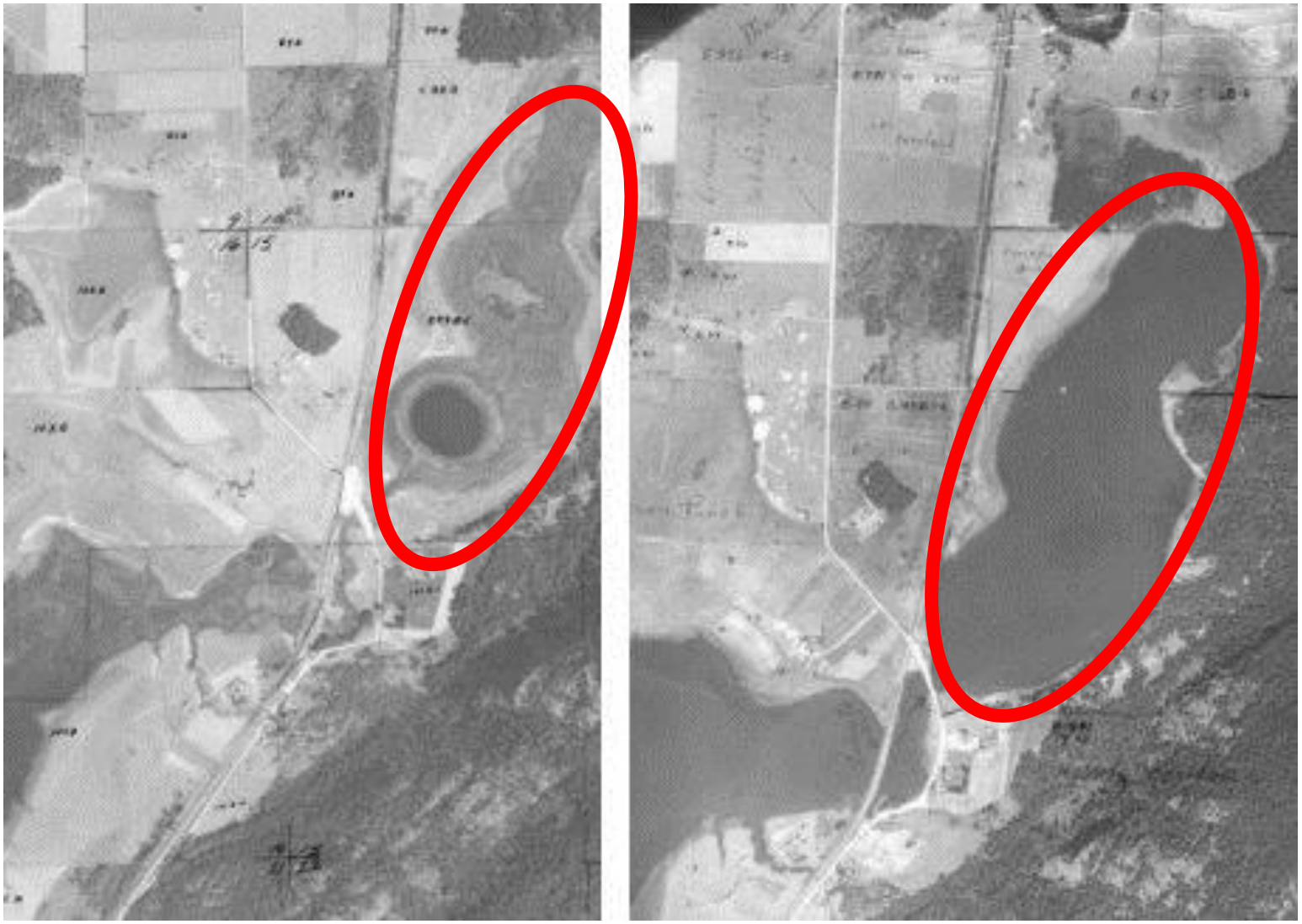
Before

After

1591

Photos: Duane Davis

Wetlands were lost from Morton Slough, Idaho



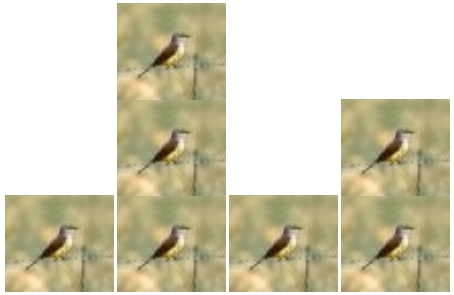
1592

Photos: KTOI archive

Assessing change presents several problems



A reference or baseline condition must be determined



Communities must be selected for monitoring



?

Limited sampling is unlikely to reveal all species in a habitat

Restoration approaches for mitigation lands



1997

Flying Goose Ranch

Water level management



2002

Photos: Neil Lockwood

Restoration approaches for mitigation lands







Exclude grazing

Control weeds

Restore native vegetation

Photos: Neil Lockwood

Reference sites were the best representatives of extant vegetation types

Riparian forest



Riparian shrub



Photos: Neil Lockwood

Multiple reference sites describe spatial variation

Wetland meadow

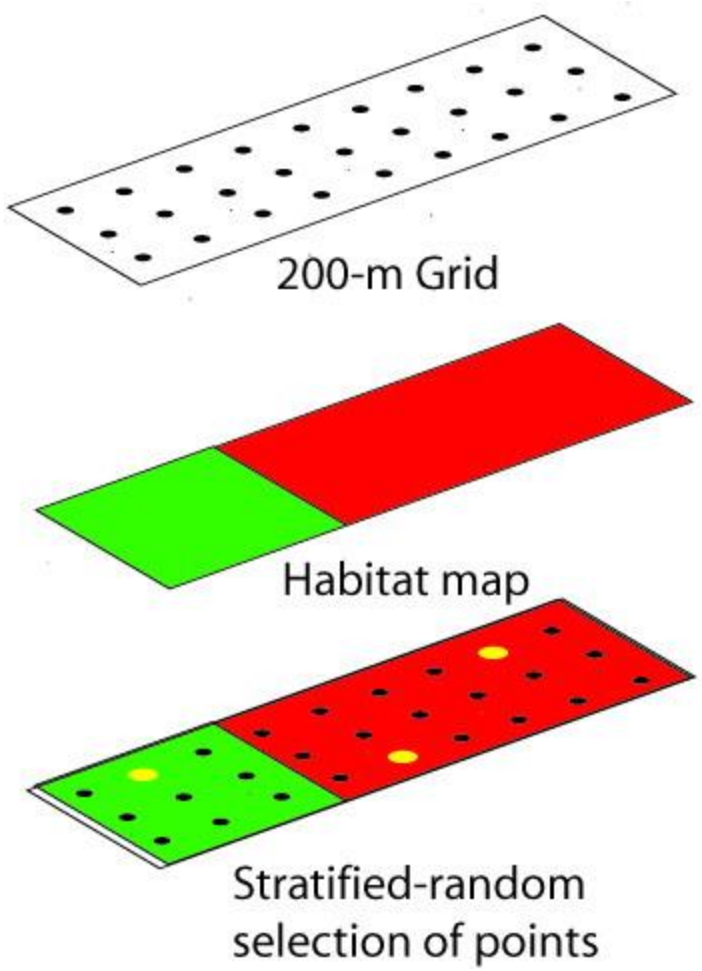


Emergent wetland



Photos: Neil Lockwood

A stratified-random sample of restoration locations to compare with reference



Sample 10% of area

Simple sampling strategy

- Reference sites monitored for 3 consecutive years to evaluate temporal variation
- Restoration sites sampled once every 5 years to evaluate change

Vegetation monitoring began in 2002



Shrub species and volume



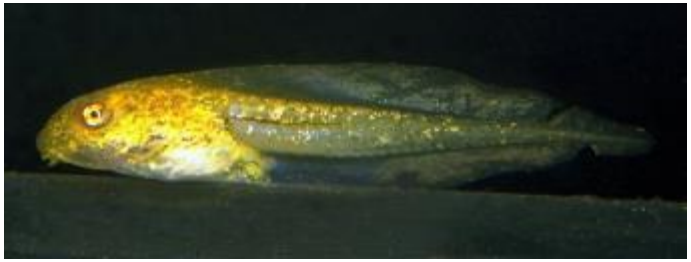
Cover and diversity of grasses and herbs



Trees

Characterize both structure and species composition

Wildlife monitoring began in 2002



Larval amphibians



Small mammals



Birds

How can we determine change in restoration?

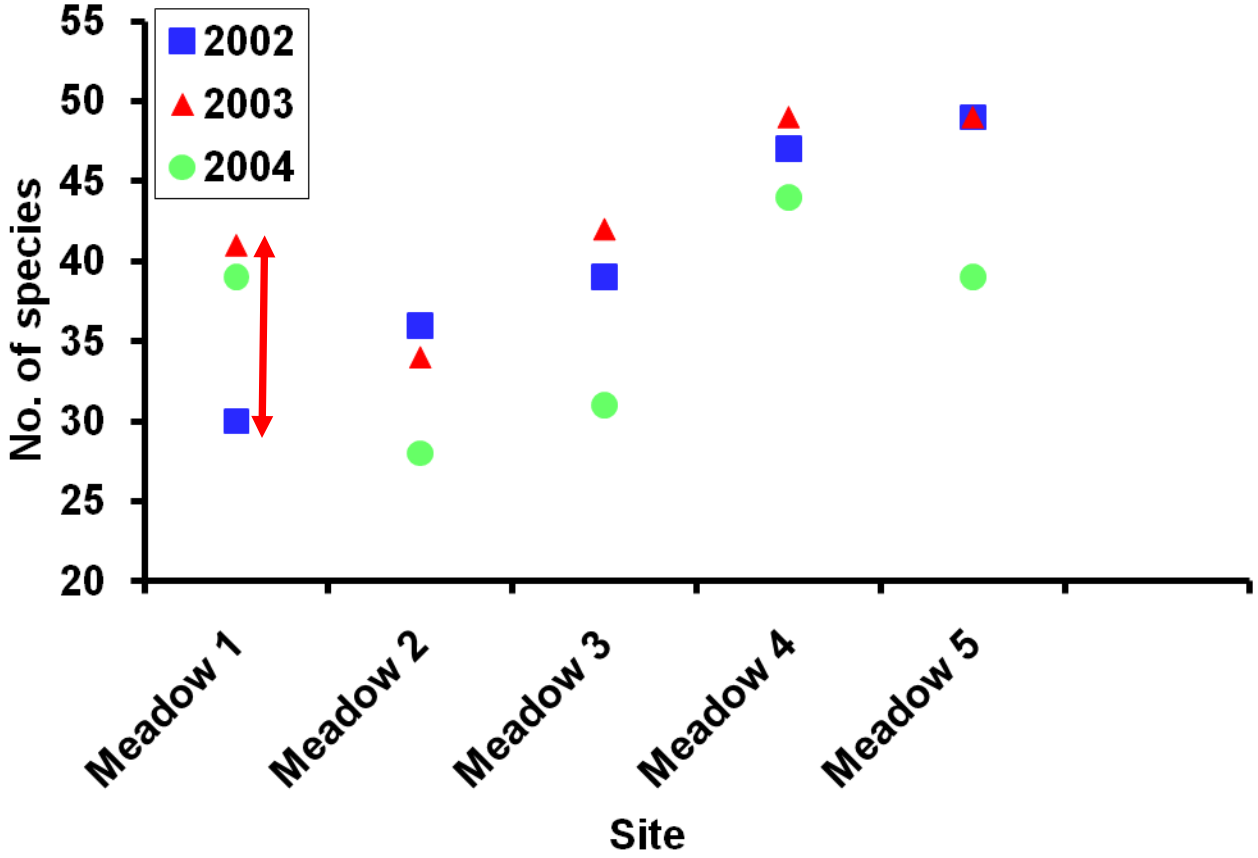
- Comparisons of species richness or diversity

- Comparisons of community similarity



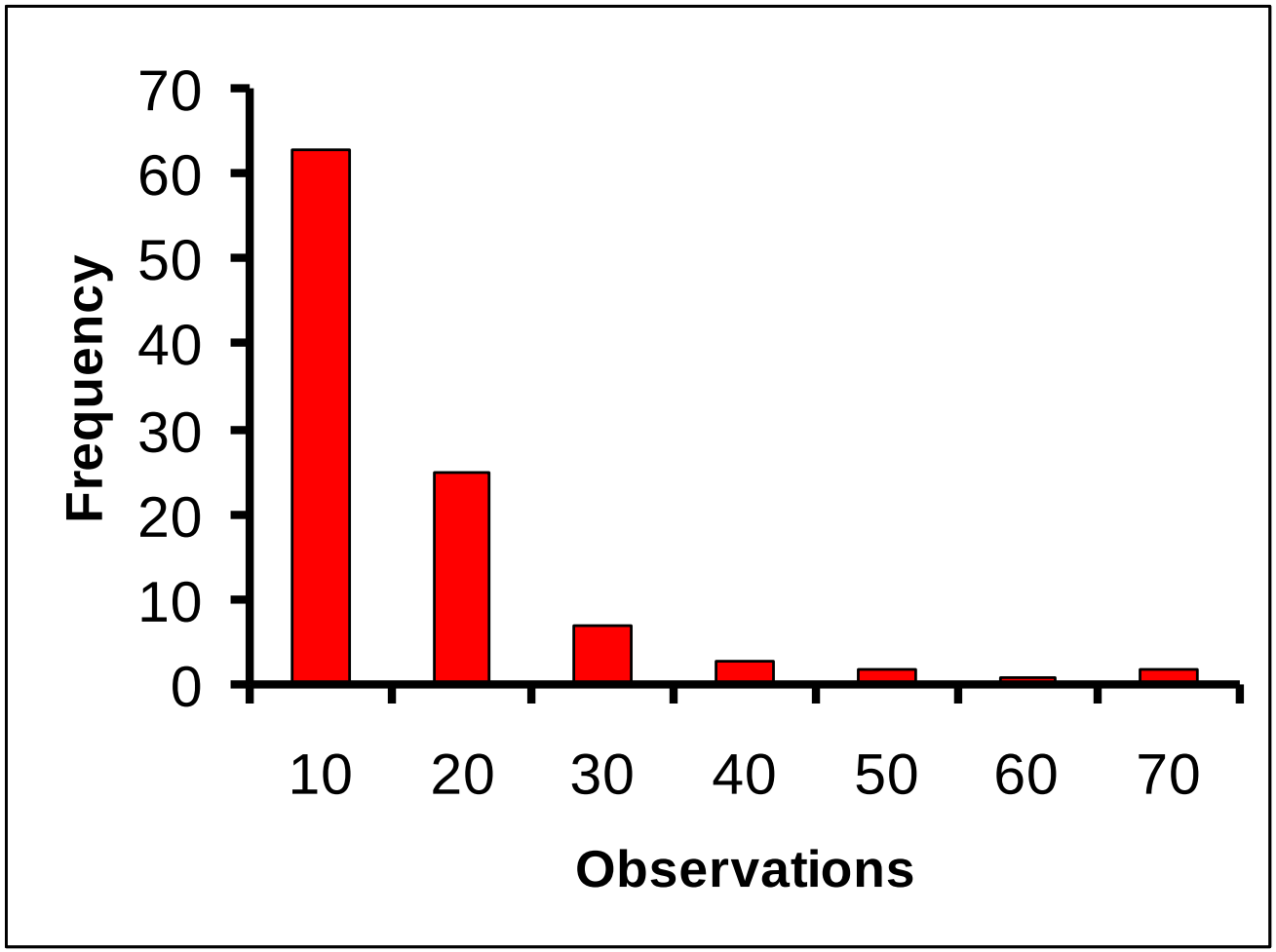
Least **Similar** **Most**

Detection of species varies



Maximum number of species detected per year varies by >25% for reference sites

Number of bird detections varies across species



A few species are observed frequently

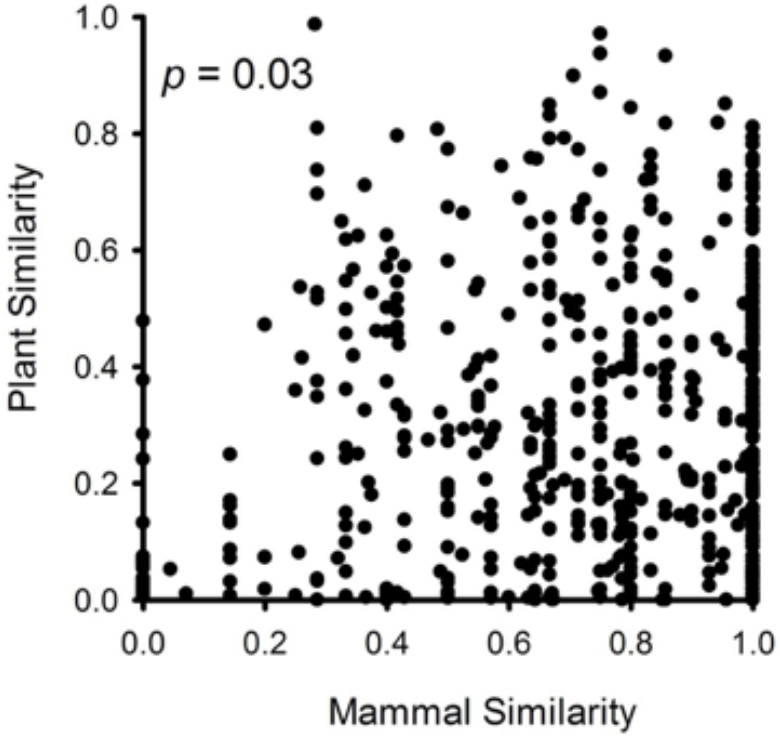
Similarity was chosen as a metric that would be easily explainable

Use relative abundance for each taxon to calculate Chao-Jaccard similarities using R – Vegan package

This approach uses data on rare species to estimate *unseen* species

Is sampling of multiple taxa necessary?

There was a general lack of congruence in patterns of similarity between taxa for structurally simple habitats. Trajectories for each taxon are likely to differ.



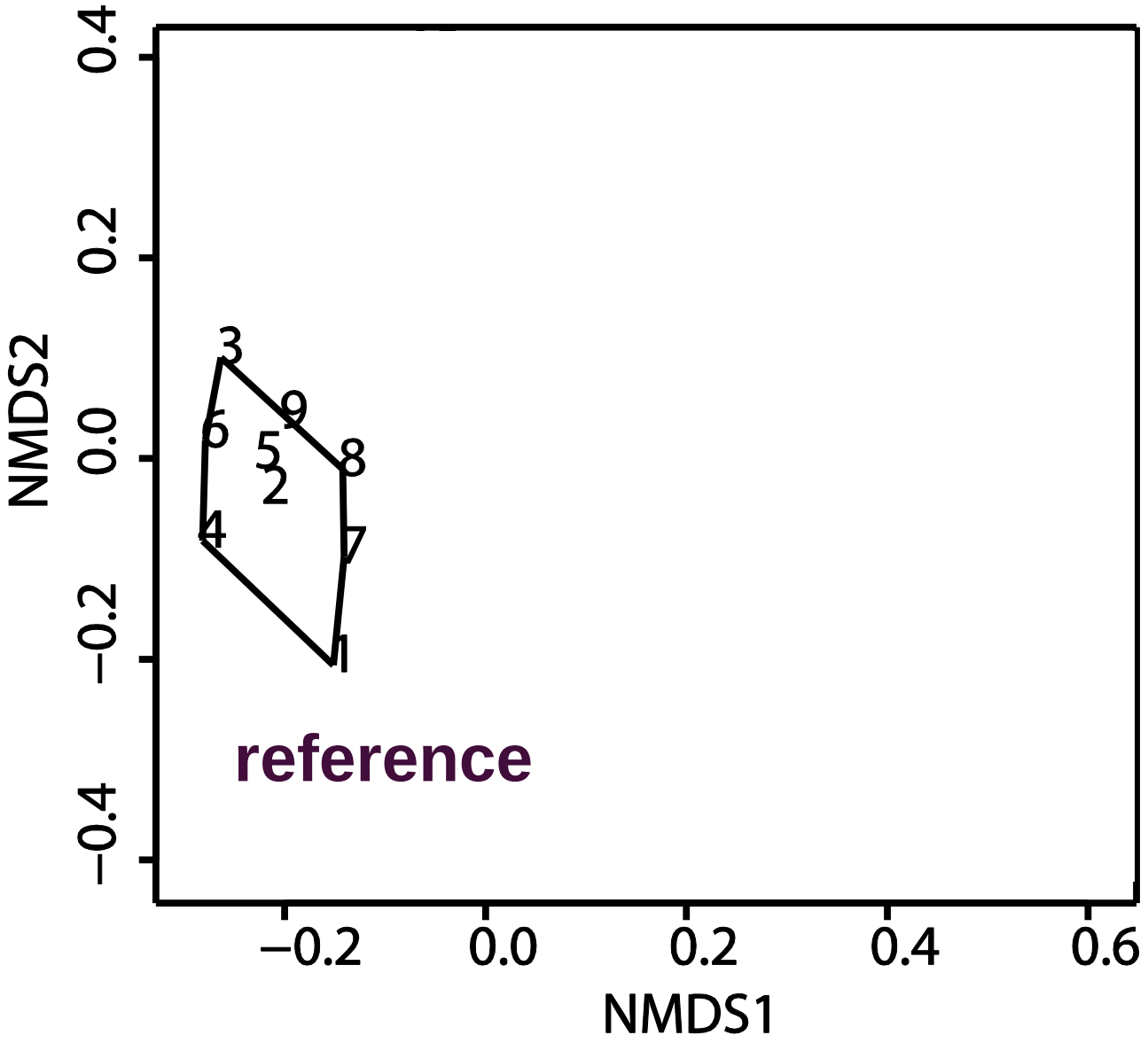
How can we visualize the similarity relationships of different sampling sites?

Plant ecologists have used ordination techniques for many years.

We use non-metric multidimensional scaling because it does not entail assumptions about the distributions of the underlying data

Similarity patterns for reference and mitigation sites

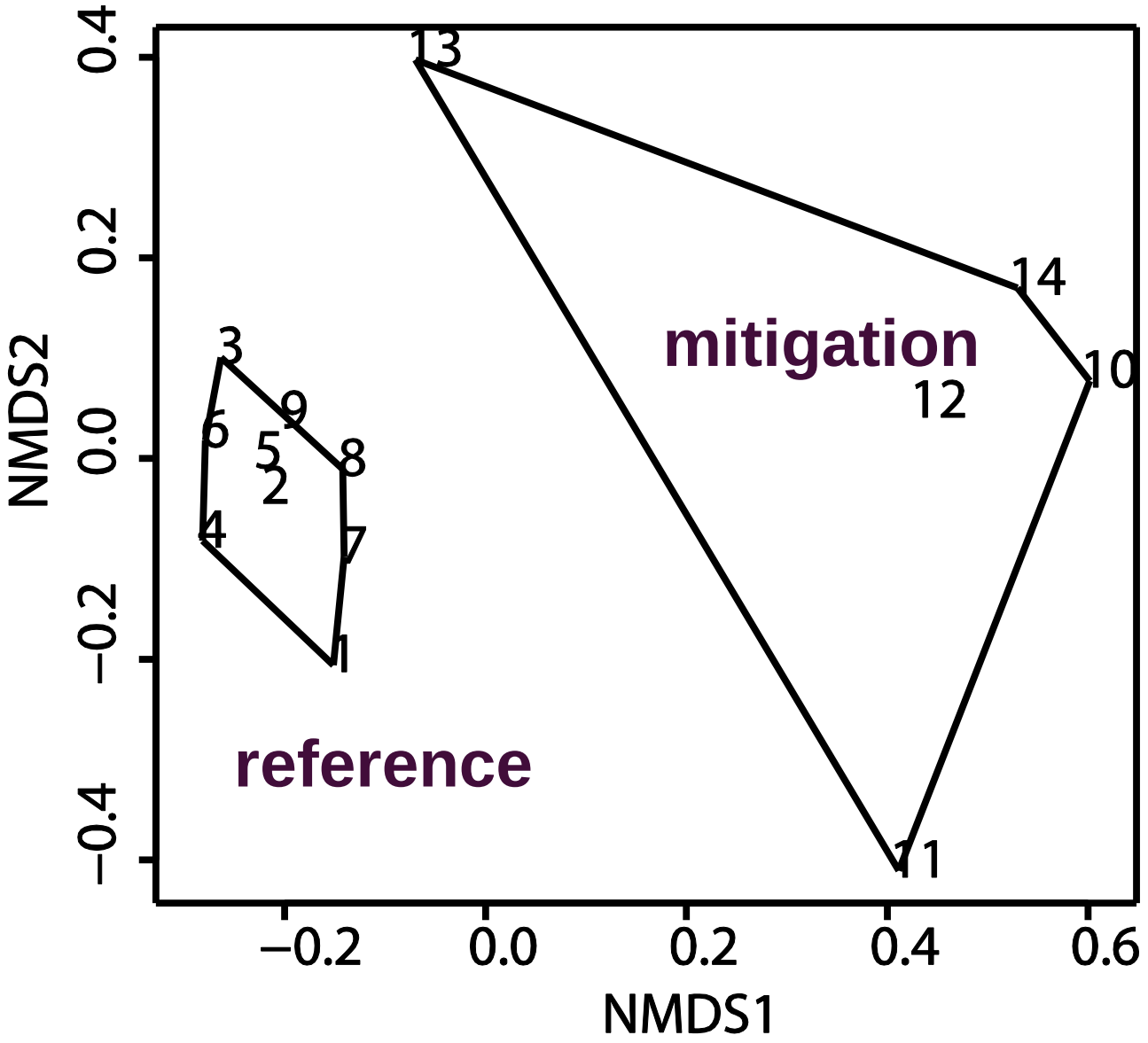
Plant cover for shrub-steppe at CCT (mitigation) and BLM (reference)



1608

Similarity patterns for reference and mitigation sites

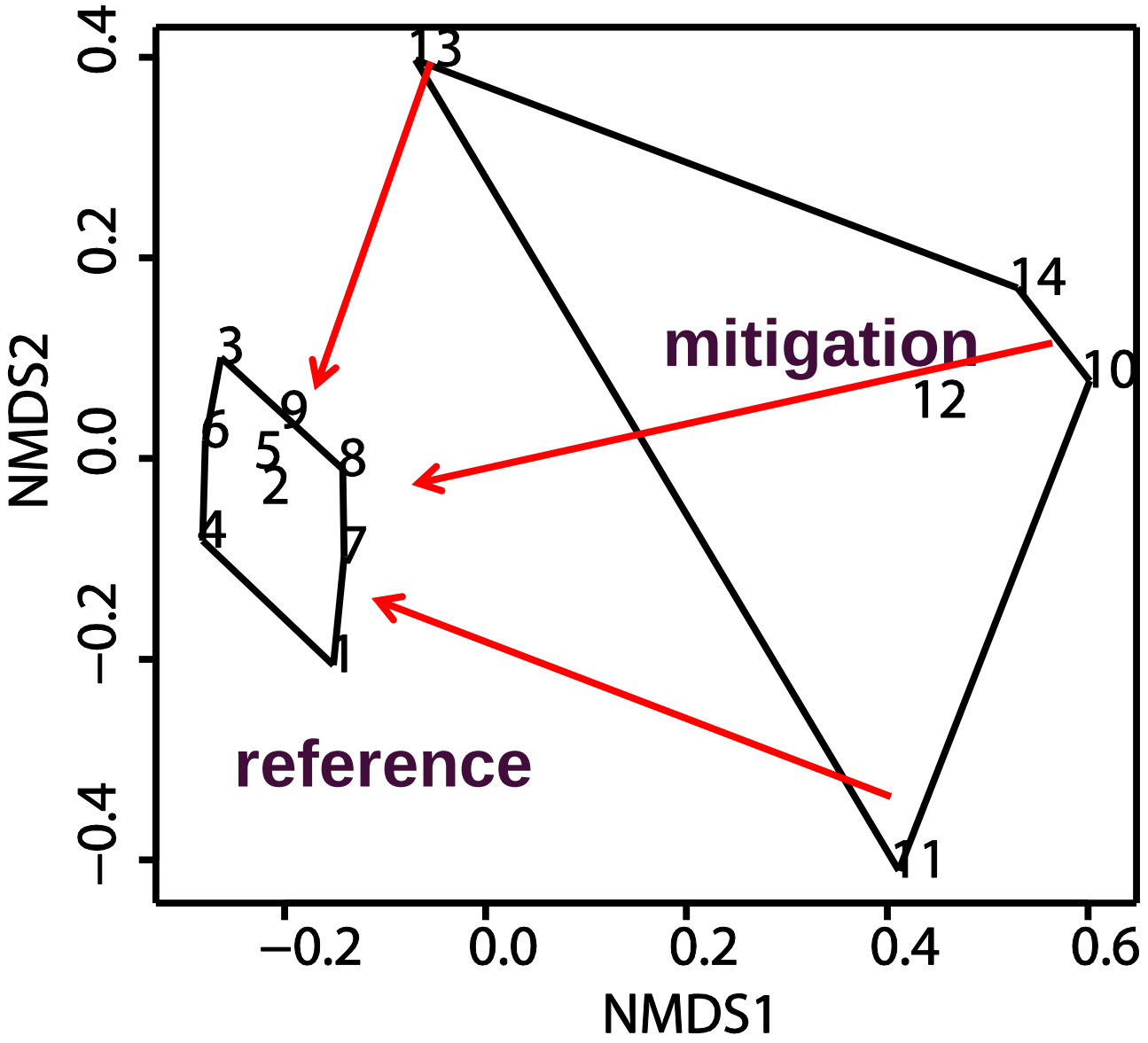
Plant cover for shrub-steppe at CCT (mitigation) and BLM (reference)



1609

Similarity patterns for reference and mitigation sites

Plant cover for shrub-steppe at CCT (mitigation) and BLM (reference)



Patterns in similarity indicate

Reference locations show variation across time and space in species composition. This variation is much less, however, than the spatial variation observed for mitigation sites.

Trajectories for the same species group may be different as they are managed towards a reference condition. Management activities may need to be modified for different mitigation sites.

Development of a regional program

Provide consistent monitoring for mitigation lands for the five UCUT Tribes

Increase access to monitoring data and products

Provide independent evaluation of the results of restoration activities

Become a model for regional wildlife M&E

Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía

DENDROCHRONOLOGY IN MEXICO: HYDROCLIMATIC AND ECOLOGICAL APPLICATIONS

(La dendrocronología en México: aplicaciones hidroclimáticas y ecológicas)

José Villanueva Díaz[1*+], Julián Cerano Paredes[1], Dave W. Stahle[2], Juan Estrada A[1].

[1]INIFAP CENID-RASPA, Km 6.5 Margen Derecha del Canal Sacramento, Gómez Palacio, Durango.

* Presentó en la modalidad "Panel de Expertos"
+ Autor para correspondencia: villanueva.jose@inifap.gob.mx

Área del Conocimiento: Conservación de ecosistemas

ABSTRACT

Dendrochronology is considered one of the most important high-resolution proxies for climate reconstruction, fire-frequency studies, and forest dynamics for ecosystem conservation. Dendrochronological studies in Mexico are relatively recent but in the last 15 years over 170 new tree-ring series have been developed, particularly in mixed conifer forests of the Sierras Madre Oriental, Occidental and Trans-Mexican Volcanic Belt. Most of the chronologies have been developed from conifer species like Douglas-fir, different pine species, cypress, and junipers. The objective of this study is to analyze climate variability detected from seasonal and- streamflow reconstructions derived from long tree-ring series over 500 years in length. Annual radial growth of trees in northern, central and southern Mexico is significantly related with cool season (winter-spring) precipitation which in turn is influenced by different circulatory patterns; i.e., El Niño Southern Oscillation (ENSO), Pacific Decadal Oscillation (PDO), Atlantic Multidecadal Oscillation (AMO), and the North America Monson System (NAMS). Some of the most severe droughts detected in the reconstructions took place in periods 1439-1455, 1540-1579, 1751-1765, 1785-1786, 1850, 1860, and 1950-1965. Precipitation in northern and central Mexico shows a dipole in severe ENSO years, e.g., wet in the north and dry in central and southern Mexico, but this pattern is not constant and changes along time. The influence of the PDO is more seen in northwestern Mexico whereas AMO in central and southeastern Mexico, but in times climate behavior is explained by a combination of different circulatory patterns. Long-term hydroclimatic variability as the one derived from tree-ring studies is relevant for water management purposes, particularly considering that some of the recorded droughts are less severe than some detected in centennial or millennial reconstructions. Water management strategies must take into account different scenarios of water availability for a proper planning of this natural resource.

Keywords: Dendrochronology, precipitation, streamflow, ENSO

INTRODUCCIÓN

El conocimiento de la variabilidad climática histórica es importante para analizar su impacto en aspectos socio-económicos, disponibilidad de agua, determinar las fluctuaciones climáticas de alta y

baja frecuencia ocurridas en el pasado y causas de su variación, analizar el presente e inferir posibles tendencias climáticas futuras. Los estudios de resolución anual y multianual relacionados con el clima del pasado o paleoclima para el último milenio son relativamente escasos en México, por lo que gran parte del conocimiento de la variabilidad climática pasada, se apoya en documentos históricos y registros instrumentales; los primeros con la desventaja de ser puntuales para una región en particular y estar sujetos a apreciaciones humanas, y los últimos con la limitante de ser relativamente cortos (generalmente con menos de 70 años de extensión), con problemas técnicos de calidad y de estar limitados en su representatividad para una área o región determinada, tanto en espacio como en tiempo.

A través de los años, se han desarrollado y utilizado diversas fuentes "proxys" o fuentes indirectas para inferir el clima del pasado, es decir, sedimentos lacustres y marinos, análisis de polen, arrecifes coralinos, núcleos de hielo, nidos de rata del género *Neotoma*, anillos de árboles, entre muchos otros [1]. De todas estas fuentes indirectas del clima, los anillos de crecimiento anual de especies arbóreas, constituyen la fuente de mayor uso y confiabilidad para analizar el clima del período Holoceno [2].

Especies arbóreas con anillos de crecimiento bien definidos son relativamente comunes tanto en ecosistemas de clima frío, templado, árido e inclusivo tropical y tienen la ventaja de poder fecharse con exactitud al año de su formación y por ende ser asociado con factores climáticos dominantes antes y durante la formación de los mismos [(3, 2], ya que en general, condiciones climáticas favorables, conducen a producir buen crecimiento radial (anillos anchos), mientras que condiciones limitantes o adversas reducen e inhiben dicho crecimiento (anillos angostos, microanillos o anillos perdidos). De esta manera, se pueden llevar a cabo análisis de calibración-verificación y establecer una función de respuesta entre crecimiento y clima, basado en el principio de uniformidad, que asume que las condiciones climáticas actuales que influyen en el crecimiento anual, actuaron de igual manera en el pasado. Mediante este procedimiento, se pueden desarrollar reconstrucciones históricas de variables climáticas, las cuales son de utilidad básica para entender la variabilidad hidroclimática en el tiempo; definir tendencias pasadas e inferir su posible comportamiento futuro, con la ventaja de que este tipo de información puede coadyuvar a implementar medidas preventivas para el manejo de los recursos hídricos, al considerar diversos escenarios climáticos detectados en las reconstrucciones.

No obstante la riqueza biológica de México en términos de biodiversidad de especies arbóreas en ecosistemas templados, semiáridos y tropicales, los estudios dendrocronológicos en México habían sido incipientes, de tal forma que hacia finales del siglo XX, solo unos cuantos estudios de este tipo se habían desarrollado. Es bien conocido, que especies como Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* Mirb.), que se distribuye en sitios húmedos y cañadas de macizos montañosos de las Sierras Madre Occidental, Oriental y Eje Neovolcánico; y ahuehuete o sabino (*Taxodium mucronatum* Ten.*)*, entre otras latifoliadas con amplia distribución en México [4], se han utilizado de manera frecuente en estudios dendrocronológicos en los Estados Unidos de Norteamérica, donde han mostrado su potencial para producir series de crecimiento muy extensas y climáticamente sensitivas, que algunas veces sobrepasan el milenio [5].

En los últimos quince años, sin embargo, derivado de convenios internacionales y proyectos nacionales con fondos sectoriales y del propio Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP), se ha desarrollado una red de series de tiempo dendrocronológicas para el sur, centro y norte de México, que actualmente sobrepasa las 170 cronologías. El presente trabajo de investigación, tiene entre sus objetivos dar a conocer estas series de tiempo, analizar la variabilidad histórica climática, que en los últimos 500 años se ha detectado con algunas reconstrucciones

dendroclimáticas generadas y cuantificar la influencia de patrones de circulación atmosférica que afectan el territorio nacional, caso concreto es El Niño-Oscilación del Sur (ENSO, El Niño-Southern Oscillation), Oscilación Decadal del Pacífico (PDO, Pacific Decadal Oscillation), Oscilación Multidecadal del Atlántico (AMO, Atlantic Multidecadal Oscillation) [6].

Las reconstrucciones dendroclimáticas, particularmente de precipitación o de caudales son muy relevantes en términos ecológicos y de servicios hidrológicos, porque constituyen un indicativo de la disponibilidad histórica del agua en diversos ecosistemas del país, fundamental para una planeación y manejo adecuado de este importante recurso. Por otra parte, esta tecnología aporta información científica que permite analizar condiciones climáticas que afectaron el desarrollo, florecimiento y decadencia de civilizaciones prehispánicas; así como para ayudar a entender las tendencias actuales en el cambio climático global (cambios en temperatura, precipitación, patrones de circulación atmosférica global, captura de carbono, etc.), permite definir posibles escenarios climáticos presentes en las reconstrucciones y es muy importante en la conservación de ecosistemas y restauración de algunos otros.

METODOLOGÍA

Principios básicos dendrocronológicos

La dendrocronología o fechado de anillos de árboles, deriva de las raíces griegas "*dendro*", árbol, "*cronos*" tiempo y "*logos*" estudio de, y se define como el estudio de la secuencia cronológica de anillos de crecimiento anual, o también se expresa como el fechado de eventos pasados (cambios climáticos), a través del análisis de anillos de crecimiento [7]. La dendrocronología es una ciencia interdisciplinaria y su teoría y técnica pueden ser aplicadas a la solución de problemas de diversa índole. Esta ciencia tuvo su origen a principios del siglo XX, después de que Andrew Douglas, conocido como "Padre de la Dendrocronología", estableciera el principio de fechamiento cruzado o "*cross-dating*", técnica que consiste en determinar y comparar patrones comunes de formación de anillos anchos y angostos de los árboles presentes en un área homogénea (área de condiciones ecológicas similares), comportamiento que puede ser usado como herramienta cronológica, para identificar el año exacto en el cual los anillos fueron formados. De manera similar, el patrón de ancho de anillos por si mismo, representa un registro de condiciones medioambientales dominantes en una región determinada, ya que la formación de anillos anchos generalmente está relacionada con la influencia de condiciones climáticas favorables durante su crecimiento, mientras que condiciones limitantes reducen el desarrollo celular y dan paso a la formación de anillos estrechos.

El desarrollo de esta ciencia fue lento en sus inicios, pero en las últimas décadas, se ha observado un desarrollo sin precedentes en la dendrocronología, a consecuencia de la incursión de diversas disciplinas, los cuales han contribuido de manera notable a mejorar los análisis y aplicaciones dendrocronológicas [8]. Los logros obtenidos con la aplicación de esta tecnología, tienen alto valor científico en diversas disciplinas de las ciencias naturales, climatológicas, ecológicas, hidrológicas, arqueológicas, geológicas, sociales, medicina, etc., y puede contribuir con información técnica para formular planes de manejo para la conservación y manejo sustentable de ecosistemas y de los recursos hídricos disponibles.

Uno de los problemas fundamentales en una serie de crecimiento es extraer la señal climática deseada, de una serie de factores no deseados (ruido) que intervienen en el crecimiento anual del árbol.

De esta manera, una serie de anillos de crecimiento se considera como un agregado linear de subseries no observadas y que pude ser expresado de la siguiente manera [9]:

$$R_t = A_t + C_t + \delta D1_t + \delta D2_t + E_t$$

Donde R_t es la serie observada de ancho de anillos; A_t es un proceso no estacionario que representa la tendencia a que el grosor de los anillos disminuya con la edad del árbol, ya que una misma cantidad de madera producida para un año determinado, tendrá que distribuirse en un radio creciente (mayor superficie), de ahí que el ancho de los anillos en la parte externa (cerca de la corteza), generalmente sea menor que en la médula (centro) del árbol, por lo que la forma de crecimiento (en árboles sin competencia o escasa competencia) se asemeja a una curva exponencial negativa con una tendencia a hacerse constante o asintótica; C_t representa la influencia agregada en el crecimiento del árbol de todas las variables climáticas como son precipitación, temperatura, humedad relativa, etc.; $D1_t$ es un pulso de disturbio provocado por factores endógenos locales, caso específico es la liberación en crecimiento de un árbol específico a consecuencia de la muerte de un árbol contiguo; $D2_t$ representa la respuesta característica de un árbol a un disturbio generalizado que afecta a todo un rodal, como puede ser un incendio, caída de árboles por efecto de un ventarrón o tormenta eléctrica, brotes epidémicos, enfermedades, aprovechamiento forestal, contaminación, etc., lo que indica que $D2_t$ será un factor común para todos los árboles en un rodal, a diferencia de $D1_t$, que afecta solo un árbol o unos cuentos árboles cercanos y se expresa en los anillos de los árboles como un pulso transitorio que desaparece eventualmente; δ se asocia con $D1_t$ y $D2_t$ y es un factor binario de la presencia ($\delta = 1$) o ausencia ($\delta = 0$) de cualquier tipo de disturbios. De esta manera A_t, C_t y E_t (que representa la variabilidad interanual no contabilizada por los otros factores, como son gradientes de fertilidad y cambios en la profundidad de suelo, diferencias hidrológicas, etc.) se asume que estarán siempre presentes en R_t, mientras que $D1_t$ y $D2_t$ pueden o no estarlo.

La estimación y remoción de A_t de una serie de ancho de anillos, se le conoce como "*estandarización*" que consiste en transformar la serie no estacionaria de ancho de anillos en una nueva serie estacionaria con media de 1.0 y varianza constante (Fritts, 1976). La estandarización para obtener un índice relativo de ancho de anillo (I_t) se logra al dividir el ancho de cada anillo (R_t) entre su valor esperado (G_t) al ajustar una curva de crecimiento a la serie de tiempo de ancho de anillos.

Los índices estandarizados de todas las series de crecimiento se promedian para generar una cronología promedio del sitio, de tal manera que el procedimiento empleado suaviza las diferencias existentes entre series de crecimiento y evita la dominancia de árboles con crecimiento rápido en las primeras etapas de desarrollo, de aquellos con crecimiento lento en etapas más avanzadas. Por otra parte, dependiendo del tipo de curva utilizada, el procedimiento de estandarización removerá invariablemente información climática de baja frecuencia presente en los anillos de crecimiento, por lo que es importante definir con antelación el tipo de curva polinomial o exponencial o linear que se ajuste mejor a las series de crecimiento, con lo cual se minimiza dicha remoción. Cuando el clima (C_t) en el modelo linear agregado es la señal de interés, todas las otras variables (A_t, $D1_t$, $D2_t$, E_t) que afectan el crecimiento de los anillos se consideran ruido y se descartan, mediante la estimación de A_t, o bien se minimizan mediante el procedimiento de promediar los índices resultantes de las series involucradas.

Las técnicas dendrocronológicas estándar que van desde la obtención de material en campo, montaje de núcleos de crecimiento y procesamiento en laboratorio, fechado, análisis de calidad del fechado, medición, producción de índices dendrocronológicos y extracción de la señal climática, están ampliamente documentadas [9, 10, 11] y el paquete de programas dendrocronológicos de la

Universidad de Arizona (DPL, Dendrochronology Program Library) contiene el programa COFECHA para el control de calidad del fechado, ARSTAN para la generación de índices dendrocronológicos y análisis de función de respuesta para la extracción de la señal climática.

RESULTADOS

Investigación dendrocronológica en México

En este trabajo se reporta el desarrollo exitoso de más de 170 cronologías, particularmente de coníferas distribuidas en diversos ecosistemas de los principales sistemas montañosos del país. Entre las especies más estudiadas se encuentra *Pseudotsuga menziesii*, *Taxodium mucronatum*, *Pinus cembroides*, *Pinus duranguensis*, *Pinus hartwegii*, *Picea chihuahuana*, *Juniperus montícola*, entre otras especies de coníferas y de otros géneros, presentes en diversos bosques mixtos de clima templado en gran parte del país.

Douglas-fir es una especie altamente sensible a variaciones climáticas y una de sus características es que su crecimiento anual o anillo total (RW, Ring Width) se puede dividir en dos bandas de crecimiento; la madera temprana o de primavera (EW, Earlywood) que se caracteriza por poseer células relativamente grandes, blanquecinas con pared celular delgada y grandes vacuolas; y la madera tardía o de verano (LW, Latewood) constituida por células más pequeñas, de pared lignificada, mayor densidad y coloración obscura. El crecimiento de la madera temprana en el norte-centro de México está influenciado por las condiciones de precipitación del período estacional invierno-primavera y por ende tiene influencia de la fase cálida de ENSO; mientras que la madera tardía, por las condiciones de precipitación de la estación cálida del año (verano), donde el efecto del Monzón de Norteamérica o Monzón Mexicano (NAMS, North American Monson System), tormentas tropicales y convectivas se hacen presentes. De esta manera, en un mismo anillo anual de crecimiento, se puede discriminar en cada sección de crecimiento la influencia de diferentes patrones atmosféricos de circulación dominantes [12]. Cronologías adicionales con esta y otras especies en el norte, centro y sur de México han permitido el desarrollo de reconstrucciones centenarias de precipitación estacional, reconstrucción de flujos, temperatura, fluctuación en los niveles de lagos y ubicación de especímenes arbóreos longevos con fines de conservación.

Adicional a la influencia de la variabilidad hidroclimática en el crecimiento de los bosques del norte y centro de México, los incendios son un elemento clave en la dinámica de ecosistemas forestales de coníferas del oeste de Norte América, incluyendo los bosques templados del norte de México, además de que su incidencia en condiciones naturales está regulada significativamente por patrones de circulación atmosférica global [13]. El análisis de anillos de crecimiento de árboles con cicatrices producidas por incendios en bosques de pino y bosques mixtos de pino-encino del noroeste de Durango, indican un régimen similar o frecuente de incendios de baja intensidad, hasta antes del inicio de aprovechamiento de estos bosques, que ocurrió alrededor de 1950 [14]. El régimen de incendios influenciado por la acción del hombre, generalmente resulta en un incremento en la densidad de árboles, acumulación de material muerto, alteración en la composición de especies y mayor intensidad del fuego; especialmente, cuando se presenta un incendio después de un período prolongado de control o supresión. Patrones similares al indicado, se observaron en bosques mixtos de pino-encino en las vertientes secas de la Sierra Madre Occidental en Durango y Chihuahua [15, 16]. Unos cuantos bosques mexicanos en esta región, todavía experimentan un régimen frecuente y natural de incendios; sin embargo, el cambio en el uso del suelo y alteración de este régimen, puede poner en peligro la

conservación de estos ecosistemas, ricos en biodiversidad y que dependen del fuego para su estabilidad ecológica.

La influencia de incendios y cambios de uso del suelo en la dinámica de comunidades forestales en México, se ha estudiado para sitios muy puntuales, caso específicos son los estudios realizados en ecosistemas forestales comunes para la frontera México-Americana, donde los patrones de uso del suelo y programas de supresión de incendios han afectado de manera distinta la dinámica de estas comunidades. Actualmente, se cuenta con estudios de frecuencia de incendios en diversas áreas naturales protegidas del norte y centro de México, caso concreto "Maderas del Carmen", Cerro Mohinora, Tutuaca y Mesa de las Guacamayas, Chihuahua, parajes ubicados en la cuenca alta del río Nazas, Durango, áreas naturales protegidas como Sierra de Manantlán y Sierra de Quila, Jalisco, Pico de Orizaba y en parajes del área protegida "El Triunfo", Chiapas. Esta información y otra en proceso de finalizar, permitirá tener un conocimiento más detallado del impacto de la variabilidad climática y de la influencia de acciones antropogénicas en la frecuencia del fuego.

Estudios de dinámica de poblaciones en ecosistemas de bosque de galería han permitido determinar la ubicación de especímenes longevos de ahuehuete con fines de conservación; caso específico, los bosques de galería del río Nazas, Durango, Río San Pedro Mezquital, Durango; Sabinas, Coahuila; Los Peroles, San Luis Potosí, Barranca de Amealco, Querétaro, Río Lagarteros, Bochil y Tzibol, Chiapas; Bosque de Chapultepec, México, D.F. [17, 18, 19]. Árboles longevos de otras coníferas se tienen detectados en parajes de Cerro Potosí, Pico de Orizaba, Cofre del Perote y Peña Nevada, Nuevo León.

La variabilidad en crecimiento entre cronologías del norte y sur de México está dividida por el Trópico de Cáncer, las cronologías del norte de México son más sensibles a la precipitación del período junio-agosto, mientras que las del sur al período de abril-mayo, lo cual está correlacionado significativamente con el inicio de NAMS [20]. Estudios recientes con *P. hartwegii* en montañas elevadas del centro y norte de México señalan un comportamiento en antifase; es decir, mientras que en el centro se pueden tener condiciones húmedas, en el norte predominan condiciones secas, y viceversa, particularmente durante eventos extremos del Niño [19, 21]; no obstante en el sur de Oaxaca parece dominar el fenómeno AMO, mientras que en el noroeste de México, el PDO.

Reconstrucciones históricas de precipitación y de flujo

Algunas de las cronologías producidas en la última década para el norte y centro de México se han utilizado para realizar reconstrucciones históricas de precipitación. Una de las reconstrucciones paleoclimáticas de mayor extensión es la reconstrucción de precipitación invernal (noviembre – marzo) del período 1386 – 1993, desarrollada para el estado de Durango, que resalta la variabilidad hidroclimática invernal histórica que se presenta en esta región, la cual se caracteriza por la presencia de sequías intensas, frecuentes y de larga duración que se presentaron en los períodos 1540-1579, 1751-1765, 1798-1810, 1850-1860, 1950-1965 y finales del siglo XX. Algunas de estas sequías, específicamente la del período 1540-1579, se ha relacionado con brotes epidémicos que diezmaron notablemente la población indígena del Valle de México, posterior a la colonización española [22, 23]. La sequía del período 1950–1965, fue la más intensa del siglo XX, e infligió severos daños socioeconómicos a diversos asentamientos humanos del norte y centro del país, donde esta sequía se presentó de manera simultánea, según lo hacen constatar datos instrumentales, documentos históricos y reconstrucciones paleoclimáticas.

Algunos de los períodos secos observados en esta reconstrucción, también fueron detectados en reconstrucciones de precipitación para el área limítrofe de los estados de Durango, Chihuahua y Sinaloa,

cuyas cuencas drenan hacia la costa del Pacífico y son utilizadas con fines de irrigación. Una de estas reconstrucciones estacionales de precipitación invierno-primavera, se desarrollo con cronologías procedentes del noroeste de Durango y suroeste de Chihuahua, con una extensión superior a 550 años (figura 1). Esta reconstrucción muestras períodos secos similares a los detectados en la reconstrucción de Durango, lo que implica que la superficie afectada por estos eventos secos y húmedos, pueden abarcar miles de kilómetros cuadrados, lo que es indicativo de que el clima en esta zona está modulado por fenómenos atmosféricos de circulación general de amplio impacto, caso concreto ENSO y otros fenómenos circulatorios.

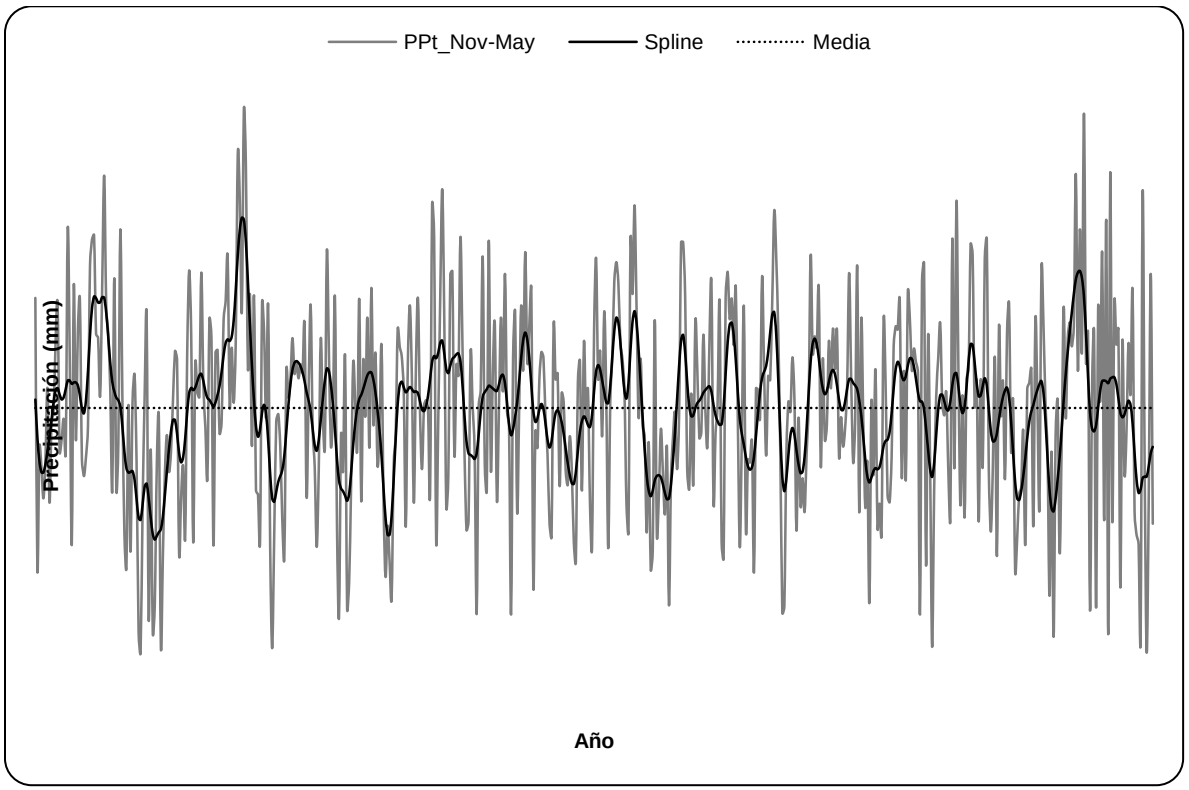


Figura 1. Reconstrucción de precipitación estacional invierno-primavera (Noviembre-Mayo) para el área limítrofe de los estados de Durango, Chihuahua y Sinaloa. La línea punteada constituye la media reconstruida del período; la línea gris son los valores anuales y la línea obscura es una curva flexible a nivel década para resaltar eventos de baja frecuencia. Valores por debajo de la media son períodos secos y por encima períodos húmedos.

En el noreste de México se tienen algunas otras reconstrucciones como la desarrollada para el centro, sur de Nuevo León y este de Tamaulipas, con una cronología de madera temprana de *Pseudotsuga menziesii* procedente del sitio Peña Nevada, Nuevo León.

La reconstrucción estacional diciembre-abril muestra eventos de sequía recurrentes, que afectaron la región en 602 años de extensión (1400 – 2002) (figura 2). La reconstrucción indica que en el transcurso del siglo XX, las sequías más significativas ocurrieron en el período 1968-1975 y 1952-1956.

También se presentaron en los períodos 1857–1868, 1785–1790, 1738–1743; una muy prolongada de 1559 a 1590, otra más entre 1526 a 1536 y la de mayor intensidad para el período 1439 – 1455.

Períodos húmedos son muy evidentes en la reconstrucción y se presentaron prácticamente en cada siglo; así se observan períodos con precipitación arriba de la media (246 mm) entre 1900 a 1905, 1740 a 1747 y 1459 a 1467.

Gran parte de estos períodos secos parece que se presentaron simultáneamente o de manera diferida en amplias regiones de México; por ejemplo la sequía de 1448 a 1454 que afectó la disponibilidad de agua para consumo humano en “La Gran Tenochtitlan”, también se encuentra presente en esta reconstrucción; caso similar ocurrió con la sequía de la década de 1860 para Saltillo y la de 1950 que se extendió en centro y norte de México e inclusive suroeste de los Estados Unidos de América [24].

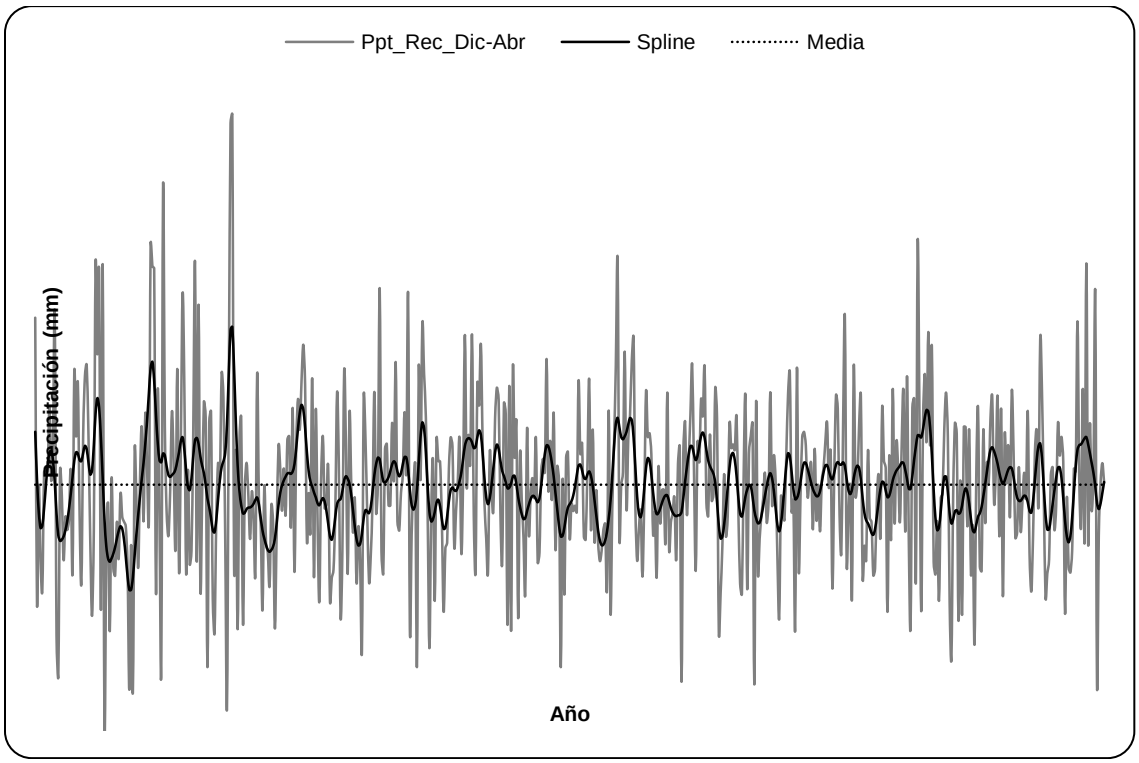


Figura 2. Reconstrucción de precipitación estacional diciembre-abril por más de 600 años para la región centro-sur de Nuevo León y este de Tamaulipas.

Para el centro de México se han desarrollado diversas reconstrucciones de precipitación, una de ellas es para la región de Tlaxcala, para el período enero-junio, 1721-2007 (figura 3). Esta reconstrucción desarrollada con series de crecimiento de madera temprana de *Pseudotsuga menziesii*, muestra alta variabilidad interanual con eventos de sequía muy marcados y que impactaron la estabilidad social y económica de la región. Años con sequía extrema ocurrieron en 1739, 1785-1786, 1801, 1896, 1933, 1991 y 1998. Los anos de 1785-1786 son conocidos como "El Año del Hambre", por el gran impacto originado en la producción de granos básicos, cuya carencia originó hambrunas generalizadas y mortandad en el centro y norte de México [25]. El evento intenso del Niño en 1998 produjo incendios que arrasaron gran parte de los ecosistemas de bosques de coníferas y tropicales en todo el país. La intensidad de este evento en términos de índices de crecimiento fue equiparable al registrado en el año de 1739.

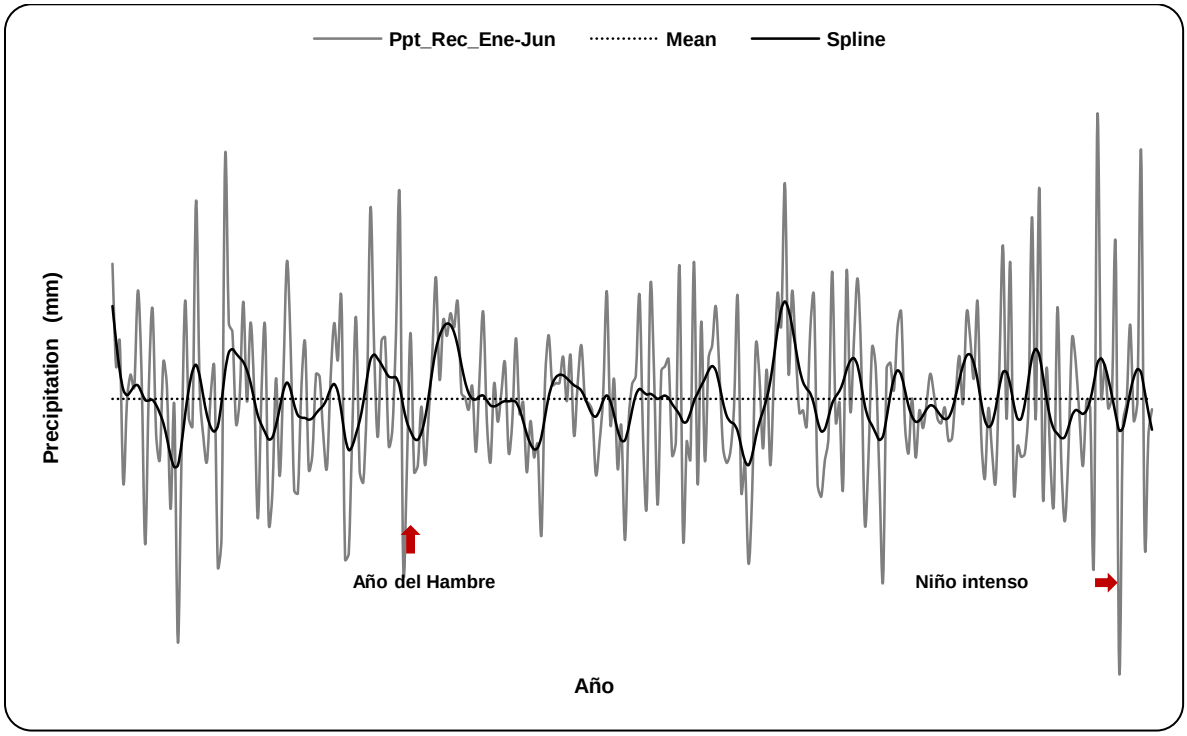


Figura 3. Reconstrucción de precipitación enero-junio para Tlaxcala. Eventos significativos presentes en esta reconstrucción son El año del Hambre (1785-1786) y un evento intenso ENSO ocurrido en 1998, uno de los de mayor magnitud en el siglo XX.

Los volúmenes de flujo producidos en una cuenca o región hidrológica, representan la integración de la variabilidad de precipitación, condiciones de suelo y de vegetación y de otras variables hidrológicas que influyen en los escurrimientos generados. Desde este punto de vista son más representativos del impacto de la variabilidad hidroclimática y pueden ser de mayor utilidad para la planeación y manejo sustentable de los recursos hídricos en una región, particularmente considerando que gran parte de estos volúmenes se captan en reservorios y luego son liberados con fines de irrigación o producción de energía eléctrica. Reconstrucciones de flujo se han generado para diversas cuencas, una de ellas es el realizado para el río Nazas donde fluyen los escurrimientos generados principalmente en el área

forestada de la cuenca del mismo nombre que es la parte alta. La reconstrucción de flujo cubre los últimos 800 años del volumen acumulado agosto-febrero y es de gran importancia para entender las fluctuaciones en la disponibilidad de agua y frecuencia de eventos hidroclimáticos extremos que afectan la producción agropecuaria de la Comarca Lagunera [26]. Reconstrucciones adicionales de flujo se tienen para la región de Majalca, Chihuahua, Bajío, Guanajuato, Valles Centrales de Oaxaca, Marismas Nacionales en el estado de Nayarit y Valle del Yaqui, Sonora. Esta última es de alta relevancia, dado que el agua producida en parte de la Sierra Madre Occidental en el estado de Chihuahua drenan hacia el Pacífico y es la fuente de escurrimiento de diversas presas de captación establecidas en el área de drenaje de dicho valle (figura 4).

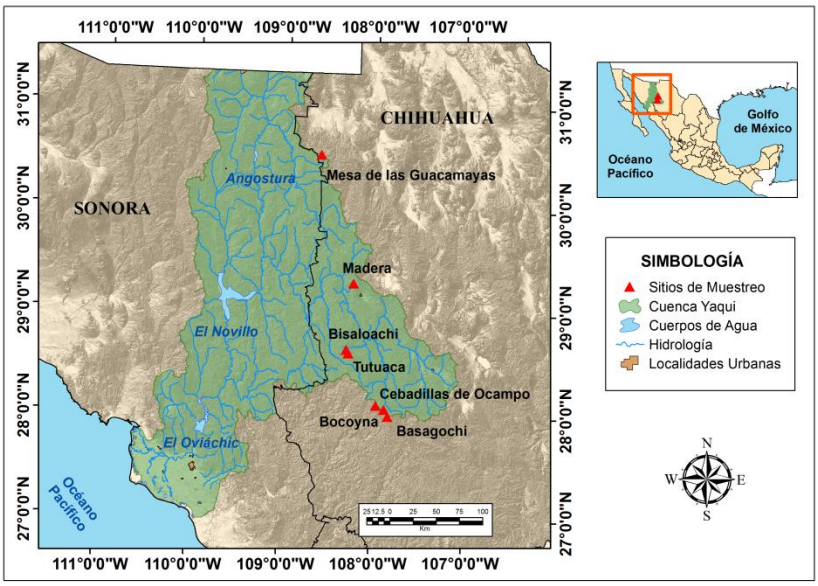


Figura 4. Distribución de cronologías (triángulos rojos) en la parte alta de la cuenca del Valle del Yaqui, Sonora y presas importantes que captan el escurrimiento producido en dicha región.

La reconstrucción de escurrimientos octubre-junio se extiende para los últimos 479 años (1534-2012). Los escurrimientos estacionales octubre-junio constituyen el 43% de los volúmenes registrados durante el ciclo agrícola. Esta reconstrucción sugiere que la planeación del ciclo agrícola en términos de superficie cultivada, no debe fundamentarse en los registros de escurrimientos promedio de los últimos 70 años, sino que deben considerarse eventos extremos hasta de 10 años consecutivos que se presentan de 4 a 6 veces por siglo y que han afectado el valle del Yaquí en los últimos 479 años (figura 5).

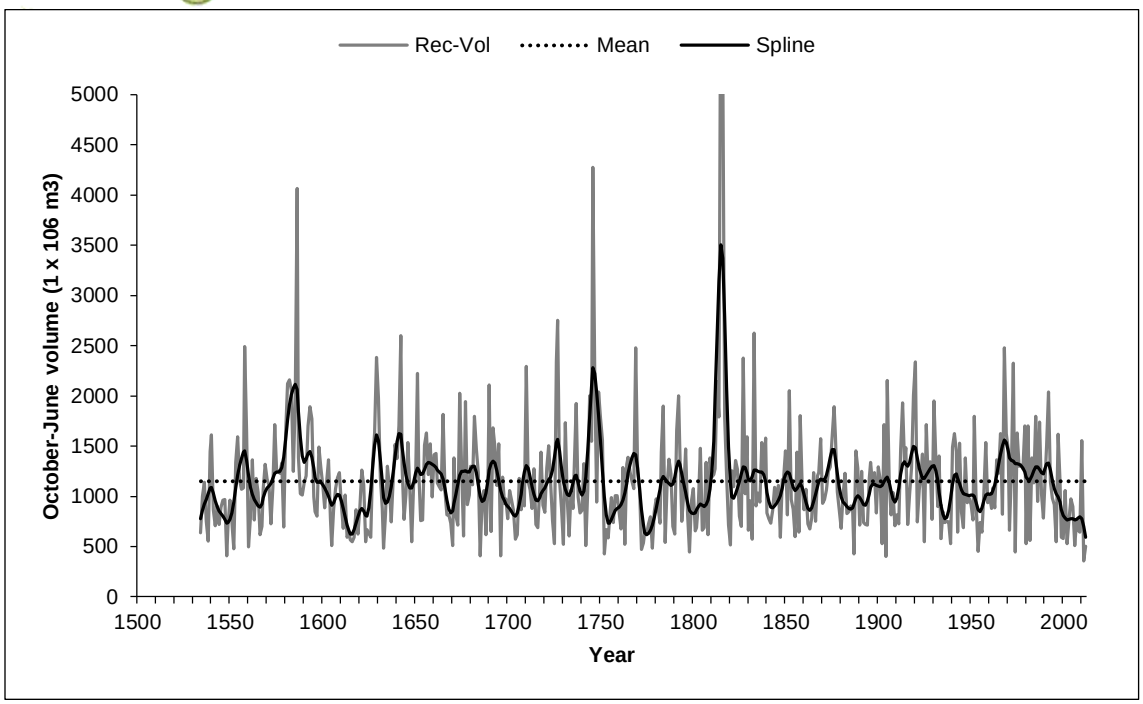


Figura 5. Volumen reconstruido de escurrimientos acumulados octubre-junio para la cuenca del Valle del Yaqui, Sonora.

DISCUSIÓN

Teleconección de las reconstrucciones de precipitación con índices ENSO, PDO, AMO

La precipitación invernal en el norte de México y suroeste de los Estados Unidos de América está ligada significativamente con índices de ENSO [27]. Esta relación se registra de manera clara y precisa en los anillos de crecimiento y específicamente en la porción de madera temprana de especies arbóreas como *Pseudotsuga menziesii*.

La teleconección extratropical de ENSO en el norte de México es significativa, pero su intensidad y extensión varía a través del tiempo [28]. Esta inestabilidad se observa al comparar en períodos de tiempo similares la correlación entre la precipitación reconstruida y el Índice de Lluvia Tropical (TRI, Tropical Rainfall Index), índice que constituye un estimativo de la variabilidad de ENSO, al usar anomalías de precipitación en la parte central del Pacífico [29]. Lo anterior se ilustra para la reconstrucción de Chihuahua, al comparar la precipitación estacional reconstruida octubre-mayo con los índices TRI en subperíodos de 20 años de 1896 a 1995. De esta manera se encontró, que dicha correlación fue variable, con valores de determinación (r) en el rango de 0.2 hasta 0.69. Una fluctuación similar se observó para la reconstrucción de precipitación para Durango con valores de correlación que fluctuaron de 0.27 a 0.78 [28].

La reconstrucción de precipitación del centro-sur de Nuevo León mostró bajas correlaciones con los índices TRI para el período 1896 – 1995. Las correlaciones encontradas, indican la baja influencia de ENSO en la precipitación en esta región del noreste de México.

El impacto de ENSO fue evidente en la reconstrucción de volúmenes de escurrimiento reconstruidos en la cuenca del Valle del Yaqui, donde la variabilidad hidroclimática del período invernal, tiene alta influencia del fenómeno ENSO [30, 31]. La asociación encontrada entre los índices de madera temprana y SOI reconstruidos fue de -0.59, situación que implica que la fase cálida del Niño produce un efecto favorable en esta cuenca al incrementar la precipitación, pero ocasiona sequías intensas durante la su fase fría (La Niña).

El PDO consiste en un patrón de variabilidad climática del Pacífico que cambia a escala interdecadal en períodos aproximados de 20 a 30 años. Este patrón se detecta debido a un calentamiento o enfriamiento de las aguas superficiales del Océano Pacífico por encima de los 20°. Durante la fase cálida o positiva, la parte oeste del Pacífico se enfría y la porción oriental se calienta; ocurre lo contrario durante la fase fría (Hare y Mantua, 2000). La influencia de este patrón circulatorio se detectó de manera significativa en cronologías del norte de Baja California, donde los índices dendrocronológicos estuvieron significativamente correlacionados con índices reconstruidos de PDO ($r= 0.68$, $p<0.000$, $n= 109$). Las frecuencias derivadas de un análisis espectral señalan picos significativos en rangos de 12 a 28 y entre 50 y 70 años, que corresponden a frecuencias del PDO. Por otra parte, la influencia de AMO, parece ser más importante en el centro y sureste de México. Este fenómeno se relaciona con un patrón de variabilidad de la temperatura del mar en la porción norte del océano Atlántico, una vez que se han removido tendencias relacionadas con el efecto de gases efecto invernadero [32]. Se ha determinado que la precipitación en la península de Yucatán y costas de Oaxaca esta en antifase; es decir mayor cantidad de lluvias en su fase fría y menor en su fase cálida [6]. Estos fenómenos circulatorios muchas veces interactúan, maximizando o atenuando la variación hidroclimática para una región, por lo que es importante generar una red dendrocronológica muy completa y relacionarlas con diversas variables climáticas, índices de producción, etc., para un mejor entendimiento del potencial impacto de estos fenómenos de circulación general y cuya relación puedes ser de utilidad con fines predictivos.

CONCLUSIONES

El conocimiento histórico de la variabilidad hidroclimática en la República Mexicana es fundamental para establecer planes de manejo que coadyuven a eficientar el uso del agua, recurso natural renovable de escasa disponibilidad, particularmente en el porción centro-norte de México, región que por sus características geográficas y de circulación atmosférica favorece condiciones de limitada precipitación, dando paso a los ecosistemas desérticos de los desiertos Chihuahuense y Sonorense.

Las reconstrucciones de precipitación del período invernal o invierno-primavera derivadas de cronologías de madera temprana de especimenes arbóreos localizados en las Sierras Madre Occidental y Oriental, indican la elevada variabilidad interanual (alta frecuencia) y multianual (baja frecuencia) presente en más de 500 años de extensión para algunas de las reconstrucciones analizadas. Períodos de sequía extraordinarios como los acontecidos en la última década del siglo XX, desde el punto de vista climatológico e hidrológico no han tenido la severidad y extensión de ciertos eventos hidroclimáticos acontecidos en épocas pasadas, sin embargo el impacto social y económico ha sido intenso. Una respuesta a lo anterior, se atribuye a que la sociedad es cada vez más vulnerable a eventos de baja disponibilidad hídrica, al existir cada vez mayor competencia y demanda por el recurso agua, lo cual se deriva del aumento poblacional que demanda un mayor volumen de este recurso. Por otra parte, el

establecimiento de poblaciones en sitios más susceptibles a inundaciones o sequías los hace más vulnerables a estos eventos extremos.

La mayoría de las reconstrucciones paleoclimáticas reportadas en este estudio, son afectadas por el fenómeno ENSO; sin embargo, análisis más detallados indican que otros fenómenos circulatorios interactúan y en ciertas regiones pueden ser más importantes; caso concreto, la región del noroeste en Baja California con el PDO y centro y sureste de México con AMO.

El desarrollo e integración de una red de cronologías de anillos de árboles más completa (que actualmente no supera las 170 cronologías) y la exploración del potencial dendrocronológico de nuevas especies arbóreas presentes en diversos ecosistemas y cuyo crecimiento anual responda a los cambios climáticos, pueden constituir alternativas para ampliar el conocimiento de la paleoclimatología en México.

Los estudios paleoclimáticos coadyuvan a un mejor entendimiento de la variabilidad hidoclimática en el período Holoceno, información fundamental para el desarrollo de planes de manejo que mejoren la planeación y uso adecuado del agua, servicio ambiental que tiene su origen principalmente en los bosques de las áreas montañosas de México y que en la actualidad, el aprovechamiento forestal desmedido y los cambios en el uso del suelo han alterado su ciclo hidrológico, lo cual va en detrimento de la disponibilidad de agua en cantidad y calidad de una población cada vez mayor.

AGRADECIMIENTOS

Los resultados expuestos en este trabajo fueron financiados a través de diversos proyectos de investigación con fondos del Instituto InterAmericano para el cambio climático Global (IAI), fondo sectorial SEP-CONACYT a través del proyecto “Estudio de la relación clima-incendios en el norte-centro de México”; y fondos fiscales del INIFAP a través de los proyectos “Influencia de patrones circulatorios en la frecuencia de incendios forestales en le Sierra Madre Occidental” y “Reconstrucción de la frecuencia histórica de incendios y caracterización de las cargas de combustibles en ecosistemas forestales del norte-centro de México”.

REFERENCIAS

[1] Bradley, R.S. (1999), “Paleoclimatology: reconstructing climates of the Quaternary”. International Geophysics Series. Elsevier Academic Press. Amsterdan. 614 p.

[2] Fritts, H.C. (1976), “Tree rings and climate”, Academic Press Inc., London.

[3] Douglas, A.E. (1941), “Crossdating in dendrochronology”, Journal of Forestry 39: 825 - 828.

[4] Martínez, M. (1963), “Las pináceas mexicanas”, Tercera Edición. Instituto de Biología, UNAM. México, D.F- 315 p.

[5] Stahle D.W., Villanueva, J., Cleaveland, M.K., Therrell, M.D., Paull, G.J., Burns, B.T., Salinas, W., Suzan, H., Fulé, P.Z. (2000), "Recent tree-ring research in Mexico", en F. A. Roig (comp.), Dendrocronología en América Latina. EDIUNC, Mendoza, pp. 285-306.

[6] Méndez, M., Magaña, V. (2010), "Regional aspects of prolonged meteorological droughts over Mexico and Central America", American Meteorological Society 23: 1175-1188.

[7] Stokes, M.A., Smiley, T.L. (1968), "An Introduction to Tree-Ring Dating", University of Chicago Press, Chicago.

[8] Holmes, R. L. (1983), "Computer-assisted quality control in tree-ring dating and measurement", Tree-Ring Bulletin, 43: 69 – 78.

[9] Cook, E.R., Woodhouse, C.A., Eakin, C.M., Meko, D.M., Stahle, D.W. (2004), "Long-Term Aridity Changes in the Western United States", Science, 306 (5698): 1015 – 1018.

[10] Fritts, H.C. (1991), "Reconstructing large-scale climatic patterns from tree-ring data", The University of Arizona Press, Tucson.

[11] Swetnam, T.W., Thompson, M.A., Sutherland, E.K. (1988). "Using dendrochronology to measure radial growth of defoliated trees", USDA, Forest Service, Cooperative State Research Service, Agricultural Handbook 639.

[12] Stahle, D.W. (1999), "Useful strategies for the development of tropical tree-ring chronologies", IAWA Journal, 20(3): 249-253.

[13] Swetnam, T.W., Betancourt, J.L. (1990), "Fire--Southern Oscillation relations in the southwestern United States", Science, 249:1017-1020.

[14] Fulé, P.Z., Covington, W.W. (1996), "Changing fire regimes in Mexican pine forests: ecological and management implications", Journal of Forestry, 94: 33 - 38.

[15] Fulé, P.Z., Covington, W.W. (1998), "Spatial patterns of Mexican pine-oak forests under different recent fire regimes", Plant Ecology, 134: 197 – 209.

[16] Villanueva-Diaz, J., Luckman, B.H., Stahle, D.W., Therrell, M.D., Cleaveland, M.K., Cerano-Paredes, J., Gutierrez-Garcia, G., Estrada-Avalos, J., Jasso-Ibarra, R. (2005), "Hydroclimatic variability of the upper Nazas basin: water management implications for the irrigated area of the Comarca Lagunera", Dendrocronologia, 22(3): 215 – 223.

[17] Villanueva Díaz, J., Hernández, A., García, F., Cornejo, E., Stahle, D.W., Therrell, M.D., Cleaveland, M.K. (2003), "Análisis estructural de un rodal milenario de sabino (*Taxodium mucronatum* Ten.) en Los Peroles, San Luis Potosí, México, Ciencia Forestal en México, 28(94): 57 – 79.

[18] Villanueva Díaz, J., Cerano P.J., Constante G.V., Stahle, D.W., Estrada A.J., Tostado P.M. (2011), "Variabilidad hidroclimática histórica del norte de México inferida con anillos de crecimiento de Douglas-fir", Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, Publicación Especial No. 2: 221-234.

[19] Stahle, D.W., Villanueva-Diaz, J., Burnette, D., Cerano-Paredes, J., Heim Jr., R.R., Fye, F.K., Acuna-Soto, R., Therrell, M.D., Cleaveland, M.K., Stahle, D.K. (2011), "Major Mesoamerican droughts of the past millennium", Geophysical Research Letters 38, L05703

[20] Therrell, M.D., Stahle, D.W., Cleaveland, M.K., Villanueva-Diaz, J. (2002), "Warm season tree growth and precipitation over Mexico", Journal of Geophysical Research, 107 (D14): ACL 6-1 – ACL 6-8.

[21] Villanueva Díaz, J., Cerano-Paredes, J., Fulé, P.Z., Cortés, C.,Vázquez, L., Yocom, L., Ruiz, J.A. (2015), "Cuatro siglos de variabilidad hidroclimática en el noreste de Chihuahua, México, reconstruida con anillos de árboles", Investigaciones Geográficas, Boletín del Instituto de Geografía, UNAM 87: 141-153.

[22] Acuña-Soto, R., Stahle, D.W., Cleaveland, M.K., Therrell, M.D. (2002), "Megadrought and megadeath in 16th century Mexico", Emerging Infectious Diseases, 8(4): 360 – 362.

[23] Therrell, M.D., Stahle, D.W., Acuña-Soto, R. (2004), "Aztec drought and the curse of one rabbit", Bulletin of the American Meteorological Society, 85 (9): 1263 – 1272.

[24] Fye, F.K., Stahle, D.W., Cook, E.R. (2003), "Paleoclimatic analogs to twentieth-century moisture regimes across the United States", Bulletin of the American Meteorological Society, 84 (7): 901–909.

[25] Florescano, E., (1980), "Análisis histórico de las sequías en México", Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, Comisión del Plan Nacional Hidráulico. México, D.F.

[26] Villanueva Díaz, J., Cerano Paredes, J., Gómez Guerrero, A., Castruita Esparza, L., Stahle, D.W., Ruiz, A. (2014), "Volúmenes reconstruidos en presas del Valle del Yaqui con anillos anuales de coníferas", Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. Pub. Esp. 10: 1977-1991.

[27] Ropelewski, C.F., Halpert, M.S. (1986), "North American precipitation and temperature patterns associated with El Niño/Southern Oscillation (ENSO)", Monthly Weather Review, 114 : 2352 - 2362.

[28] Cleaveland, M.K., Stahle, D.W., Therrell, M.D.,Villanueva-Diaz, J., Burns, B.T. (2003), "Tree-ring reconstructed precipitation and tropical teleconnections in Durango, Mexico", Climatic Change, 59: 369-388.

[29] Wright, P.B. (1979), "Persistance of rainfall anomalies in the Central Pacific", Nature, 277: 371 – 374.

[30] Stahle, D.W., D'Arrigo, R.D., Krusic, P.J., Cleaveland, M.K., Cook, E.R., Allan, R.J., Cole, J.E., Dunbar, R.B., Therrell, M.D., Guy, D.A., Moore, M.D., Stokes, M.A., Burns, B.T., Villanueva-Diaz, J., Thompson, L.G. (1998), "Experimental dendroclimatic reconstruction of the Southern Oscillation", Bulletin of the American Meteorological Society, 70(10): 2137-2152.

[31] Nicholas, R.E., Battisti, D.S. (2008), “Drought recurrence and seasonal rainfall prediction in the Río Yaqui Basin, Mexico”, Journal of Applied Meteorology, Climatology 47: 991-1005.

[32] Schesinger, M.E., (1994), “An oscillation in the global climate system of period 65-70 years”, Nature 367(6465): 723-726.

Science and Technological Innovation:
A Strategy for Well-Being

Ciencia e Innovación Tecnológica:
Estrategia para el Bienestar

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 febrero de 2016 en las instalaciones de la Editorial Universidad Autónoma de Guadalajara. Av. Patria 1201, Lomas del Valle 45129, Zapopan, Jalisco, México