Inducción a la Ciencia, la Tecnología y la Innovación en la Región Centro

Vol. II, Num. 4

Ciencias Naturales y Exactas

18° Verano de la Ciencia
Región Centro 2016

Inducción a la Ciencia, la Tecnología
y la Innovación en la Región Centro

Vol. II, Num. 4

Ciencias
Naturales y Exactas

18° Verano de la Ciencia
Región Centro 2016

Ciencias
Naturales y Exactas

Índice

Ciencias Naturales y Exactas

24 **SUPERFICIES HIDRÓFOBAS DE MEZCLAS DE POLÍMEROS: ANÁLISIS DE LA TOPOGRAFÍA DEL ESMALTE DENTAL CON RECUBRIMIENTO DE OCTADECIL TRICLORO SILANO PARA LA PROTECCIÓN CONTRA LA EROSIÓN ÁCIDA**
Aguilar Palos María Isabel | Universidad Autónoma de Aguascalientes
Pérez López José Elías | Universidad Autónoma de San Luis Potosí

31 **EVALUACIÓN DEL POTENCIAL TÓXICO DE SUELOS DEL ESTADO SONORA**
Alcaraz Nava Ulises Antonio | Universidad Autónoma de Aguascalientes
Mejía Saavedra José de Jesús | Universidad Autónoma de San Luis Potosí

36 **INVENTARIO DE LA MASTOFAUNA DEL CERRO DEL VEINTE, MUNICIPIO DE IRAPUATO, GUANAJUATO**
Almanza García Gabriela | Instituto Tecnológico Superior de Irapuato
Hernández Navarro Efrén Martín | Instituto Tecnológico Superior de Irapuato

42 **GENERACIÓN DE MUTANTES EN EL HONGO PATÓGENO Sporothrix schenckii**
Álvarez Ortiz Patricia Elizabeth | Universidad Autónoma de Coahuila
Mora Montes Héctor Manuel | Universidad de Guanajuato

47 **FABRICACIÓN DE NANOESTRUCTURAS DE CARBONO DOPADOS CON NITRÓGENO**
Araiza Acosta Carlos Alberto | Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Muñoz Sandoval Emilio | Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica

53 **CONTRACCIÓN EN MUSCULO LISO DE RAMAS DE ARTERIA MESENTÉRICA EN RATAS MEDIADA POR CANALES IONICOS**
Arcos Rivera Esau | Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Algara Suárez Paola | Universidad Autónoma de San Luis Potosí

58 **SÍNTESIS DE DIHIDROPIRIMIDINTIONAS ASISTIDA POR MICROONDAS**
Ayala Medrano Eduardo Daniel | Universidad Autónoma de Zacatecas
García Elías José | Universidad Autónoma de Zacatecas

64 **PURIFICACIÓN DE H+-ATPASA A PARTIR DE MEMBRANA PLASMÁTICA DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE Y PURIFICACIÓN DE Ca2+ ATPASA A PARTIR DE TEJIDO MUSCULAR DE CONEJO**
Bajonero Arroyo María Fernanda | Instituto Tecnológico Superior de Irapuato
Sampedro Pérez José Guadalupe | Universidad Autónoma de San Luis Potosí

70 **IDENTIFICACION DE MACROINVERTEBRADOS ACUATICOS DE LOS RIOS DE JALPAN DE SERRA QUERETARO**
Ballesteros García Juan Diego | Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro
Ramírez Herrejón Juan Pablo | Universidad Autónoma de Querétaro

75 **AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO DE PLANTAS DE ZONAS NATURALES PROTEGIDAS DEL ESTADO DE GUANAJUATO**
Becerra Lira Víctor Eduardo | Instituto Tecnológico Superior de Purísima del Rincón
Gómez Luna Blanca Estela | Universidad de Guanajuato

81 **EVALUACION DE LA CORROSION EN ACERO AL CARBONO 1018 Y ACERO INOXIDABLE 304**
Bernal Macareno Sagrario | Universidad Autónoma de Coahuila
Sosa Domínguez Adrian | Universidad Autónoma de Querétaro

87 **EVALUACIÓN DEL EFECTO TOXICO DEL VENENO DE ESCORPIONES DEL GENERO VAEJOVIS DEL ESTADO DE GUANAJUATO EN RATONES BALB/C**
Bueno González Juan Antonio | Instituto Tecnológico Superior de Irapuato
Ramírez Gomez Xóchitl Sofía | Universidad de Guanajuato

92 **ANALISIS DE LA DIETA DE HETERANDRIA BIMACULATA EN LA REGION CENTRO - ESTE DE MÉXICO**
Carbajar Becerra Omar | Universidad Autónoma de Querétaro
Ramírez Herrejón Juan Pablo | Universidad Autónoma de Querétaro

96 **SÍNTESIS DEL NÚCLEO CUMARÍNICO 7-HIDROXICUMARINA-3-CARBOXILATO DE ETILO ASISTIDO POR MICROONDAS**
Carrera Arellano Ethson Uriel | Universidad Autónoma de Zacatecas
Flores Morales Virginia | Universidad Autónoma de Zacatecas

102 **PROPAGACIÓN IN VITRO DE PLANTAS DE ZONAS ÁRIDAS**
Carrera Farías Miguel Ángel | Universidad de Guanajuato
Pérez Molphe Balch Eugenio Martín | Universidad Autónoma de Aguascalientes

108 **IDENTIFICACIÓN DE LA LOCALIZACIÓN CELULAR DE LAS PROTEÍNAS ATGRDP1 Y SU PARÁLOGO ATGRDP2 EN Nicotiana benthamiana Y Arabidobsis thaliana**
Castellanos Rodríguez Diana Lucila | Universidad Autónoma de Aguascalientes
Jiménez Bremont Juan Francisco | Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica

115 **USO DE LA TEORÍA DEL FUNCIONAL DE LA DENSIDAD PARA DETERMINAR LOS ISÓMEROS DE MÍNIMA ENERGÍA EN FULLERENOS FUNCIONALIZADOS CON GRUPOS SCH3**
Contreras Andrade Saraí | Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Chavira Quintero Rigoberto | Universidad Autónoma de San Luis Potosí

120 **ANÁLISIS MULTIVARIADO DE LOS EFECTOS DE LA EROSIÓN EN LA INFAESTRUCTURA URBANA DE ZACATECAS**
Contreras Delgado Melissa | Universidad Autónoma de Zacatecas
Escalona Alcázar Felipe de Jesús | Universidad Autónoma de Zacatecas

125 **PRODUCCIÓN DE FITOHORMONAS A TRAVES DE FERMENTACIONES SUMERGIDAS**
Córdova Cortez Jesús Alejandro | Universidad Autónoma de Coahuila
Sánchez Robles José Humberto | Biorganix Mexicana

131 **SOBRE LAS MÉTRICAS DE CONTROLABILIDAD**
Cortés Servín David | Universidad de Guanajuato
Barajas Ramírez Juan Gonzalo | Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica

137 **EXPRESIÓN HETERÓLOGA Y CARACTERIZACIÓN DE UNA ASPARAGINASA PARA EL TRATAMIENTO DE LA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA**
Cruz Santos Juan Carlos | Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Cházaro Ruiz Luis Felipe | Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica

143 **FOTODEGRADACIÓN CATALÍTICA DE COMPUESTOS TÓXICOS**
Dávila Ortiz Samantha Lizeth | Universidad Autónoma de Zacatecas
Martínez Gómez Claudia | Universidad de Guanajuato

147 **ESTANDARIZACIÓN DE LA CUANTIFICACIÓN POR qPCR DUPLEX DEL COCIENTE DNA MITOCONDRIAL Y DNA GENÓMICO EN EL DESARROLLO DE CEREBRO EMBRIONARIO DE RATÓN**
De la Rosa Hernández Martina | Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Antaramian Salas Anaid | Instituto de Neurobiología - UNAM

154 **USO DE LA ESPECTROSCOPIA RAMAN PARA EL ANÁLISIS DE PIEL**
Delgado Chávez Ana Cristina | Universidad Autónoma de Coahuila
González Contreras Francisco Javier | Universidad Autónoma de San Luis Potosí

158 **ESTUDIO DE LA RECUPERACIÓN DEL NAPROXENO MEDIANTE LA TÉCNICA DE EXTRACCIÓN LIQUÍDO-LIQUÍDO**
Delgado Hernández Edith Jessica | Universidad Autónoma de Coahuila
Razo Lazcano Teresa Alejandra | Universidad de Guanajuato

164 **RESCATE DE CONSUMO DE FLOR DE PALMA (Yucca filifera Chabaud) Y GENERACIÓN DE VALOR AGREGADO**
Delgado Reyes José David | Universidad Autónoma de Zacatecas
Feregrino Perez Ana Angélica | Universidad Autónoma de Querétaro

170 **LISTADO PROSPECTIVO DE LA AVIFAUNA EN LA COMUNIDAD EL GARBANZO IRAPUATO, GUANAJUATO, MÉXICO**
Díaz Quintero Carlos | Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro
Hernández Navarro Efrén Martín | Instituto Tecnológico Superior de Irapuato

175 **ENRIQUECIMIENTO DE RNAs PEQUEÑOS EN LINEA CELULAR CasKi**
Fierro Villegas José Alejandro | Universidad Autónoma de Querétaro
López Jesús Adrián | Universidad Autónoma de Zacatecas

182 **OBSERVACIÓN DE LA REGULACIÓN DEL PROMOTOR T5 EN CULTIVOS JÓVENES Y VIEJOS UTILIZANDO LA PROTEÍNA GFP COMO REPORTERO**
Figueroa Pérez Karla Guadalupe | Instituto Tecnológico Superior de Irapuato
Gutiérrez Medina Braulio | Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica

191 **CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLADOS BACTERIANOS DE GUANAJUATO**
Fraire García David Aarón | Universidad Autónoma de Coahuila
Colli Mull Juan Gualberto | Instituto Tecnológico Superior de Irapuato

197 **HONGOS PATÓGENOS OPORTUNISTAS ¿CÓMO IDENTIFICARLOS RÁPIDAMENTE EN INFECCIONES HOSPITALARIAS?**
García Araujo Estrella Alejandra | Universidad Autónoma de Zacatecas
Castaño Navarro Irene Beatriz | Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica

201 **EVALUACION DE LA PRODUCCION DE ÁCIDO SALICÍLICO POR PSEUDOMONAS SPP**
García Ibarra Sergio | Universidad Autónoma de Coahuila
Sanchez Robles José Humberto | Biorganix Mexicana

207 **CARACTERIZACIÓN DE UNA ASPARAGINASA PARA EL TRATAMIENTO DE LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA**
García López Aurora del Carmen | Universidad Autónoma de Aguascalientes
Santos Martínez Martha Leticia | Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica

213 **PROPAGACIÓN IN VITRO DE MORINGA OLEIFERA**
García Reyes Eddaliz | Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro
Morales Domínguez José Francisco | Universidad Autónoma de Aguascalientes

219 **PRE-ACLIMATACIÓN Y ACLIMATACIÓN DE EPIDENDRUM CARDIOPHORUM Y MYRMECOPHILA GRANDILFORA, ORQUÍDEAS DE LA HUASTECA POTOSINA**
García Zepeda Claudia | Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro
Carranza Álvarez Candy | Universidad Autónoma de San Luis Potosí

226 **DISEÑO DE CONSORCIOS MICROBANOS PARA LA DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS**
Gutiérrez Amézquita Martha Isela | Instituto Tecnológico Superior de Irapuato
López Ramirez Varinia | Instituto Tecnológico Superior de Irapuato

231 **AUTOMATIZACIÓN DE LA TOMA DE IMÁGENES CON MATLAB PARA LA MEDICIÓN DEL POTENCIAL HÍDRICO EN SUELO ORGÁNICO E INORGÁNICO POR TERMOGRAFÍA INFRAROJA**
Gutierrez Sánchez Raúl Alejandro | Universidad de Guanajuato
Villaseñor Mora Carlos | Universidad de Guanajuato

235 **EXPRESIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA-ESTRUCTURAL DE ENZIMAS QUE PARTICIPAN EN LA DEGRADACIÓN DE TRIACILGLICEROLES EN EL ADIPOCITO**
Hernández Ceja Carmen Lucero | Instituto Tecnológico de Celaya
Lara González Samuel | Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica

242 **SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE HIDROGELES ELECTROACTIVOS DE POLI(ACRILAMIDA-CO-ÁCIDO ACRÍLICO)/POLIPIRROL**
Hernández Landín Carlos Antonio | Instituto Tecnológico de Celaya
Ovando Medina Víctor Manuel | Universidad Autónoma de San Luis Potosí

248 **INDUCCIÓN DEL ESTADO STRAIN-GLASS MEDIANTE TRATAMIENTO TÉRMICO EN LA ALEACIÓN $Ni_{50}Mn_{34}In_{14}Cr_2$**
Hernández Saucedo Alejandra de Jesús | Universidad Autónoma de Aguascalientes
Flores Zúñiga Horacio | Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica

255 **PELÍCULAS DE QUITOSANO/GLICERINA/POLIALCOHOL VINÍLICO PARA SU POTENCIAL APLICACIÓN EN LA REGENERACIÓN CELULAR: CONDICIONES DE PREPARACIÓN**
Herrera De Santiago Epitacio | Universidad Autónoma de Coahuila
Calixto Olalde Ma. Elena | Instituto Tecnológico Superior de Irapuato

260 **AUTOMATIZACIÓN DE LA TOMA DE IMÁGENES CON MATLAB P ARA LA MEDICIÓN DEL POTENCIAL HÍDRICO EN SUELO ORGÁNICO E INORGÁNICO POR TERMOGRAFÍA INFRAROJA**
Herrera Guzmán Karla Natalia | Universidad de Guanajuato
Villaseñor Mora Carlos | Universidad de Guanajuato

264 **USO DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS PARA SERS PARA DIAGNÓSTICO TEMPRANO, NO INVASIVO DE AFECCIONES EN HUMANOS**
Herrera Hernández Martha Mariana | Universidad Autónoma de Aguascalientes
Navarro Contreras Hugo Ricardo | Universidad Autónoma de San Luis Potosí

270 **ALTERACIONES EN EL MICROCIRCUITO DEL ESTRIADO EN UN MODELO DE AUTISMO EN LA RATA**
López de Olmos Sánchez Said | Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Ibáñez Sandoval Osvaldo | Universidad Autónoma de San Luis Potosí

276 **WHY DO ONLY SOME RADIO GALAXIES ACQUIRE GIANT SIZES?**
López Vazquez Elizabeth | Universidad de Guanajuato
Andernach Kuhlmann Heinz | Universidad de Guanajuato

283 **CUANTIFICACIÓN DE LA CAPACIDAD SOLUBILIZADORA DE FÓSFORO DE MICROORGANISMOS AISLADOS DE ÁREAS NATURALES PROTEGIDAS**
Luna Calzada Ramón | Instituto Tecnológico Superior de Irapuato
Márquez Lucio Maria Azucena | Instituto Tecnológico Superior de Irapuato

288 **AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO DE PLANTAS DE ZONAS NATURALES PROTEGIDAS DEL ESTADO DE GUANAJUATO**
Luna Rangel Viviana | Universidad Autónoma de Querétaro
Gómez Luna Blanca Estela | Universidad de Guanajuato

294 **IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE AISLADOS BACTERIANOS METAL-RESISTENTES**
Magaña Loyola Mariana Libertad | Instituto Tecnológico de Celaya
Flores De la Torre Juan Armando | Universidad Autónoma de Aguascalientes

299 **SÍNTESIS DE COMPUESTOS ORGÁNICOS POTENCIALMENTE BIOACTIVOS MEDIANTE METODOLOGÍAS DE LA QUÍMICA VERDE**
Marín Cortez María del Pilar | Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro
Perez Berumen Catalina M. | Universidad Autónoma de Coahuila

305 **HELMINTOS DE DIDELPHIS VIRGINIANA (MAMMALIA: DIDELPHIDAE) EN ZACATECAS**
Martínez Flores Wendolyne | Universidad Autónoma de Zacatecas
Martínez Salazar Elizabeth Aurelia | Universidad Autónoma de Zacatecas

311 **AISLAMIENTO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS CON POTENCIAL BACTERIOCINOGÉNICO A PARTIR DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN DE AGUAMIEL**
Medina Abrego Luis Arturo | Universidad Autónoma de Zacatecas
Flores Gallegos Adriana Carolina | Universidad Autónoma de Coahuila

316 **LISTADO PRELIMINAR DE AVIFAUNA EN LA COMUNIDAD DE EL GARBANZO, CUENCA BAJA DEL RÍO TEMASCATÍO, IRAPUATO, GUANAJUATO, MÉXICO**
Méndez González Karen Neftali | Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Hernández Navarro Efrén Martín | Instituto Tecnológico Superior de Irapuato

322 **ESTUDIO DE EQUILIBRIO DE FORMACION DE COMPLEJOS DE FIERRO (II)-DIAMINAS**
Mendoza Manriquez María Guadalupe | Instituto Tecnológico Superior de Irapuato
Segoviano Garfias José de Jesús Nezahualcóyotl | Universidad de Guanajuato

327 **DESARROLLO DE MATERIALES PARA ELIMINAR COMPONENTES TÓXICOS EN FUENTES DE AGUA**
Mendoza Medina Aury Guadalupe | Universidad de Guanajuato
Martinez Rosales Merced | Universidad de Guanajuato

332 **ANÁLISIS IN SILICO DE UN DERIVADO DE CUMARINA PARA PREDECIR POSIBLE ACTIVIDAD BIOLÓGICA**
Montano Luna María del Carmen | Universidad Autónoma de Zacatecas
García Elías José | Universidad Autónoma de Zacatecas

337 **SÍNTESIS DE COMPUESTOS ORGÁNICOS POTENCIALMENTE BIOACTIVOS MEDIANTE METODOLOGÍAS DE LA QUÍMICA VERDE**
Montenegro Nares Jorge Isaac | Universidad Autónoma de Coahuila
Perez Berumen Catalina M. | Universidad Autónoma de Coahuila

343 **OBTENCION Y CARACTERIZACION DE PELICULAS POLIMERICAS Y TIO2, ESTUDIO DE SU APLICACIÓN EN LA DEGRADACION DE COLORANTES CONTENIDOS EN FASES ACUOSAS**
Montoya Lara Diana Alejandra | Universidad Autónoma de Zacatecas
González Muñoz María del Pilar | Universidad de Guanajuato

349 **BÚSQUEDA DE GENES DEL HONGO *Metarhizium* IMPPLICADOS EN LA INTERACCIÓN Y BENEFICIO, EN LA RIZÓSFERA DE PLANTAS DE *Sorghum vulgare***
Mora Garduño Josué Daniel | Universidad de Guanajuato
Padilla Guerrero Israel Enrique | Universidad de Guanajuato

355 **CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y DE CAPACIDAD LIPOLÍTICA DE UNA POBLACIÓN DE AISLADOS DE *Y. lipolytica***
Mora Macías Stephany Alejandra | Instituto Tecnológico Superior de Irapuato
Morales Vargas Adán Topiltzin | Universidad de Guanajuato

360 **EFECTO POTENCIAL DE LAS ESPECIES ÍCTICAS EXÓTICAS INVASORAS EN RÍOS DE LA RESERVA DE LA BIOSFERA SIERRA GORDA DE QUERÉTARO**
Mora Martínez Juan Paulo | Universidad de Guanajuato
Ramírez Herrejón Juan Pablo | Universidad Autónoma de Querétaro

365 **EVALUACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA, VIGOR Y PARÁMETROS POBLACIONALES DE LA AVIFAUNA ASOCIADA A LA ZONA IXTLERA DE SAN LUIS POTOSÍ EN RELACIÓN A LA CALIDAD DEL HÁBITAT**
Morales Arias Daniel Mizael | Universidad Autónoma de Zacatecas
Chapa Vargas Leonardo | Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica

368 **SELECCIÓN E IDENTIFICACIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE BACTERIAS AISLADAS DE SITIOS CONTAMINADOS POR ORGANO-CLORADOS CON POTENCIAL USO EN LA BIORREMEDIACIÓN**
Morales Gutiérrez María Fernanda | Instituto Tecnológico de Celaya
Corrales Escobosa Alma | Universidad de Guanajuato

374 **CARACTERIZACION DE ESPECIES SILVESTRES DE LA FAMILIA DROSOPHILDAE DEL CENTRO DE LA REPÚBLICA MEXICANA**
Morales Madariaga María Elena Guadalupe | Universidad Autónoma de Aguascalientes
Riesgo Escovar Juan | Instituto de Neurobiología - UNAM

380 **EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CICATRIZANTE DE HAMELIA PATENS (RUBICEAE) EN RATAS DIABÉTICA**
Morales Martínez Nancy Lorena | Instituto Tecnológico Superior de Irapuato
Cilia López Virginia Gabriela | Universidad Autónoma de San Luis Potosí

384 **FISIOLOGÍA DE LA GLIA EN LA ANOREXIA**
Moreno Valencia Valeria | Universidad Autónoma de Querétaro
Reyes Haro Daniel | Instituto de Neurobiología - UNAM

389 **INFLACIÓN Y CUERDAS**
Muro Cabral César | Universidad Autónoma de Zacatecas
Loaiza Brito Oscar | Universidad de Guanajuato

397 **ELABORACIÒN DE UN NANOSOPORTE MAGNÈTICO PARA INMOVILIZACIÒN DE ENZIMAS**
Nieto Arroyo Carlos Alberto | Instituto Tecnológico de Celaya
Amaro Reyes Aldo | Universidad Autónoma de Querétaro

403 **PROPAGACIÓN IN VITRO Y REGENERACIÓN DE MORINGA OLEÍFERA**
Ontiveros Floriano Daniela | Universidad Autónoma de Coahuila
Morales Domínguez José Francisco | Universidad Autónoma de Aguascalientes

408 **ADSORCION DE CROMO HEXAVALENTE POR MEDIO DE ADSORBENTES NO COMERCIALES**
Ortiz Anaya Israel | Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Calixto Olalde Ma. Elena | Instituto Tecnológico Superior de Irapuato

413 **SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE PELÍCULAS DELGADAS DE CeO2 Y DE CeO2-Gd POR EL MÉTODO SPIN COATING**
Ortiz Estrada Juan José | Universidad Autónoma de Querétaro
Rodríguez Vázquez Ángel Gabriel | Universidad Autónoma de San Luis Potosí

420 **A SEARCH FOR DOUBLE-LOBED RADIO EMISSION FROM GALACTIC STARS AND SPIRAL GALAXIES**
Ortiz Martínez Abiel Felipe | Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Andernach Kuhlmann Heinz | Universidad de Guanajuato

426 **DETERMINACIÓN DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN PLÁNTULAS REGADAS CON AGUA DESINFECTADA**
Padrón Azúa Iván | Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Feregrino Perez Ana Angélica | Universidad Autónoma de Querétaro

431 **ANALISIS COMPARATIVO DE LOS EXTRACTOS DE PLANTAS ORIGINARIAS DEL ESTADO DE GUANAJUATO CON EL USO PARA CONTROL DE LA HIPERGLUCEMIA**
Palomino Saldaña Eva Yasmin | Instituto Tecnológico Superior de Purísima del Rincón
Herrera Pérez Gabriel | Instituto Tecnológico Superior de Irapuato

437 **ESTUDIO DE LA FORMACION DE SISTEMAS DE EXTRACCION BIFASICOS EN FUNCIÓN DE ACTIVIDAD DE AGUA, PARA LA EXTRACCION DE ACIDOS DEBILES**
Patlán Álvarez Edgar Miguel | Universidad de Guanajuato
Ávila Rodriguez Mario | Universidad de Guanajuato

444 **CARACTERIZACIÓN DEL COMPLEJO Hst1-Sum1 COMO FACTOR DE VIRULENCIA EN CANDIDA GLABRATA**
Porras Estala Juan Pablo | Instituto Tecnológico Superior de Purísima del Rincón
De las Penas Nava Alejandro | Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica

450 **SÍNTESIS DEL DERIVADO DE DAPSONA APARTIR DEL AMINOÁCIDO NO ESENCIAL L-METIONINA POR REACCIÓN DE N-ACILACIÓN**
Porras Regalado Xavier | Universidad Autónoma de Zacatecas
García Elías José | Universidad Autónoma de Zacatecas

455 **SÍNTESIS DE UN NÚCLEO BASE DE CUMARINA MEDIANTE UNA REACCIÓN ONE-POT: ESTRUCTURA CON POSIBLE ACCIÓN ANTINEOPLÁSICA**
Quiroz Lumbreras Flor Estefany | Universidad Autónoma de Zacatecas
Flores Morales Virginia | Universidad Autónoma de Zacatecas

460 **ACOPLE LUZ-MATERIA EN MICROCAVIDADES ÓPTICAS SEMICONDUCTORAS: CRECIMIENTO Y CARACTERIZACIÓN IN-SITU**
Ramírez Díaz Ana Laura | Universidad Autónoma de Zacatecas
Cerda Méndez Edgar Armando | Universidad Autónoma de San Luis Potosí

467 **ANÁLISIS MULTIVARIADO DE LOS EFECTOS DE LA EROSIÓN EN LA INFRAESTRUCTURA URBANA DE ZACATECAS Y GUADALUPE**
Ramírez González Lidia Michelle | Universidad Autónoma de Querétaro
Escalona Alcázar Felipe de Jesús | Universidad Autónoma de Zacatecas

472 **PRODUCCIÓN DE BIOETANOL DE SEGUNDA GENERACIÓN**
Ramírez Zamarripa Eduardo | Universidad Autónoma de Coahuila
Amaro Reyes Aldo | Universidad Autónoma de Querétaro

478 **EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN A CONTAMINANTES ORGÁNICOS PERSISTENTES (COPs) EN TORTUGA LORA (Lepidochelys kempii) EN TAMAUILIPAS, MÉXICO**
Rangel Duarte Silvia Gabriela | Universidad Autónoma de Querétaro
Espinosa Reyes Guillermo | Universidad Autónoma de San Luis Potosí

484 **GRAVITACIÓN CUÁNTICA Y LOS NÚMEROS PRIMOS DEL 18° VERANO DE LA CIENCIA REGIÓN CENTRO**
Rentería López Oliver Josué | Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Berra Montiel Oscar Jasel | Universidad Autónoma de San Luis Potosí

489 **DISEÑO, SIMULACIÓN Y SÍNTESIS DE NANOTUBOS DE CARBONO DOPADOS CON NITRÓGENO**
Rivera Escobedo Luis Antonio | Universidad Autónoma de Querétaro
Muñoz Sandoval Emilio | Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica

496 **ESTUDIO DE LA BIOACUMULACIÓN DE METALES PESADOS EN ESPECIES DE Candida**
Rivera Lazarín Ana Luisa | Universidad Autónoma de Coahuila
Cuéllar Cruz Mayra | Universidad de Guanajuato

501 **EVALUACIÓN BROMATOLÓGICA DE DOS GENOTIPOS DE MAÍZ POLIEMBRIÓNICO CULTIVADOS EN DISTINTOS AMBIENTES**
Rivera Macías Luis Enrique | Instituto Tecnológico Superior de Irapuato
Rodriguez Herrera Raúl | Universidad Autónoma de Coahuila

509 **EFECTO ELASTOCALÓRICO EN ALEACIONES CON TRANSFORMACION MARTENSITICA**
Rodríguez Guijarro Cristina | Universidad Autónoma de Zacatecas
Flores Zúñiga Horacio | Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica

515 **NUEVAS ALEACIONES CON MEMORIA DE FORMA TIPO VIDRIO DE DEFORMACIÓN (STRAIN GLASS)**
Rodríguez Ramirez José Alonso | Instituto Tecnológico Superior de Irapuato
Flores Zúñiga Horacio | Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica

521 **EVALUAR EXPRESIÓN DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO (GH) DESPUES DEL TRATAMIENTO CON GHRH Y TRH EN CULTIVO DE NEURONAS CEREBELARES DE POLLO**
Rodríguez Tinajero Claudia Celina | Universidad de Guanajuato
Luna Muñoz Maricela | Instituto de Neurobiología - UNAM

526 **AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO DE PLANTAS DE ZONAS NATURALES PROTEGIDAS DEL ESTADO DE GUANAJUATO**
Rojas Raya Mariana Atzhiry | Instituto Tecnológico Superior de Irapuato
Gómez Luna Blanca Estela | Universidad de Guanajuato

532 **EFECTO POTENCIAL DE LAS ESPECIES ÍCTICAS EXÓTICAS IVASORAS EN RÍOS DE LA RESERVA DE LA BIOSFERA SIERRA GORDA DE QUERÉTARO**
Rosales Marquez Ebsheidi Yaritza | Universidad Autónoma de Zacatecas
Ramírez Herrejón Juan Pablo | Universidad Autónoma de Querétaro

537 **EFECTO DE LA TRH EN REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS Y LIBERACIÓN DE LA HORMONA DEL CRECIMIENTO (GH) EXPRESADA EN LOS LINFOCITOS B DE POLLO**
Rubio Delgado Diana Alejandra | Universidad Autónoma de Aguascalientes
Luna Muñoz Maricela | Instituto de Neurobiología - UNAM

544 **SÍNTESIS DE CHALCONAS POR METODOLOGÍA VERDE**
Saldaña Ríos Jorge Antonio | Universidad de Guanajuato
Pérez Berumen Catalina M. | Universidad Autónoma de Coahuila

549 **APLICACIONES EN ACELERADORES DE PARTICULAS**
Salgado Paredes Luis Alberto | Instituto Tecnológico de Querétaro
Gutiérrez Rodríguez Alejandro Birgilio | Universidad Autónoma de Zacatecas

555 **ADMINISTRACIÓN DE NAPROXENO CON NANOMATERIALES CON MESOPOROSIDAD ORDENADA**
Sánchez Berlanga Sara Sabina | Universidad Autónoma de Coahuila
Rodríguez González Vicente | Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica

561 **DISEÑO, SIMULACIÓN Y SÍNTESIS DE NANOTUBOS DE CARBONO**
Sánchez Blanco Francisco Javier | Universidad Autónoma de Zacatecas
López Urías Florentino | Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica

567 **MEDICIÓN DE POTENCIAL ZETA MEDIANTE MICRO-ELECTROFORESIS**
Sánchez Gallegos Javier Alejandro | Universidad Autónoma de Zacatecas
Arauz Lara Bernardo José Luis | Universidad Autónoma de San Luis Potosí

573 **ANÁLISIS DEL CLC-2 DE RATÓN MEDIANTE ESTIMACIÓN DEL COSTO ENERGÉTICO DEL TRANSITO DE IONES, POR MEDIO DE CALCULOS DFT EN EQUIPOS DE SUPERCOMPUTO**
Sánchez Trujillo Diana Laura | Universidad Autónoma de Zacatecas
Nieto Delgado Pablo Guillermo | Universidad Autónoma de San Luis Potosí

579 **PRUEBA DE MÉTODOS TEÓRICOS EN ESTADOS ELECTRÓNICOS EXCITADOS RESPECTO A BASE DE DATOS EXPERIMENTAL**
Santillán Gómez Tomás | Universidad Autónoma de Zacatecas
Álvarez Valtierra Leonardo | Universidad de Guanajuato

584 **CARACTERIZACIÓN DE UNA ASPARAGINASA PARA EL TRATAMIENTO DE LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA**
Santos Jacobo Paola | Universidad Autónoma de Aguascalientes
Santos Martinez Martha Leticia | Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica

590 **CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS DIFERENTES DOMINIOS DEL SUPRESOR TUMORAL RETINOBLASTOMA**
Santos Valente Ana Patricia | Instituto Tecnológico de Celaya
Olivares Illana Vanesa | Universidad Autónoma de San Luis Potosí

596 **¿CÓMO REGULA LA EXPRESIÓN DE ALGUNOS FACTORES DE VIRULENCIA EL HONGO PATÓGENO *Candida glabrata*?**
Santos Valente Diana Laura | Instituto Tecnológico de Celaya
Castaño Navarro Irene Beatriz | Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica

601 **CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA A ESTRÉS OXIDANTE EN EL HONGO PATÓGENO OPORTUNISTA CANDIDA GLABRATA**
Segura Serrano Misael | Instituto Tecnológico Superior de Purísima del Rincón
De las Penas Nava Alejandro | Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica

607 **ESTANDARIZACIÓN DE UNA qPCR DÚPLEX DEL COCIENTE ADN GENÓMICO-MITOCONDRIAL EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO DEL CEREBRO DE RATÓN**
Tavares Flores Estefania | Universidad Autónoma de Coahuila
Antaramian Salas Anaid | Instituto de Neurobiología - UNAM

612 **SÍNTESIS DE NANOTUBOS DE CARBONO DOPADOS CON NITRÓGENO USANDO ALCOHOL ISOPROPÍLICO COMO PRECURSOR DE CARBONO**
Valdez Dimas Leonardo Andres | Universidad Autónoma de Querétaro
Muñoz Sandoval Emilio | Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica

616 **RIZOBACTERIAS AOSCIADAS A ESPECIES VEGETALES EN JALE MINERO EN VILLA DE LA PAZ, SAN LUIS POTOSÍ**
Varela Guardado Arisbet | Universidad Autónoma de Zacatecas
Vallejo Pérez Moisés Roberto | Universidad Autónoma de San Luis Potosí

622 **PROPAGACIÓN IN VITRO DE PLANTAS ADAPTADAS A LAS ZONAS ÁRIDAS Y SEMIÁRIDAS DE MÉXICO**
Vázquez Narváez Mariana | Universidad Autónoma de Querétaro
Pérez Molphe Balch Eugenio Martín | Universidad Autónoma de Aguascalientes

628 **FABRICACIÓN DE NANOESTRUCTURAS DE CARBONO DOPADAS CON NITRÓGENO: NANOTUBOS**
Vázquez Tovar Guillermo | Universidad Autónoma de Querétaro
Elías Alfaro Claudia Guadalupe | Universidad Autónoma de San Luis Potosí

635 **CARACTERIZACIÓN DE METABOLITOS EN MICOBIONTES DE LÍQUENES**
Vega Rivera Miguel Ángel | Instituto Tecnológico Superior de Irapuato
López Ramírez Varinia | Instituto Tecnológico Superior de Irapuato

641 **SÍNTESIS DE MATERIALES DE TITANIA Y ZIRCONIA UTILIZANDO MOLÉCULAS ORGÁNICAS COMO MODIFICADORES DE LA RED**
Vela Rea Cecilia | Universidad de Guanajuato
Rangel Porras Gustavo | Universidad de Guanajuato

648 **NUEVOS MATERIALES MAGNÉTICOS NANOCRISTALINOS Y CRISTALINOS PARA LA REFRIGERACIÓN MAGNÉTICA E IMANES PERMANENTES**
Velázquez Reyes Juan José | Universidad de Guanajuato
Sánchez Llamazares José Luis | Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica

654 **DISEÑO DE UN NANOSOPORTE PARA LA INMOVILIZACIÓN DE PROTEÍNA BSA**
Vera Pérez | Universidad Autónoma de Querétaro
Amaro Reyes Aldo | Universidad Autónoma de Querétaro

659 **ELECTROADSORCIÓN DE CROMO EN CARBÓN ACTIVADO**
Zavala Arias Karla Gissela | Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Alvarado Montalvo Lucia Guadalupe | Universidad de Guanajuato

665 **IMPLEMENTACIÓN DE UNA PINZA MAGNÉTICA PARA APLICACIONES BIOLÓGICAS**
Zúñiga Pérez Edgar Alberto | Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Moctezuma Martiñón Rosario Esperanza | Universidad Autónoma de San Luis Potosí

671 **ANALISIS PROTEOMICO DE LA CERVEZA ARTESANAL POR ISOELECTROENFOQUE EN CAPILAR**
Hernández Gutiérrez Iván Jaziel | Universidad Autónoma de Aguascalientes
Maldonado Cervantes Enrique | Universidad Autónoma de San Luis Potosí

SUPERFICIES HIDRÓFOBAS DE MEZCLAS DE POLÍMEROS: ANÁLISIS DE LA TOPOGRAFÍA DEL ESMALTE DENTAL CON RECUBRIMIENTO DE OCTADECIL TRICLORO SILANO PARA LA PROTECCIÓN CONTRA LA EROSIÓN ÁCIDA

María Aguilar Palos, I[1] y José Elías Pérez López[2]

RESUMEN

La erosión dental comprende la pérdida del tejido dentario por acción química de ácidos y/o quelantes, no asociados a los producidos por la flora bacteriana. Realizando un recubrimiento del diente con octadecil tricloro silano (OTS), un polímero hidrófobo, se confiere la capacidad de repeler el agua. Los dientes se silanizaron con OTS 1% y 4% (v/v) durante 8h. Mediante las técnicas de espectroscopia infrarrojo (FTIR) y microscopía de fuerza atómica, se evaluaron los grupos químicos del OTS sobre la superficie del esmalte dental y la topografía de la misma; posteriormente se demuestra su efecto y duración, sometiéndolos en soluciones acidas (pH=3, 4 y 5), se observó que a un tiempo de exposición de 95h la película de OTS se conserva.

ABSTRACT

The erosion dental includes the loss of tooth tissue by chemical action of acids or chelating agents, not associated with those produced by the bacterial flora. Making a from the covering of the tooth with OTS, a polymer hydrophobic, confers the ability to repel water. The silanization the teeth with concentrations of 4% and 1% (v/v) with OTS, for 8 h. Using the techniques infrared spectroscopy of FTIR and atomic force microscopy was evaluated the presence chemical groups of OTS on the surface of the tooth enamel and then demonstrates its effect and duration, subjecting them in solutions acid (pH = 3, 4 and 5), it was observed that OTS film is preserved to a 95-hour exposure time.
Palabras clave: erosión, silanizado, hidrófobo.

INTRODUCCIÓN

El término erosión, describe el proceso de destrucción gradual de la superficie de un cuerpo, usualmente por procesos electrolíticos o químicos. En odontología, el término clínico de erosión dental es usado para describir el resultado físico de una pérdida dental patológica, crónica, localizada, indolora, de los tejidos dentales por acción química de ácidos y/o quelantes, no asociados a los producidos por la flora bacterianas que origina la caries dental o por factores mecánicos o traumáticos [EUR J ORAL SCI. 1996]. El desgaste dental o pérdida de sustancia se ha identificado como un problema en salud oral en niños y adultos [Torres, Fuentes, Bornhardt, & Iturriaga, 2015]. La erosión dental es una de las formas más comunes de desgaste dental que ocurre en la dentición temporal y permanente, y puede afectar cualquier superficie dental, pero es más frecuente en las superficies palatinas de dientes anteriores superiores y en superficies oclusales de molares inferiores [TY - JOURTI]. Esmalte de los dientes es la sustancia más dura en el cuerpo de los mamíferos, compuesto por hidroxiapatita de calcio $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ 94%; 3 – 5% agua y 1 – 2% material orgánico.

La hidroxiapatita comienza a desmineralizar naturalmente por debajo del pH 5.5, en estudios anteriores, donde se recubrieron los dientes con OTS se demostró la resistencia a la erosión acida [Patiño-Herrera et al., 2015]. En el presente trabajo se propone y analiza una posible solución al problema de la erosión ácida, siendo un tema de gran importancia en el área de la salud y particularmente para la odontología, a partir de un proceso de silanización del esmalte con octadecil tricloro silano (OTS), en dos

[1] Universidad Autónoma de Aguascalientes, Depto. de Apoyo a la Investigación; Av. Universidad No. 940, Ciudad Universitaria, C.P: 20131, Aguascalientes, Ags., chavepalos82@gmail.com
[2] UASLP. Instituto de Física, UASLP, Álvaro Obregón 64, C.P: 78000, San Luis Potosí, elias@ifisica.uaslp.mx

concentraciones 1% y 4% (v/v), favoreciendo la modificación del esmalte del diente, es decir, su topografía y la condición de mojado. Los polímeros son ampliamente utilizados para fabricar superficies hidrófobas o super-hidrófobas a través de diferentes métodos, tales como procesos mecánicos, polimerización de grabado por plasma, solvente inducido o técnicas electrodinámicas.

En general, una superficie es hidrófila si $\theta < 90°$, es hidrófoba si $90° < \theta < 150°$, y si $\theta > 150°$ se le denomina super-hidrófoba [ZHAO N., WENG L., XIE Q., ZHANG X. AND XU J. 2006]. Se sabe que el fenómeno de la mojabilidad de una superficie está determinado por su rugosidad y composición química. El objetivo del presente trabajo es estudiar el efecto del tiempo en la erosión ácida del esmalte dental recubierto con OTS. Como objetivos específicos: determinar el efecto de la concentración (1% y 4% v/v) para el silanizado del esmalte dental, el efecto del tiempo (8 h) en el proceso de silanizado y por último el efecto del pH (3, 4 y 5).

MATERIALES Y METODOLOGÍA

Se tienen diferentes muestras dentales (incisivos, caninos y premolares) de humano para el tratamiento de recubrimiento con OTS, se realizó una exhaustiva limpieza eliminando restos de tejido y contaminantes. Se realizaron cortes transversales al diente mediante la cortadora de precisión Isomet con un grosor de 2mm, de la coronilla del diente, que es la parte que mantiene el recubrimiento de esmalte. Los dientes con solución EDTA 17% (v/v) (J.T. Baker), durante 3 min, se enjuagó con agua desionizada, después con hipoclorito de sodio (2.5/97.5 mL) (J.T. Baker) durante 5 minutos y nuevamente en EDTA por 3 min, para finalizar se enjuagaron con agua desionizada y secaron con nitrógeno. Se introdujeron los dientes en un frasco con 10mL de cloroformo (Caledon), después se añadió 0.1 mL y 0.4 mL de OTS (Sigma-Aldrich), en frascos diferentes, para obtener concentraciones de 1% y 4% (v/v), respectivamente, al añadir OTS se llena el frasco con nitrógeno y se cierra rápidamente para evitar que se hidrolice el OTS, se sella perfectamente el frasco con papel parafilm, se deja por un tiempo de 8 horas, para llevar a cabo el efecto de silanización. Después los dientes silanizados fueron evaluados in vitro con ácido cítrico (Sigma-Aldrich) (pH=3, 4 y 5), por diferentes periodos de tiempo (24, 72 y 95 horas).

Se empleó la técnica de espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier para identificar la estructura química del esmalte limpio (sin silanizar), el esmalte silanizado sin exposición ácida y el esmalte del diente silanizado después de la exposición acida (pH=3, pH=4 y pH=5), y así, determinar la presencia de OTS sobre la superficie del esmalte y las modificaciones de los grupos funcionales de la hidroxiapatita. El equipo que se utilizó fue Nicolet Nexus 470 FTIR (Nicolet, Madison,WI, USA), cubriendo un rango espectral de 4000 -500 cm^{-1} con una resolución de 2 cm^{-1} con exploraciones de 80 ciclos, que fueron realizados a temperatura ambiente. El procesamiento y análisis de las regiones de la banda de espectros se realizaron con el software OMNIC E.S.P.5.1 (Nicolet).

La técnica de microscopia de fuerza atómica (AFM, Bruker, Dimension Edge) se empleó para caracterizar la topografía y determinar la rugosidad (R_q) de las muestras de las superficies del esmalte silanizado con OTS. El equipo se operó en modo intermitente (mode tapping), con un área de escaneo de $20\mu m$ x 20μm, para este modo se utilizó una punta modelo SCM-PIT, el barrido se hizo a una velocidad de escaneo de 0.3 Hz. Para el procesamiento de las imágenes se utilizó el software NanoScope Analysis v1.40. La R_q es el promedio de las desviaciones cuadráticas respecto a la altura media (cantidad estadística), matemáticamente está definida por:

$$R_q = \sqrt{\frac{1}{n}\sum_i (x_i - \bar{x})^2} \quad (1)$$

Donde n, x_i y $\bar{x}$ son el número de alturas medidas, altura de cada punto y promedio de las alturas, respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

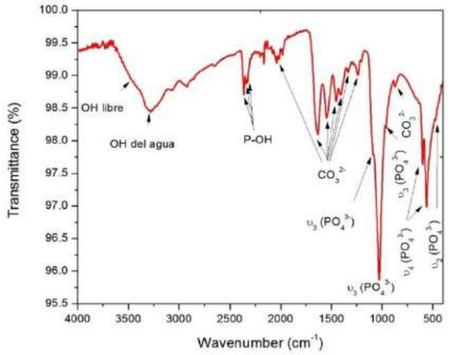


Figura 1. Análisis FTIR del esmalte dental (hidroxiapatita)

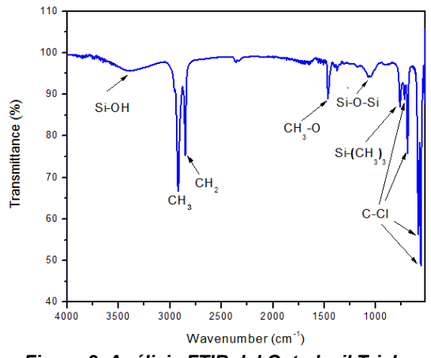


Figura 2. Análisis FTIR del Octadecil Tricloro Silano (OTS)

El espectro de FTIR del esmalte del diente (Figura 1) mostró las bandas características de la hidroxiapatita (HA), que corresponde a los grupos fosfato funcionales, hidroxilo y carbonatos sustitutos en la estructura de HA. Se observó también el espectro de FTIR del compuesto de silanización octadecil tricloro silano (OTS) (Figura 2) están representadas las bandas características de los diferentes grupos funcionales que lo conforman, se observan diferentes bandas que corresponden a los enlaces haluro, los grupos metilo terminales al octadecil y diferentes interacciones del silano con otros elementos. El número de la longitud de onda de las principales bandas del análisis del esmalte dental y de OTS está descrito en Tabla 1.

El espectro FTIR del diente recubierto, OTS 4%-8h (Figura 3) y OTS 1%-8h (Figura 4), muestran modificaciones en la estructura original del esmalte, en ambos casos se observa que las bandas de los distintos grupos funcionales se intensifican de manera significativa, la banda 3000-3500 del agua, se presenta la banda 1200 de Si-CH_2, grupo funcional de OTS, se evidencia que la silanización con una concentración OTS 4% el recubrimiento es mayor.

Tabla 1. Grupos funcionales con su respectivo número de onda.

NÚMERO DE ONDA (cm^{-1})	GRUPO FUNCIONAL
~ 472	ν2(PO43-)
~ 970	ν1(PO43-)
602, 563 e 575	ν4(PO43-)
1197 – 950	ν3(PO43-)
1660 - 1300 e 873	CO32-
3750 – 2500	Deformación axial-H en el enlace de hidrógeno intermolecular
800-600	C-Cl
1260±5	Si(CH3)3
3700-3200	Si-OH
2926±10 - 2855±10	CH2
2962±10 - 2872±10	CH3
1100, 822 y 450	Si-O-Si

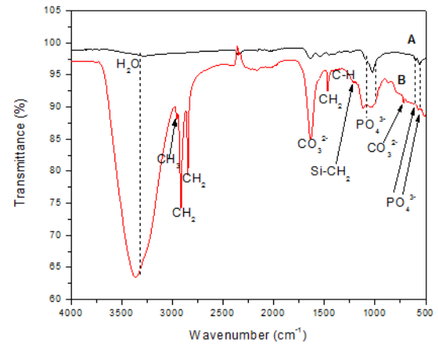


Figura 3. Análisis FTIR: (A) esmalte dental sin recubrimiento, (B) esmalte dental recubierto con OTS 4%(v/v) con un tiempo de silanización de 8 horas.

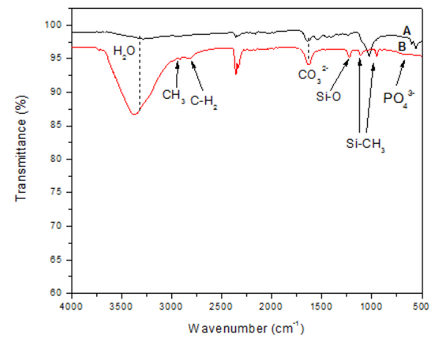


Figura 4. Análisis FTIR: (A) esmalte dental sin recubrimiento, (B) esmalte dental recubierto con OTS 1%(v/v) con un tiempo de silanización de 8 horas.

La Figura 5 se muestra una imagen topográfica del lado facial del diente, sin recubrimiento, obtenida por AFM, con un valor en la rugosidad cuadrática media de $R_q = 21.4 \pm 3.6\, nm$, mientras que la Figura 6, corresponde a una imagen de AFM tomada directamente en la capa del esmalte, en el corte transversal del diente, sobrepuesta sobre la Figura 6 se observa la foto de una rebanada del diente con sus diferentes capas (pulpa, dentina y esmalte), se obtuvo la rugosidad cuadrática media de $R_q = 594.8 \pm 183.5\, nm$, un valor más grande que el del lado facial, esto debido al tipo de muestra, en la Figura 6, se observan los poros dentarios los cuales presentan cierta profundidad y en análisis de las desviaciones cuadráticas de altura, tienen alta importancia el cálculo de la R_q.

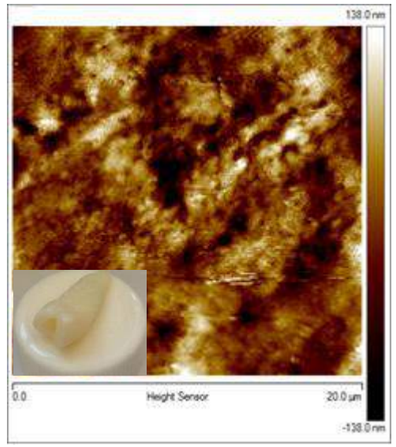


Figura 5. Imagen de AFM en esmalte del lado facial del diente sin recubrimiento. $R_q = 21.4 \pm 3.6\ nm.$

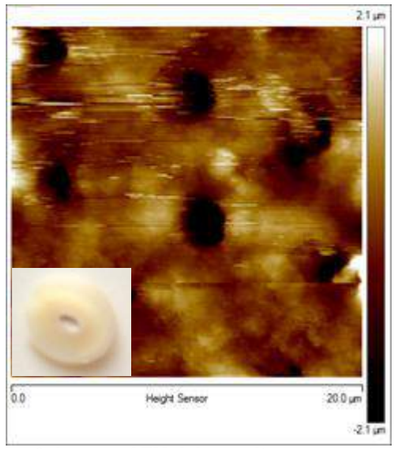


Figura 6. Imagen AFM del esmalte en un corte transversal del diente sin recubrimiento. $R_q = 594.8 \pm 183.5\ nm.$

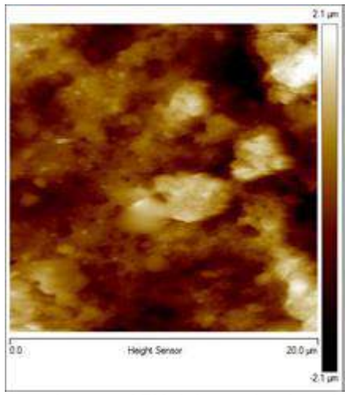


Figura 7. Imagen AFM del esmalte dental recubierto con OTS 4%(v/v) con un tiempo de silanización de 8 horas.

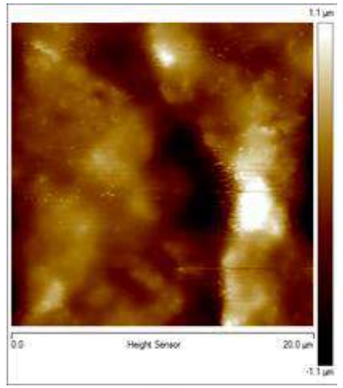


Figura 8. Imagen de AFM del esmalte dental recubierto con OTS 1%(v/v) con un tiempo de silanización de 8 horas.

Las Figuras 7 y 8, son imágenes AFM del esmalte silanizado, revelan características topográficas del polímero OTS, los cambio de la rugosidad se muestran en la Tabla 2. En el caso del OTS 1%-8h, $Rq = 351.3 \pm 121.7\ nm$, durante la exposición ácida la rugosidad aumenta proporcional al tiempo de exposición, lo cual indica la fijación de nano-estructuras de ácido cítrico sobre la superficie del diente, este fenómeno se presenta muy poco en el caso del recubierto con OTS 4%-8h, posiblemente debido a la alta concentración de OTS. Se evaluó de manera demostrativa el ángulo de contacto en los dientes y al igual que en el caso de la rugosidad, el ángulo aumenta después de la silanización y aún más después de la exposición al ácido cítrico.

Tabla 2. Valores R_q del análisis AFM del diente silanizado, después de la exposición acida.

Muestra	Condiciones	R_q (nm)
OTS 4% (v/v)-8h	Control	301.7 ± 89.8
24 h de exposición	pH=3	134.8 ± 46.9
	pH=5	268.0 ± 89.6
72 h de exposición	pH=3	230.1 ± 8
	pH=4	818.1 ± 221.4
	pH=5	167.7 ± 40.4
95 h de exposición	pH=3	160.5 ± 66.8
	pH=4	181.7 ± 55.8
	pH=5	451.1 ± 239.1
OTS 1% (v/v)-8h	Control	351.3 ± 121.7
24 h de exposición	pH=3	323.9 ± 128.5
	pH=5	101.7 ± 28.3
72 h de exposición	pH=3	270.1 ± 79.5
	pH=4	144.4 ± 28.4
	pH=5	340.5 ± 91.7
95 h de exposición	pH=3	483.2 ± 202.3
	pH=4	581.1 ± 233.3
	pH=5	259.1 ± 87.8

CONCLUSIONES

Se logró el recubrimiento de esmalte dental con OTS, confiriéndole la capacidad del repeler al agua de su superficie, protegiéndolo así de la erosión ácida. Con un tiempo de silanizado de 8 horas. Además se observó que a la concentración con OTS del 4% se logra un mejor silanizado del diente. Al exponer la superficie del diente silanizado al ácido cítrico se forman nano-estructuras con una topografía propia. Cabe resaltar que la exposición ácida del diente silanizado no desgasta la película de OTS. Finalmente, también se realizaron los mediciones evaluar que a un tiempo de exposición del diente silanizado al ácido por 95 h, la película se conserva.

BIBLIOGRAFÍA

PATIÑO HERRERA, R., GONZÁLES-ALATORRE, G., ESTRADA-BALTAZAR, A., ESCOTO CHAVÉZ, S. E., Y PÉREZ, E. (2015). Hydrophobic coating for prevention of dental enamel erosion. Surface and Coating Technology, 275, 148-154. http://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2015.05026.

SMITH, B. (1999). Infrared Spectral Interpretation: a systematic approach. Library of Congress Cataloging in Publication Data. 185-193.

RAMOS, E Y MARTIN, C. (1979). Problemas de determinación estructural orgánica por espectroscopia IR. Editado por Secretariado de Publicaciones de Universidad de Sevilla.

PICCOLI, R. F. (1998). Spectroscopic and chromatographic characterization of chemically modified silica sorbents (Order No. 9912157). Available from ProQuest Dissertations & Theses Global. (304415319). Retrieved from http://search.proquest.com/docview/304415319?accountid=151090.

KULKARNI S. MIRJI S. MANDALE A. VIJAYAMOHANAN K. (2006). Thermal stability of self-assembled octadecyltrichlorosilane monolayers on planar and curved silica surfaces.

BARRANCOS M. Y BARRANCOS. (2006).Operatoria Dental: Integración clínica. 4ª edición. Editorial Panamericana. 293.

TORRES, D., R., BORNHARDT, T., ITURRIAGA, V. (2005). Erosión dental y sus posibles factores de riesgo en los niños: revisión de la literatura. Revista Clinica de Periodoncia, IMplantologia y Reabilitación Oral. http://doi.org/10.1016/j.piro. 2015.09.02.
EUR J ORAL SCI (1996) Imfeld T. Dental erosion. Definition, classification and links. 104: 151-155.
TY - JOURTI - Diagnóstico y epidemiología de erosión dental PY -2011RP - IN FILESP - 179-189T2 - Revista de la Universidad Industrial de Santander. SaludVL - 43IS - 2SN - 0121-0807 UR - http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=343835702009ER
ZHAO N., WENG L., XIE Q., ZHANG X. AND XU J. (2006) A lotus-Leaf-Like Superhydrophobic Surface Prepared by Solvent-Induced Crystallization. Chem. Eur. J. of Chem. Phys., 7 (4) 824-827.

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL TÓXICO DE SUELOS DEL ESTADO SONORA

Ulises Antonio Alcaraz Nava[1] y José de Jesús Mejía Saavedra[2]

RESUMEN

La minería es una actividad económica de gran importancia en México, su importancia radica en beneficios como es la generación de empleos, de divisas, inversión extranjera, entre otros. Sin embargo hay un impacto ambiental en la que se efectúa la emisión de contaminantes como lo son los metales pesados. Como consecuencia ha modificado el intercambio natural de estos elementos al grado de incrementar sus concentraciones a niveles que pueden causar efectos adversos tanto a los seres humanos como a la biota en general. Debido a que el estado de Sonora presenta una gran riqueza mineral, posiblemente se presente contaminación con elementos con potencial tóxico generados por la actividad minera, por lo tanto el objetivo del presente trabajo fue evaluar la toxicidad de los suelos por medio de bioensayos toxicológicos.

ABSTRACT

Mining is an important economic activity in Mexico, its importance lies in benefits such as job creation, foreign exchange, foreign investment, among others. However there is an environmental impact on the emission of pollutants such as heavy metals is conducted. As a result it has changed the natural exchange of these elements to the degree of their concentrations increase to levels that cause adverse health effects. Because the state of Sonora has a great mineral wealth, possibly present contamination with potentially toxic elements generated by mining activity, therefore the objective of this study was to evaluate the toxicity of soils through toxicology bioassays.

Palabras clave: ensayo cometa, letalidad, toxicología ambiental, metales pesados.

INTRODUCCIÓN

México cuenta con una amplia riqueza de minerales en todo el territorio nacional, tanto en minerales metálicos como en no metálicos. El sector minero aporta entre el 1.17% y 1.5% al producto interno bruto nacional, mantiene un saldo positivo en la balanza de pagos y contribuye con el 1.5% al empleo nacional. De manera estimada la producción minera nacional representa el 2.4% de la producción minera mundial, México ocupa el 9º lugar en la producción minera mundial y el 4º lugar en la producción minera de Latinoamérica (Musik, 2009).

El estado de Sonora ha sido afectado a través del tiempo geológico por varios eventos tectónicos de gran importancia, los cuales conjuntamente con otras características geológicas ocasionaron que Sonora fuera un lugar privilegiado, con las condiciones necesarias para el emplazamiento de una gran variedad de

[1]Universidad Autónoma de Aguascalientes, Departamento de Bioquímica, Colonia Universidad, C.P 20100. Aguascalientes, Ags, boxt_uaan@hotmail.com.
[2]Centro de Investigación Aplicada en Ambiente y Salud, CIACYT-Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Av. Sierra Leona 550. Col Lomas 2ª. Sección, C.P. 78210, San Luis Potosí, SLP, jjesus@uaslp.com

depósitos minerales tanto metálicos como no metálicos. Por lo tanto, Sonora ha sido tradicionalmente considerado como un estado minero de gran importancia, con una amplia gama de recursos en éste renglón. Entre los minerales metálicos, se tienen los principales yacimientos de cobre, molibdeno y oro del país, mientras que entre los minerales no metálicos están los yacimientos más importantes de grafito, wollastonita y barita ocupando desde hace muchos años el primer lugar dentro de los principales estados mineros productores, debido principalmente a la explotación de las dos minas más grandes del país: Cananea y La Caridad (http://www.sgm.gob.mx/pdfs/SONORA.pdf).

MARCO TEÓRICO

El impacto ambiental que genera la actividad minera tiene que ver en principio con la modificación que se lleva a cabo sobre los ecosistemas donde se ubican las explotaciones mineras, y las consecuencias que esto puede tener sobre el medio físico y la biodiversidad, además de la agresión física al medio, un aspecto de gran relevancia es la contaminación de carácter químico sobre el suelo y cuerpos de agua y sobre la salud humana que significan los procesos de extracción (Zavala. 2001).

Los bioensayos son herramientas ampliamente utilizadas en el campo de la ecotoxicología, la cual se ocupa del estudio del efecto y destino de los agentes tóxicos de origen antropogénico a los ecosistemas acuícolas y terrestres (Larrain, 1995). Las pruebas de toxicidad son una herramienta importante en la evaluación de la toxicidad de los contaminantes presentes, de manera individual o formando mezclas, en matrices ambientales como suelo, agua y sedimentos (Mejía-Saavedra et al., 2005). En los bioensayos de toxicidad se exponen a los organismos de prueba a las matrices contaminadas simulando un escenario de exposición real, posteriormente a un tiempo de incubación se mide una respuesta biológica ecológicamente relevante y fácil de estandarizar (Nikunen & Miettinen, 1985).

La lombriz de tierra es utilizada ampliamente como un organismo bioindicador pues permite identificar la presencia de estresores ambientales. La lombriz de tierra Eisenia andrei es un organismo muy sensible a los cambios del ambiente en que habitan, son de fácil manejo en condiciones de laboratorio, no ocupan mucho espacio, su tiempo de respuesta a estresores ambientales y su ciclo de vida son cortos

METODOLOGÍA

El estudio consistió en realizar bioensayos en los cuales se evaluó la supervivencia y la genotoxicidad, para ello, se colectaron 10 muestras de suelo en sitios con diferentes características; uno con actividad minera (sitio problema); un sitio sin actividad minera pero con enriquecimiento natural de minerales (referencia positiva); y un sitio sin actividad minera y sin enriquecimiento natural (referencia negativa). Conjuntamente con las muestras, se procesó un control negativo para validar el método y los organismos de prueba, como organismo de prueba se utilizó a la especie de lombriz de tierra *Eisenia andrei*.

El bioensayo de letalidad se realizó con base en lo descrito en la guía 207 de la OECD para la evaluación de sustancias (OCDE, 1984). Se expuso a 10 lombrices de tierra (*Eisenia andrei*) a muestras de suelo de las tres sitios y un control negativo de laboratorio. El ensayo tuvo una duración de 14 días, al final del tiempo se determinó la letalidad. También se evaluó el daño al ADN mediante el ensayo cometa, para ello se siguió la metodología propuesta por González-Mille et al., (2012). Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

RESULTADOS

En el bioensayo de letalidad se registraron los siguientes porcentajes de sobrevivencia: Referencia (–) 98.9%, Control (-) 97.3 %, Problema 92. 3 % y el Referencia (+) 88.8% (Figura 1). Es importante mencionar que el bioensayo es válido si el control negativo no presenta letalidad mayor del 10%, desde este punto de vista el bioensayo fue valido pues el control negativo registró una letalidad menor al 3%. De acurdo a los resultados obtenidos se puede observar que el sitio Problema no presenta toxicidad pues la letalidad registrada no fue mayor del 10%. El único sitio que registró letalidad superior al 10% fue el Referencia positiva, aunque fue muy leve, por lo que es necesario mantener vigilancia en el sitio, sin embargo el efecto es debido a un enriquecimiento natural por lo que difícilmente se podría hacer una intervención en dicho sitio.

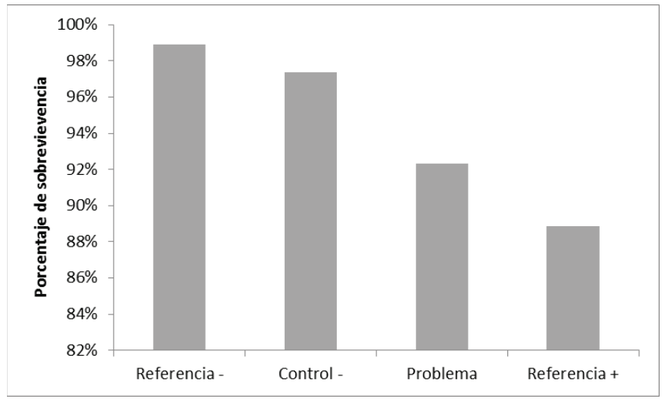


Figura 1. Porcentaje de sobrevivencia en los sitios de estudio

Ensayo cometa: desafortunadamente los resultados obtenidos en este ensayo no fueron satisfactorios, probablemente debido a la falta de experiencia y al poco tiempo de capacitación no se logró realizar la técnica de manera adecuada. Esto fue evidente al momento de observar las laminillas al microscopio de fluorescencia, donde se pudo apreciar que la técnica fue mal hecha, Por consiguiente no se contó con un resultado para reportar. Sin embargo se aprendió el uso del microscopio y la determinación de los parámetros necesarios para evaluar el daño al ADN por esta técnica. Como se observa en la siguiente tabla, realicé la determinación de los parámetros de evaluación Olive Tail Moment y Tail Length, en laminillas de una misma muestra realizadas en el laboratorio. Es evidente la variación en el resultado, lo cual habla de la falta de experiencia en el manejo de este tipo de equipos.

Tabla 1. Lecturas de la referencia (-) del ensayo cometa en 7 laminillas

Laminilla	OliveTail Moment	Tail Length
01	2,07	5.04
02	1.54	5,65
03	1.24	4.60

04	1.23	4.37
05	1.81	6.24
06	1.82	6.44
07	0.93	3.93
Promedio	1.52	5.18

DISCUSIÓN

De acurdo a los resultados obtenidos se puede observar que el sitio Problema no presenta toxicidad pues la letalidad registrada no fue mayor del 10%. El único sitio que registró letalidad superior al 10% fue el Referencia positiva, aunque fue muy leve, por lo que es necesario mantener vigilancia en el sitio, sin embargo el efecto es debido a un enriquecimiento natural por lo que difícilmente se podría hacer una intervención en dicho sitio.

Se realizó el ensayo cometa para los mismos sitios, por posible mal manejo de reactivos o mal procedimiento del desarrollo de la técnica no se tuvieron resultados satisfactorios para el sitio problema ya que las laminillas no pudieron ser leídas en el microscopio.

CONCLUSIÓN

En el ensayo de letalidad de la muestra problema, la cual se consideraba como posible muestra de contaminación por metales pesados, se obtuvo una letalidad menor al 10%, lo que nos habla que por el momento la presencia de metales con potencial toxico no se encuentran de forma biodisponible o bien que no alcanzan el umbral de toxicidad para causar efecto en los organismos invertebrados.

En lo que respecta al ensayo cometa, prueba para evaluar la genotoxicidad, puedo concluir que es una técnica relativamente sencilla pero que requiere de capacitación y experiencia para lograr resultados satisfactorios y veraces.

BIBLIOGRAFÍA

Azqueta A., Collins A., 2013. The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair, s00204-013-1070-0

Burlinson B, Tice R., Speit G, Agurell E, Brendler-Schwaab Y., COLLINS A. (2007): Fourth international workgroup on genotoxicity testing: results of the in vivo

Comet assay workgroup. Mutation Research, 627: 31–35.

Colgan A., Hankard P., Spurgeon D., Svendsen C., Wadsworth R, Weeks J. (2003): Closing the loop: a spatial analysis to link observed environmental damage to predicted heavy metal emissions. Environmental Toxicology and Chemistry, 22: 970–976.

Gonzáles M., Espinoza R., Ilizaliturri, C., Saavedra M., Jasso P., Díaz B. (2012). Ensayo cometa en fauna terrestre Métodos ecotoxicológicos para la evaluación de suelos contaminados con hidrocarburos. Universidad de Veracruz: SEMARNAT-INE.

Kaplan, D., Hartenstein, R., Neuhauser,F., Maleckit, M. 1980. Physicochemical requirements in the environment of the earthworm Eiseniafoetida. Soil Biology and Biochemistry. 12, 347-352Audronë MATUSEVIÈIÛTË, I. E. (2005). EFFECTS OF DIFFERENT CADMIUM CONCENTRATIONS ON SURVIVAL, REPRODUCTION AND ADAPTATION OF EISENIA FETIDA CALIFORNICA. Acta zoologica Lituanica*, 15*(1392-1657), 361-369.

Matusevièiûtë A. (2005). Effects of different cadmium concentrations on survival, reproduction and adaptation of *eisenia fetida californica*. Acta zoologica lituanica, 15(1392-1657), 361-369.

Mejía-Saavedra J., S. Sánchez-Armass, G. Santos-Medrano, R. González-Amaro, I. Razo-Soto, R. Rico-Martínez, & F. DiazBarriga, 2005. Effect of Co-exposure to ddt and Manganese on Freshwater Invertebrates: Pore Water from Contaminated Rivers and Laboratory Studies. Environmental Toxicology and Chemistry, 24(8):2037-2044.

Musik A. 2004. El sector minero en México; diagnóstico, prospectiva y estrategia. Centro de Estudios de Competitividad del ITAM. México. Pág 1.

Nikunen E., & V. Miettinen, 1985. Daphnia magna as indicator of acute toxicity of waste water. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 35:368-374

Palafox A., Hérnandéz R., López L., Cuevas D. 2012. Evaluación de la toxicidad de los suelos mediante bioensayos con lombrices. ISBN: 978-607-790-862-3. Pág 12.

Servicio Geológico Mexicano [http://www.sgm.gob.mx/pdfs/SONORA.pdf visitado 1 agosto de 2016]

Tice R, Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., KobayashI K. (2000): Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. Environmental and Molecular Mutagenesis, 35: 206 – 221.

Zavala A. 2001. Implicaciones ambientales y sociales de la mineria en Baja California: La minería San Felipe, en Sonora cuatro siglos de minería. Tomo II. Virgilio López y Cesar Quijada (Ed). Pág. 23-34.

INVENTARIO DE LA MASTOFAUNA DEL CERRO DEL VEINTE, MUNICIPIO DE IRAPUATO, GUANAJUATO

Gabriela Almanza García[1] y Efrén Martín Hernández Navarro[2]

RESUMEN

El conocimiento de la mastofauna en Guanajuato es de suma importancia ya que puede usar como herramienta para determinar el grado de perturbación del hábitat. Este tipo de estudios son escasos en Guanajuato y se necesita una revisión de los mismos. El presente estudio contribuye al conocimiento actual de los mamíferos presentes en el Cerro del Veinte, Irapuato, Guanajuato. Se desarrolló un estudio prospectivo usando trampeo de animales vivos, avistamientos directos y entrevistas a la gente del lugar en julio den2016. Se registró un total de 19 especies incluidas en 13 familias y cinco órdenes. Dos especies de murciélagos registradas en este estudio están consideradas como Amenazadas dentro de la legislación ambiental mexicana. Este estudio puede ser considerado como parte de estrategias de conservación de la fauna silvestre en la región del Bajío.

Palabras clave: Mamíferos, Guanajuato, Cerro del Veinte.

ABSTRACT

Knowledge about mammals of Guanajuato is very important because it can be used as a tool to determine habitat perturbation. Those studies are scarse in Guanajuato and needed for review. This study contributes to the current knowledge of the mammals present on Cerro del Veinte, Irapuato, Guanajuato. A prospective survey was developed based on live-trapping, direct sightings, and interviews to local people in july 2016. A total of 19 species were recorded for Cerro del Veinte, included on 13 families and five orders. Two bat species recorded in this study are listed as Endangered in the Mexican ambiental laws. This study could be used as part of strategies for conservation of wildlife in the Bajío region.

Keywords: Mammals, Guanajuato, Cerro del Venite.

INTRODUCCION

México es uno de los países con mayor diversidad de mamíferos y ocupa el tercer lugar en número de especies a nivel mundial (Ceballos y Oliva, 2005). Esto se debe a la combinación de las variaciones topográficas y geológicas que presenta, así como los diversos climas y microclimas que se encuentran en todo el territorio (Espinosa *et al.,* 2008). Se han registrado alrededor de 564 especies de las cuales 29% son endémicas al país (Ceballos y Arroyo-Cabrales, 2012; Sánchez-Cordero *et al.,* 2014) en Guanajuato se han reportado alrededor de 118 especies (Sánchez-Cordero *et al.,* 2014), que representan 16.6% de la diversidad nacional y 1.6% de la mundial (Ceballos y Arroyo-Cabrales, 2012). El estudio de mamíferos

[1]Instituto Tecnológico Superior de Irapuato. Carretera Irapuato-Silao km 12.5, Col. El Copal C.P. 36821 Irapuato, Guanajuato. almanza95.g@gmail.com
[2]Instituto Tecnológico Superior de Irapuato. Carretera Irapuato-Silao km 12.5, Col. El Copal C.P. 36821 Irapuato, Guanajuato efhernandez@itesi.edu.mx

es de gran importancia ya que son organismos que nos permite observar el grado de conservación de un ecosistema esto gracias a la alta sensibilidad que presentan en los lugares impactados por el hombre (Gittleman *et al.*, 2001). Este grupo de vertebrados beneficia en varios procesos de los ecosistema en que participan ya que actúan como dispersores, depredadores y presas (Bodin *et al.,*2006; Boddicker *et al.,*2001).con estudios recientes se puede dar una idea de los territorios silvestres que presenta el estado de Guanajuato con el fin de la conservación y prevalencia de mamíferos (Sánchez y Elizalde-Arellano *et al.,* 2012). El presente estudio tiene como objetivo la realización de un inventario de la mastofauna del cerro del Veinte en el municipio de Irapuato y con ello aportar más documentación para la región.

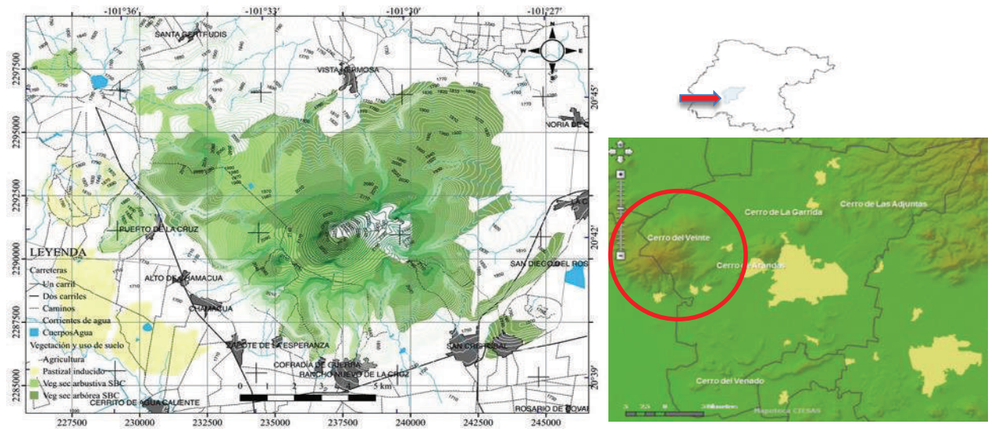


Figura 1. Mapa del área de estudio del Cerro del Veinte del municipio de Irapuato, Guanajuato.

MATERIALES Y METODO

Área de estudio. El Cerro del Veinte se encuentra entre los municipios de Abasolo e Irapuato, aproximadamente a 11 km al Oeste de la ciudad de Irapuato. Presenta una superficie aproximada de 84 km^2 con una elevación máxima superior a los 2,200 msnm. El tipo principal de vegetación en el sitio corresponde a la selva baja caducifolia (Rzedowski, 1978). El tipo de clima es que presenta es semicálido subhúmedo con un régimen de lluvias en verano, con una temperatura media anual entre 12°C y 18°C (CONABIO, 2012).

Listado potencial de mamíferos en la región. Para obtener un listado preliminar de las posibles especies de mamíferos que se pudieran localizar en la región, se realizó una revisión bibliográfica y se obtuvo la presencia *de Didelphis virginiana ,Urocyon cinereoargenteus, Canis lantrans, Procyon lotor ,mephithis macroura ,Spirogali gracilis*, roedores, *Peromyscus ,diphisilis sp, Peromyscus melanophris ,Peromyscus maniculatus, Peromyscus pectoralis,Peromyscus melanotis .Reithrodontomys fulvescens, Liomys irruratus,Baiomys taylori, Sigmodon,fuelviventer, Neotoma leucodon.(*Sánchez , 2014;Uriarte-Garzón y Lozoya-Gloria 2009 y Arellano- Elizalde, *et al.,* 2012)

Registros de mamíferos en el área de estudio. Se realizaron dos visitas al área de estudio de cuatro días, del 19 de julio al 22 de julio del 2016 y del 26 de julio al 29 de julio del 2006. Para la captura de mamíferos pequeños se utilizó 75 trampas Sherman por salida cebadas con avena, vainilla y crema de

cacahuate en trayectos lineales de 38 y 37 trampas con 5 m de separación entre cada una, los trayectos se colocaron con una distancia de 50m uno del otro (Gallina-Tessaro y López-González, 2014). A los mamíferos capturados en las trampas Sherman se les tomaron las medidas somáticas convencionales y se procedió a la determinación de especies de acuerdo con literatura especiada (Hall, 1981). Para el registro de mamíferos medianos se colocaron tres cámaras y estaciones olfativas cebadas con sardina y se realizaron caminatas diurnas para observación de mamíferos, por medio de huellas y excretas (Aranda-Sánchez, 2012). Para la captura de murciélagos se colocaron redes de niebla cerca de cuerpo de agua durante la noche, a los individuos capturados se les tomaron las medidas somáticas convencionales y se determinó la especie de acuerdo a lo propuesto por Medellín *et al.* (2007). Por último se realizaron encuestas las personas de la comunidad para determinar que mamíferos se distribuyen en el sitio.

RESULTADOS

En el presente estudio se registró un total de 19 especies correspondientes a 13 familias y 5 órdenes , como se muestra en el siguiente (Cuadro 1) se realizaron registros (directos e indirectos) en las dos salidas que se realizaron en el mes de julio, es importante mencionar la diferencia de que se en las vegetación presentes en cada uno de los sitio, ya que en la cañada del salto se observaron algunos parches con vegetación un poco más perturbada en un distancias cortas del mismo sitio , en cambio en el sitio la escondida se observó una vegetación más arbustiva pero también determino que era un lugar más transitado por ganado esto con frecuencia debido a la observación del animal en caminatas diurnas y por rastro de huellas. También observamos una mayor cantidad de captura de mamíferos pequeños en sitios más cercanos a zonas de agricultura y un poco más apegados a las áreas urbanas. Así como también registramos dos especies de murciélagos de importancia en conservación *Leptonycteris yerbabuenae y Choeronycteris mexicana* debido a que son especies que se localizan en la categoría de riesgo por la NOM-059SEMARNAT 2010.

Cuadro 1. Especies registradas para el Cerro del Veinte. Tipo de registro: Entrevistas (EN), avistamiento (AV), Captura (CA), Huella (H) y Excreta (EX). Categorías de protección y riesgo de la IUCN: LC: Preocupación menor, VU: Vulnerable, NT: Casí amenazado. NOM-059-SEMARNAT-2010) A: Amenazado.

Orden	Familia	Especie	Nombre común	Número de registro	Tipo de registro	Categoría riesgo (IUCN)	Categoría de riesgo(NOM-059-SEMARNAT-2010)
Didelphimorphia	Didelphidae	*Didelphis virginiana*	Tlacuache	10	EN	LC	
Lagomorpha	Leoporidae	*Sylvilagus floridanus*	Conejo castellano	10	EN	LC	
Rodentia	Sciuridae	*Sciurus aureogaster*	Ardilla gris	10	EN, AV	LC	
Rodentia	Sciuridae	*Otospermophilus variegatus*	Ardilla de roca	1	CA	LC	
Rodentia	Cricetidae	*Peromyscus sp.*	Ratón	1	CA		
Rodentia	Cricetidae	*Reithrodontomys fulvencens*	Ratón	2	CA		
Rodentia	Cricetidae	*Baiomys taylori*	Ratón	1	CA	LC	
Rodentia	Heteromydae	*Liomys irruratus*	Rata de campo	2	CA	LC	
Chiroptera	Phyllostomidae	*Choeronycteris mexicana*	Murciélago	3	CA	NT	A
Chiroptera	Phyllostomidae	*Leptonycteris yerbabuenae*	Murciélago	1	CA	VU	A
Chiroptera	Vespertionilidae	*Eptesicus fuscus*	Murciélago	3	CA	LC	
Chiroptera	Vespertionilidae	*Parastrellus subflavus*	Murciélago	3	CA		
Carnivora	Canidae	*Urocyon cinereoargenteus*	Zorra gris	13	AV,H, EN.	LC	
Carnivora	Canidae	*Canis lantrans*	Coyote	14	AV, H, EN	LC	
Carnivora	Mephitidae	*Spilogale angustifrons*	Zorrillo manchado	3	H, EN	LC	
Carnivora	Mephitidae	*Mephitis macroura*	Zorrillo rayado	12	EN	LC	
Carnivora	Procyonidae	*Procyon lotor*	Mapache	7	EN	LC	
Carnivora	Procyonidae	*Bassaricus sumichrasti*	Cacomixtle	2	EN	LC	
Carnivora	Mustelidae	*Mustela frenata*	Comadreja	3	EN	LC	

DISCUSIÓN

En Guanajuato se tienen registrado alrededor de 118 especies de mamíferos de acuerdo con Sánchez-Cordero *et al*. (2014), De los cuales Irapuato guarda un l7% en el ANP Cerro de Arandas Escobedo-Morales *et al.,* (2015).En el presente estudio se registraron un total de 19 especies los orden con mayor número de especies fueron Carnívora (7), seguido de rodentia (6), Chiroptera (4) y los ordene Didelphimorphia y Lagomorfa con (1) comparando con Pedro Uriarte y Edmundo Lozoya, (2009) registrando 17 especies entre ellas mamíferos no voladores. Así mismo es importante destacarlos ya que presenta las ares de estudio coinciden en vegetación y clima gracias a que son regiones adyacentes al Cerro del Veinte otras aportaciones que se dan a conocer en el presente estudio es el registro de dos especies de gran importancia de acuerdo con Sánchez *et al.,* (2012); Sánchez, (2014). Ya que se caracterizan por ser especies de importancia en conservación, debido a que se encuentran enlistadas en alguna categoría de riesgo: *Choeronycteris mexicana y Leptonicteris yerbabuenae*, Ambas especies se consideran como amenazadas por la NOM-059-SEMARNAT-2010 (SEMARNAT 2010).Por ello Bodin *et al.* (2006) sugieren la urgente necesidad de apoyar y conocer la diversidad que albergan los hábitats de tamaño reducido ó cercano a la periferia en áreas urbanas y así descubrir las relaciones y mantenimiento de las áreas.

CONCLUSIONES

Es importante resaltar la realización de más estudios sobre la diversidad de mamíferos silvestres en Guanajuato y en regiones similares al Cerro del Veinte, así como en zonas adyacentes ya que pueden ser reservorio de especies endémicas analizar los cambios que se pudieran darse o que tengan un gran impacto en el ecosistema en el que se están desarrollando, en particular creo necesario el apoyo

AGRADECIMIENTOS

Al comité organizador del 18° Verano Regional de la Ciencia Región Centro por la beca otorgada, al Instituto Tecnológico Superior de Irapuato por el apoyo logístico, al M en C. Luis A. Escobedo Morales

(ITESI) por la revisión de una versión previa del escrito, a mis compañeros de campo y a la comunidad de Cuchicuato por su permitió desarrollar el proyecto.

BIBLIOGRAFIA

Aranda-Sánchez, J.M. (2012). Manual para el Rastreo de Mamíferos Silvestres de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (Conabio), México, D.F.

Arita, H.T. (1993). Conservation biology of the cave bats of México. Journal of Mammalogy 74:693-70

Bodin,O.M., Tengo, A., N.J. Lunberg y T.E. Mavivis. (2006). The value of small size loss of forest patches and ecological thesholds in southern Madagascar. Ecological Application16:445-450.

Boddicker M.; Rodríguez ,J y Amanzo,J. (2001). Assessment of the large mammals of the lower Urubamba region, Peru. En: Alonzo A. D. Dollmeier y P. Campbell, eds. Urubamba: The Biodiversity of peruvian rain forest. SI/MAB Series 7. Pp. 183 – 193.

Ceballos, G y Oliva, G. (2005). Los Mamíferos Silvestres de México, Conabio México, DF- UNAM.986 pág.

Ceballos, G y Arroyo-Cabrales, J. (2012).Listado actualizado de los mamíferos de México . Revista Mexicana de Mastozoología nueva época. Núm.1.27-80.

Comision Nacional Para El Conocimiento Y Uso De La Biodiversidad. México 2012.

Espinosa (2008). Espinosa, D., S. Ocegueda et al. 2008. El conocimiento biogeográfico de las especies y su regionalización natural, en Capital natural de México, vol. I : Conocimiento actual de la biodiversidad. -

Escobedo-Morales, L.A, Hernández-Navarro, E.M y Leyte-Manrique ,A. (2015). Inventario de los Vertebrados Terrestres del Área Natural Protegida Cerro de Arandas, Reporte final, Irapuato, Guanajuato. IMPLAN e I, Irapuato Guanajuato , México.

Gallina-Tessaro, S y Lopez-Gonzalez , C. (2014). Manual de Técnicas para el Estudio de Fauna. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto de Ecología y Cambio Climático, Instituto de ecología, A.C. y Universidad Autónoma de Querétaro, México, D.F.

Gittleman, J .L., Funk, S.M,Macdonal, D.W y Wayne, R.K. (2001). Carnivore conservation (eds). Cambridge University Press United kingdom. 675pp.

Hall, E. R. (1981). The Mammals of North America. Second ed. John Wiley and Sons, New York, E.U.

López-Jimenez,L.N, Martinez Diaz de Salas. M. (2009). Estudio Florístico y de la Vegetación del Cerro de Arandas en Irapuato, Guanajuato. División de Ciencias de la Vida y Facultad de Ciencias Naturales Universidad Autónoma de Querétaro.

Medellín, R.A, Arita, H.T, Sánchez.O ,(2007). Identificación de los Murciélagos de México. Instituto de Ecología, UNAM, México, D.F.

Miranda, A. (2002). Diversidad, historia natural, ecología y conservación de los mamíferos de Chamela. Pp. 359-377 in Historia Natural de Chamela (Noguera, F. A., J. H. Vera Rivera, A. N. García-Aldrete, y M. Quesada-Avendaño, eds.). Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México, Distrito Federal.

Rzedowski, J. (1978). Vegetación de México. México, D.F.: Limusa.

Sanchez, O., Magaña-Cota, G., Téllez- Girón, G., López-Forment, W., Urbano Vidales, G. (2014). Mamíferos no voladores de Guanajuato, México: revisión histórica y lista taxonómica actualizada Acta Universitaria, 24(1), 3-37

Sánchez, Ó., Elizalde-Arellano, C., López-Vidal, J. C., Magaña-Cota, G., Téllez-Girón, G., Botello, F., y Sánchez-Cordero, V. (2012). Mamíferos Silvestres, pp. 263-274, en Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (Ed.). *La Biodiversidad en Guanajuato: Estudio de Estado vol. II.* Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (Conabio)/Instituto de Ecología del Estado de Guanajuato (IEE).

Sánchez-Cordero, V., Botello, F., Flores-Martínez, J. J., Gómez-Rodríguez, R. A., Guevara, L., Gutiérrez-Granados, G., y Rodríguez-Moreno, Á. 2014. Biodiversidad de Chordata (Mammalia) en México. Revista Mexicana de Biodiversidad, Supl 85: S496–S504.

Sánchez, O. 2014. Sinopsis de los mamíferos silvestres del estado del Guanajuato, México, y comentarios sobre la Conservación. Therya 5: 369-442.

SEMARNAT (2010).Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-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,Ciudad de México, México.

GENERACIÓN DE MUTANTES EN EL HONGO PATÓGENO *Sporothrix schenckii*

Patricia Elizabeth Alvarez Ortiz[1] y Héctor Manuel Mora Montes[2]

RESUMEN

La esporotricosis es una infección de tipo micótica causada por el hongo *Sporothrix schenckii,* y en los últimos años se ha reportado un aumento en su incidencia. Para poder desarrollar nuevas alternativas de tratamiento se deben estudiar a fondo las características estructurales y su relación con los efectos patógenos del hongo. En el siguiente reporte se describe el trabajo experimental para implementar, de la mano de la ingeniería genética, el silenciamiento de un gen que codifica para una proteína clave en la virulencia del hongo. El gen se amplificó por PCR y posteriormente fue ligado en el vector de mantenimiento pJet. Sin embargo no se pudo comprobar la presencia del inserto mediante digestiones con enzimas de restricción.

ABSTRACT

Sporotrichosis is a fungal infection caused by the fungus *Sporothrix schenckii* and in recent years it has been reported an increase in its incidence. In order to develop new alternatives of treatment should be studied in depth the structural characteristics and their relation to the pathogenic effects of the fungus. The following report describes the experimental work to implement, with the helo of the genetic engineering, the silencing of a gene that encodes a key protein in the virulence of the fungus. The gene was amplified by PCR and was subsequently linked in the vector pJet. However it was not possible to verify the presence of the insert by restriction enzyme digestions

INTRODUCCIÓN

Sporothrix schenckii es el agente etiológico de la esporotricosis, una micosis subcutánea endémica en América Latina. Las proteínas presentes en la pared celular de *S. schenckii* así como de algunos hongos semejantes, se relacionan con la patogenicidad del hongo debido a que inducen respuestas inmunes anómalas. Para investigar más a fondo los efectos de la ramnosa presente en su pared, se realizaron en el presente proyecto estudios sobre el posible gen que codifica para la ramnotransferasa, buscando el silenciamiento del gen, denominado como 06451. En un trabajo previo fue realizada la extracción de ADN de S. *schenckii* y la región de interés fue flanqueada por iniciadores diseñados específicamente para el gen a analizar. El fragmento amplificado se insertó en pSilent, un vector de silenciamiento que contiene una secuencia intrónica que se incorpora al fragmento insertado. Después el inserto debe ligarse al vector de mantenimiento pJet, para posteriormente ser ligado en pBgGHg y así transformar a *Agrobacerium* y desde ahí inducir la mutación en el hongo.

MARCO TEÓRICO

Sporothrix schenckii es un hongo dimorfo, patógeno humano cercano a los hongos filamentosos y patógenos de las plantas habituales . Es el agente causal de la esporotricosis cutánea y la infección micótica linfática. Un incremento en los casos de esporotricosis ha sido reportado en muchas partes del mundo, incluso en algunas localidades ha alcanzado proporciones epidémicas. (1)Se considera que este hongo tiene

[1] Universidad Autónoma de Coahuila, Facultad de Ciencias Químicas, Blvd. Venustiano Carranza s/n, Col. República Oriente, CP 25280, Saltillo, Coahuila, portiz@uadec.edu.mx
[2] Universidad de Guanajuato, División de Ciencias Naturales y Exactas, Departamento de Biología, Noria Alta s/n, Col. Noria Alta, CP 36050, Guanajuato, Gto. , hmora@ugto.mx

una distribución cosmopolita, sin embargo la incidencia de la frecuencia de la enfermedad varía dependiendo de la región. En México, los estados con mayor frecuencia son Guanajuato, Jalisco y Puebla. (2)Las proteínas de la pared celular, inducen respuestas de inmunidad celular y humoral, y son candidatas potenciales tanto para objetivos diagnósticos como para la generación de vacunas en la prevención de las infecciones fúngicas.(3)Uno de los componentes más estudiados es un péptido-polisacárido conocido como péptido-ramnomanoso, que es un complejo molecular glicoconjugado compuesto en un 33.5% de ramnosa. Dicho péptido está involucrado en la respuesta anti-inflamatoria disminuyendo la producción de IL-1β . (4)La liberación de la ramnosa está catalizada por las ramnosidasas. Las ramnosidasas son candidatos prometedores en los campos de alimentos, cosméticos, agricultura y salud, teniendo una variedad de usos como la biotransformación de antibióticos, flavonoides, esteroides y la producción de ramnosa. (5)Recientemente las α-l-rhamnosidasas han sido utilizadas por sus propiedades antiinflamatorias y antivirales. (6)

MATERIALES Y METODOS

PCR a plásmidos con la secuencia de interés

La amplificación del inserto de interés se llevó a cabo a partir de DNA plasmídico exraído de células competentes de *Escherichia coli* DH5α. La reacción se efectuó con 1µl de Ptrpc (oligonucleótido forward) y 1µl de Ttrpc (oligonucleótido reversa) 1µl de dNTPs, 0.2 µl de enzima Dream taq pol, 2µl de buffer para la enzima y se aforó con agua mili Q para llegar a un volumen de 19 µl. El procedimiento se hizo para 3 diferentes tubos. Se repartió el contenido de cada tubo en 4 volúmenes iguales (~4.5 µl) para así disponer finalmente de 12 tubos y a cada uno de ellos se le añadió 0.5 µl de una clona diferente de plásmido pSilent que contiene la secuencia de interés. Las condiciones del termociclador se programaron en: 94°C /5 min. 94°C /30s 60°C /30s 72°C /3 min 72°C /7 min * 30 ciclos. Duración aproximada 2hrs 57min.

Electroforésis al producto de PCR

Cada muestra fue cargada con 1 µl de regulador amortiguador de Naranja en un gel de agarosa al 0.8% colocado en una cámara electroforética. Después de que el colorante indicó que la muestra había migrado lo conveniente se examinó con luz ultravioleta en el Molecular Imager ChemiDoc XRS System de Biorad.

PCR a la clona 12 del vector pSilent

Se añadieron los reactivos necesarios anteriormente descritos para realizar 8 volúmenes de la reacción de 5µl ésta vez, solamente con la clona positiva 12.

Purificación del gel de agarosa

Se corta del gel de agarosa la banda de interés y se pone en un tubo eppendorf. Se añaden los reactivos del UltraClean® 15 DNA Purification Kit siguiendo el protocolo de centrifugación para finalmente obtener los eluídos.

Ligación del gen en pJet

Una vez obtenido el fragmento de ~2800bp , se ligó al vector pJet poniendo 8µl del eluído, 10µl de buffer de reacción y 1µl de enzima DNA blunting. Después se elevó la temperatura a 70° por 5 minutos para luego añadir 1µl del vector pJet y 1µl de ligasa y dejarlos a temperatura ambiente por 2 horas.

Transformación de células de *E. coli* químicamente competentes

Se colectan 3 alícuotas de 20µl cada una de células competentes de *E.coli* DH5α. Una se utiliza para incorporar el producto de la ligación y las otras dos como controles. Se le añaden 200µl de medio LB para finalmente sembrar el contenido de cada tubo en placas de LB+ampi.

Extracción de plásmidos

Fueron seleccionadas 24 transformantes de la placa para ser incubadas en 2µl de medio líquido LB+ampi a 37°C por 24 horas con agitación vigorosa para posteriormente trabajar con cada muestra. Pasado el tiempo se centrifugaron en una microcentrífuga eppendorf para obtener el pellet de bacterias. Se añadió la solución de TENS y de Acetato de Sodio y volvió a centrifugarse. Luego se recuperó el sobrenadante para su lavado con etanol. Finalmente se resuspendió en 30µl de agua. (7) (8).

Digestión de plásmidos

- Enzima Bgl II
  Se hizo la prueba con 2 µl de cada plásmido, 0.5 µl de enzima y 1 µl de buffer y se aforó a un volumen final de 10 µl y se dispuso a 37°C por 3 hrs.
- Digestión doble: Enzima Sac I
  Se realizó el ensayo con 3 diferentes clonas que dieron positivas en la amplificación de la secuencia sentido y antisentido por PCR hecha previamente a 10 clonas.
  Se preparó una reacción con cantidades iguales a la digestión con Bgl II y en condiciones similares. Al concluir el tiempo de reacción se precipitó el DNA con soluciones de PEG y TE y se descartó por pipeta el sobrenadante para luego resuspender en 10 µl de agua.

- Digestión doble: Enzima PstI
  Al producto de la primera digestión con SacI se adicionó 0.5 µl de enzima PstI y 1 µl de buffer de reacción.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

La PCR de las clonas de pSilent se realizó con promotores y terminadores específicos para amplificar la región de 2800bp que contenía la secuencia sentido, la secuencia antisentido, una secuencia intrónica y el gen de interés. De las 12 clonas que fueron analizadas 9 dieron un patrón electroforético similar. La clona 12 fue seleccionada debido a que apareció una banda más gruesa que en las demás clonas.

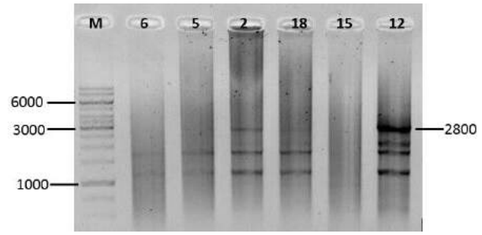


Fig. 1 Electroforesis del producto de PCR. La columna número 6 muestra la clona 12 del vector pSilent en donde la banda en 2800bp es mayor. Cada número de la columna representa a una clona distinta.

Una vez purificado el producto de PCR se realizó la ligación en el vector de clonación pJET 1.2/blunt lo que aseguró el mantenimiento del inserto que fue previamente tratado con la enzima DNA blunting para generar extremos romo. El vector pJET contiene un gen que codifica para una enzima de restricción letal que se interrumpe por la ligadura de una inserción de DNA en el sitio de clonación, lo cual garantiza que una vez realizada la transformación de E. coli solamente las células bacterianas con plásmidos recombinantes sean capaces de formar colonias. El vector contiene un gen de resistencia a la ampicilina por lo que las células transformadas de *E. coli* son sembradas en un medio LB suplementado con ampicilina. (9).

Las colonias seleccionadas para la extracción del plásmido dieron un patrón electroforético distinto.

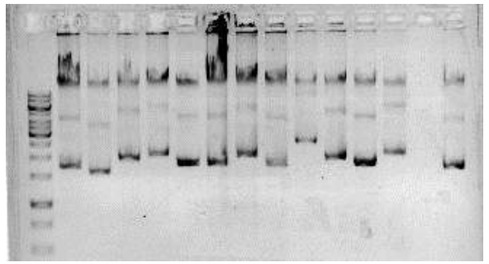


Fig. 2 Electroforesis de la extracción de plásmidos de las transformantes de E. coli

Por lo que 17 clonas son seleccionadas para hacer la digestión con Bgl II que arroja una banda de ~2970bp lo que determina que el vector fue cortado en los lugares de reconocimiento de la enzima. Pese a esto, no se logran visualizar las otras dos bandas que deberían aparecer, pues el inserto tiene también un sitio Bgl II, y en total se esperaban tres bandas.

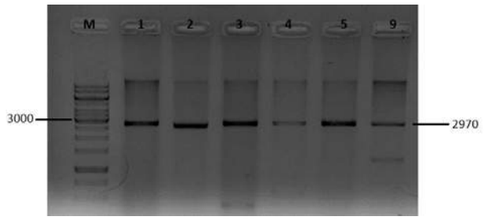


Fig. 3 Digestión con Bgl II en donde se aprecia la banda del vector.

La clona número 9 se seleccionó para poner una doble digestión con SacI y PstI, lo que liberaría a todo el fragmento clonado debido a que el sitio SacI se encuentra en el terminador y el sitio PstI en el promotor. Debido a que las bandas que se esperaban contemplar una vez realizadas las digestiones no fueron visualizadas y no se pudo comprobar la presencia del inserto en pJet, se tuvo que realizar PCR de nuevo con clonas distintas de pSilent para seguir con el proceso anteriormente descrito.

CONCLUSIONES

El estudio de *S. schenckii* es conveniente debido a la alta incidencia de esporotricosis en los últimos años. La pared celular del hongo le confiere características de virulencia, por lo tanto es ventajoso adquirir información sobre los genes que codifican para ciertas proteínas de la pared celular. La inducción de mutantes en genes es un proceso que debe ser llevado a cabo bajo estrictos protocolos de ingeniería genética. Deben así comprobarse los procedimientos durante el desarrollo y repetirlos cuantas veces sea necesario para poder seguir adelante.

AGRADECIMIENTOS

A Luz Adriana López y Nancy Lozoya por su tiempo, correcciones y paciencia brindada. A mis compañeros Irving Ortiz y Marco Perez por su ayuda prestada. A Héctor M. Mora Montes por aceptarme en el programa y resolver mis dudas. Este proyecto fue apoyado por fondos de CONACyT y por la Universidad de Guanajuato.

BIBLIOGRAFÍA

1. Mónica Bastos,Rodrigo de Almeida y Armando Oliveira.. (Octubre 2011). Sporothrix schenckii and Sporotrichosis. Clin Microbiol Rev., 24, 633–654.. 5 de Agosto de 2016, De NCBI Base de datos.
2. Francisca Hernández Hernández. (2015). ESPOROTRICOSIS. 5 de agosto de 2016, de Universidad Autónoma de México Sitio web: http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/esporotricosis.html
3. Carlos A. Alba-Fierro, Armando Pérez-Torres, Everardo López-Romero, Mayra Cuéllar-Cruz, Estela Ruiz-Baca. (January–March 2014). Cell wall proteins of Sporothrix schenkii as inmunoprotective agents.. Revista Iberoamericana de Micología,, 31, 86-89. 5 de agosto de 2016, De ScienceDirect Base de datos.
4. Carlos A. Alba-Fierro, Armando Pérez-Torres, Conchita Toriello, Evelyn Pulido-Camarillo, Everardo López-Romero, Yolanda Romo-Lozano, Gerardo Gutiérrez-Sánchez, and Estela Ruiz-Baca. (January, 2016). Immune Response Induced by an Immunodominant 60 kDa Glycoprotein of the Cell Wall of Sporothrix schenckii in Two Mice Strains with Experimental Sporotrichosis. Journal of Immunology Research, 2016, 15pages. August 7th, 2016, From Hindawi Publishing Corporation Data Base.
5. Ester Pardo and Margarita Ojedas. (November 22th, 2014). The Aspergillus nidulans Zn(II)2Cys6transcription factor AN5673/RhaR mediates L-rhamnose utilization and the production of α-L-rhamnosidases. Microbial Cell Factories. August 13th, 2016, From BioMedCentral Data base.
6. Lijun Lia, Yue Yua, Xia Zhanga, Zedong Jianga, Yanbing Zhua,Anfeng Xiaoa, Hui Ni. (April 2016). Expression and biochemical characterization of recombinant α-l-rhamnosidase r-Rha1 from Aspergillus niger JMU-TS528. International Journey of Biological Macromolecules, 85, 391-399. August 6th, 2016, From ScienceDirect Data Base.
7. Ríos-Velázquez · Rivera · López . Laboratorio de Genética de Bacterias. 6 de Agosto de 2016, de Universidad de Puerto Rico Sitio web: http://www.uprm.edu/biology/profs/rios/labman.pdf
8. Oscar Alvarado Villanuev. (2010). Diseño y construcción genética con posibilidades de ser usada en un sistema biosensor a mercurio.. 6 de Agosto de 2016, de Universidad Autónoma de Querétaro Sitio web: http://ri.uaq.mx/bitstream/123456789/2259/1/RI001761.pdf
9. TermoFisher: CloneJET PCR Kit. https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K1231 Consultado el 6 de Agosto de 2016

FABRICACIÓN DE NANOESTRUCTURAS DE CARBONO DOPADOS CON NITRÓGENO

Carlos Alberto Araiza Acosta[1] y Emilio Muñoz Sandoval[2]

RESUMEN

Los nanotubos de carbono han sido de interés debido a sus propiedades. La pirólisis de aerosoles líquidos ha resultado ser un método eficiente para la producción de NTC que permite el dopaje del nitrógeno, que en conjunto con el método CVD se ve como un proceso prometedor. El presente trabajo tiene como objetivo demostrar la viabilidad del isopropanol/bencilamina/ferroceno como fuentes para la obtención de NTC dopados con nitrógeno. Durante la reacción el aerosol fue trasportado mediante argón, a través de un tubo de cuarzo a 850 °C durante 30 minutos. Se sintetizaron nanotubos de carbono a partir de la solución precursora propuesta. El isopropanol influyó en los diámetros obtenidos. El acomodo de los reactores influyó en la distribución de pesos.

ABSTRACT

Carbon nanotubes have been of interest because of its properties. Pyrolysis of liquid aerosols has proven to be an efficient method for producing NTC allowing doping nitrogen, which together with the CVD method is seen as a promising process. This paper aims to demonstrate the feasibility of isopropanol/benzylamine/ferrocene as sources for obtaining NTC doped with nitrogen. During the reaction the aerosol was transported by argon through a quartz tube at 850 ° C for 30 minutes. Carbon nanotubes were synthesized from the precursor solution proposal. Isopropanol influenced in the obtained diameters. The arrangement of the reactors influenced the weight distribution.

Palabras Clave: nanotubos de carbono, isopropanol, Deposición química de vapor.

INTRODUCCIÓN

Los nanotubos de carbono (NTC) han sido de gran interés para el mundo de la investigación actual debido a sus aplicaciones en el campo de la electrónica, fuentes de emisión, desarrollo y fabricación de nanocompositos. En su estado puro, son químicamente inertes, de ahí la necesidad de funcionalizarlos o modificar su superficie. Al dopar un nanotubo se tiene que tener en cuenta el uso que tendrá y en base a ello dar una estimación del nivel de dopaje necesario.

El dopaje con heteroátomos es una excelente técnica para lograr un control de los estados electrónicos de valencia. En relación a este tipo de dopaje, el nitrógeno ha sido de gran interés debido a los cambios que trae consigo respecto a la dureza, conductividad eléctrica y reactividad. En la actualidad la pirólisis de aerosoles líquidos a partir de una mezcla de hidrocarburos con metalocenos ha resultado ser un método eficiente para la producción de NTC debido a que permite un crecimiento a lo largo de las paredes del reactor y con ello dar lugar a la formación de nanotubos así como el proceso de dopaje del nitrógeno. Este proceso en conjunto con la Deposición Química de Vapor se ve como un método prometedor para el control de las propiedades fisicoquímicas de los NTC.

[1]Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Facultad de Ciencias Químicas; Av. Dr. Manuel Nava No. 6, Zona Universitaria, C.P: 78120, San Luis Potosí, S. L. P., ca32010@live.com.mx
[2]Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A. C., División de Materiales Avanzados; Camino a la Presa San José 2055, Col. Lomas 4ª sección, C.P: 78216, San Luis Potosí, S. L. P., ems@ipicyt,edu,mx

La Deposición Química de Vapor (o *CVD* por sus siglas en inglés de *Chemical Vapor Deposition*) involucra la descomposición del catalizador, el cual se extrae directamente de una fuente de carbono. Este método ha sido muy utilizado debido a las ventajas que presenta en comparación con otros métodos, destacando el hecho de que es útil cuando se tienen fuentes de carbono ya sea en sólidos, líquidos o gases. Los bajos costos que se pueden llegar a tener lo hace un método con viabilidad de ser explotado comercialmente y fácilmente escalable, aunado a la gran área de reacción con la que se cuenta, el control en las características fisicoquímicas de los NTC así como la facilidad en el uso de los sustratos ya que no requieren preparación previa.

Para el uso eficiente de los NTC es necesario tener dimensiones específicas así como diferentes niveles de homogeneidad, por lo cual es imperativo controlar sus propiedades físicas a través del control de los átomos que se introducen dentro la red cristalina. Los recientes estudios se han concentrado en optimizar los parámetros de la síntesis para con ello ampliar sus aplicaciones. El nitrógeno es altamente reactivo, por lo cual su uso implica consideraciones experimentales exactas para una síntesis exitosa. La fuente de carbono así como historial de pretratamiento son factores que influyen en el área superficial del compuesto de carbono y con ello el área de funcionalización. Diversos trabajos han utilizado tolueno, amonio o ciclohexano como precursores, sin embargo estos representan un alto costo aunado también al riesgo que representa su manejo y uso. El presente trabajo tiene como objetivo probar la viabilidad del uso de la mezcla isopropanol/bencilamina/ferroceno como fuentes para la obtención de NTC dopados con nitrógeno.

MÉTODOS Y MATERIALES

El método de síntesis se llevó a cabo a través del proceso de pirólisis de aerosoles. El método consiste en el uso de un sprayer el cual tiene un elemento piezoeléctrico en donde se lleva a cabo la pirólisis. El aerosol fue trasportado mediante gas argón con un flujo de 2.5 l/min, a través de un tubo de cuarzo el cual estaba dentro de dos hornos de convección. La reacción fue llevada a cabo a 850 °C con un tiempo de 30 minutos. Una vez terminado el tiempo de reacción el sprayer se apagó, el tubo se dejó enfriar a través de un método de convección forzada y el flujo de argón se disminuyó hasta 0.3 l/min. El tubo estaba conectado directamente hacia una trampa de acetona donde se depositaron los residuos. Para la solución precursora se utilizó ferroceno ($C_{10}H_{10}Fe$, 98%, Aldrich), bencilamina (C_7H_9N, 99%, Aldrich) e isopropanol (C_3H_8O, 99.95%, CTR Scientific) con las composiciones de 48.75% de bencilamina, 48.75% de isopropanol y 2.5% de ferroceno, en peso. El ferroceno es un metaloceno el cual contiene al catalizador. El tubo de cuarzo fue marcado cada centímetro, esto con el motivo de tomar muestras cada centímetro a partir de los 10 cm desde donde inicia la cabeza del tubo, para con ello hacer un análisis de distribución de pesos.

Para la caracterización morfológica se utilizó SEM (Microscopio Electrónico de Barrido Dual Beam FIB/SEM FEI-Helios Nanolab 600) para posteriormente realizar una distribución de los diámetros obtenidos. Se realizó también un análisis termogravimétrico (PerkinElmer TGA 4000).

RESULTADOS

En la figura 1 se muestra el análisis de distribución de pesos. En este análisis podemos observar que en el centímetro 33 es donde se obtuvo mayor cantidad de muestra. Cabe destacar que cada horno de convección mide 40 cm, por lo cual se puede observar que los mayores pesos se obtienen en los últimos 8 centímetros del primer horno de convección, a partir del inicio del siguiente horno se observa una caída abrupta en los pesos obtenidos.

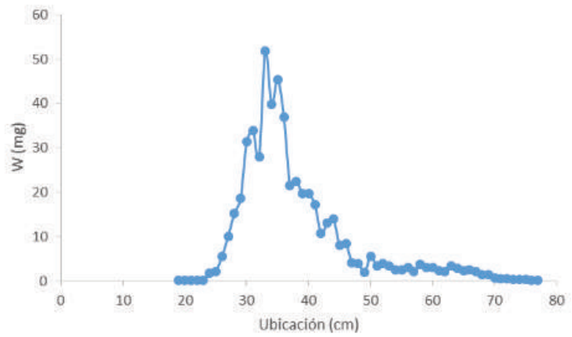


Figura 1. Distribución de pesos a lo largo del tubo de cuarzo

En la figura 2 se tienen las imágenes realizadas mediante SEM. Cada gráfico muestra una marca de clase que representa un promedio de diámetros por donde rondan los valores originales analizados en cada imagen. En la figura 2b se observa que la mayor parte de los diámetros oscilan entre los 0.07 y 0.09 µm; en la figura 2d se observa que existe más dispersión en los diámetros oscilando entre los 0.06 0.11 µm; en la figura 2f se observa que existe una dispersión que oscila entre 0.06 y 0.11 µm; en la figura 2h se observa que los diámetros rondan 0.09 a 0.11 µm, donde la mayor parte se encuentran en 0.11 µm; en la figura 2j se observa que los diámetros rondan entre 0.04 y 0.08 µm, donde la mayor parte se encuentra entre 0.08. La mayor parte de los nanotubos oscilan entre 0.06 a 0.11 donde, en comparación con el uso de etanol como fuente de carbono [2], se observa que los diámetros son más grandes a partir del uso del isopropanol.

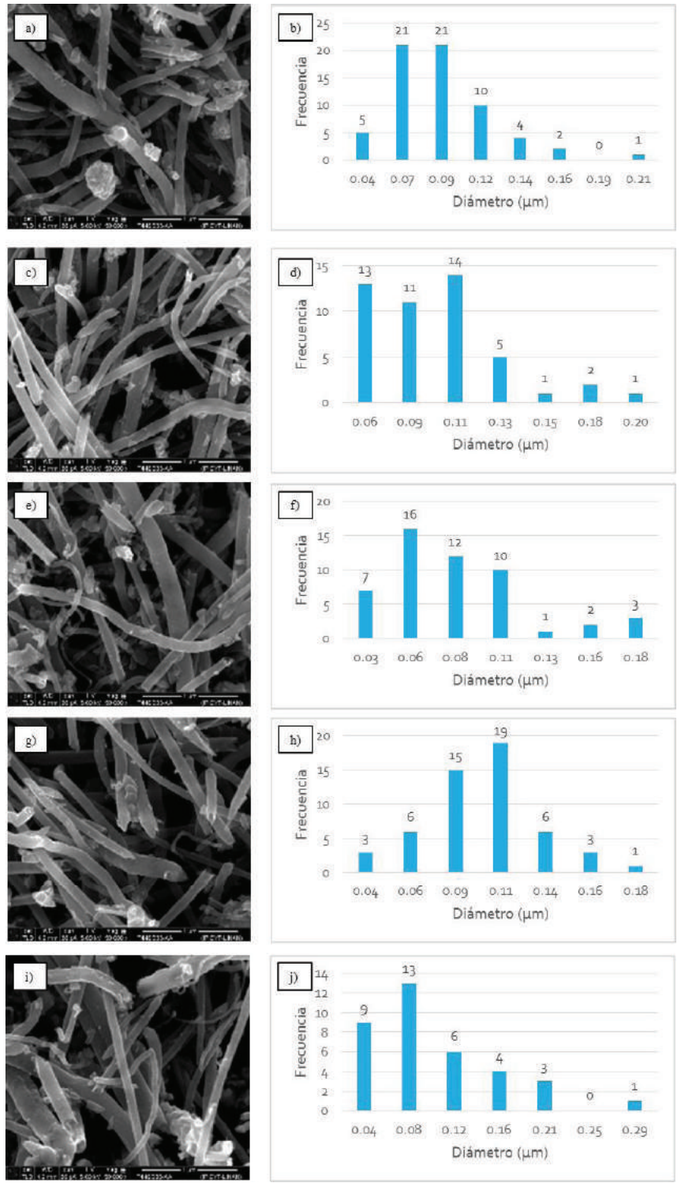


Figura 2. Imágenes de SEM, a su lado derecho cada una contiene su distribución de diámetros.

En la figura 3 se tiene el análisis termogravimétrico donde observamos que a partir de 430 °C la oxidación de los NTC tiene un decaimiento notable, llegando su máximo en 520 °C donde el peso se

empieza a mantener constante. El porcentaje de peso restante corresponde a la cantidad de hierro proveniente del metaloceno.

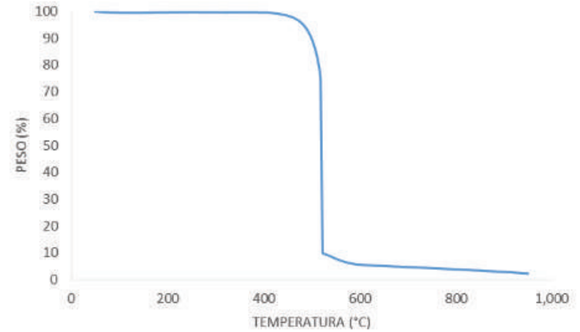


Figura 3. Análisis de TGA realizado para una muestra con un peso inicial de 4.775 mg, desde 50 °C hasta 950 °C, con un flujo de calor de 5.00 °C/min en atmósfera de oxígeno.

CONCLUSIONES

Se sintetizaron nanotubos de carbono a partir de la mezcla isopropanol/bencilamina/ferroceno. La fuente de carbono, en este caso el isopropanol jugó un papel importante en los diámetros obtenidos donde al compararlo con estudios previos se determinó que se obtienen diámetros más grandes en comparación con el etanol. El acomodo de los reactores fungió un papel importante en la distribución de pesos que se obtuvieron, debido a que en la intersección entre donde termina un reactor y donde empieza el otro existió un cambio abrupto en dichos pesos.

BIBLIOGRAFIA

1. Ayala, P., Arenal, R., Rümmeli, R., Rubio, A., & Pichler, T. (2010). The doping of carbon nanotubes with nitrogen and their potential applications. *CARBON*, 575-586.
2. Botello, A., Campos, J., Morelos, A., Romo, J., Rodríguez, Á., Navarro, H., . . . Terrones, M. (2008). Controlling the dimensions, reactivity and crystallinity of multiwalled carbon nanotubes using low ethanol concentrations. *CHEMICAL PHYSICS LETTERS*, 55-61.
3. Lupo, F., Rodríguez, J., Zamudio, A., Elías, A., Kim, Y., Hayashi, T., . . . Terrones, M. (2005). Pyrolytic synthesis of long strands of large diameter single-walled carbon nanotubes at atmospheric pressure in the absence of sulphur and hydrogen. *CHEMICAL PHYSICS LETTERS*, 384-390.
4. Maldonado, S., Morin, S., & Stevenson, K. (2006). Structure, composition, and chemical reactivity of carbon nanotubes by selective nitrogen doping. *CARBON*, 1429-1437.
5. Pinault, M., Mayne-L'Hermite, M., Reynaud, C., Beyssac, O., Rouzaud, J., & Clinard, C. (2004). Carbon nanotubes produced by aerosol pyrolysis: growth mechanisms and post-annealing effects. *DIAMOND AND RELATED MATERIALS*, 1266-1269.
6. Pinault, M., Mayne-L'Hermite, M., Reynaud, C., Pichot, V., Launois, P., & Ballutaud, D. (2005). Growth of multiwalled carbon nanotubes during the initial stages of aerosol-assisted CCVD. *CARBON*, 2968-2976.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se pudo llevar a cabo gracias al proyecto CB-2013-220744-CONACYT del Dr. Emilio Muñoz Sandoval y 3971 Bilateral 246023-CONACYT del Dr. Florentino López Urías, así como al IPICYT, a la División de Materiales Avanzados, LINAN, Verano de la Ciencia de la Academia Mexicana de Ciencias y al CONACYT.

CONTRACCIÓN EN MUSCULO LISO DE RAMAS DE ARTERIA MESENTÉRICA EN RATAS MEDIADA POR CANALES IONICOS

Esaú Arcos Rivera[1] y Paola Algara Suárez[2]

RESUMEN

La contracción de las células de musculo liso vascular es un proceso complejo que resulta de gran importancia de estudio puesto que en diferentes patologías el proceso de contracción en este tipo de tejido se ve afectado generando sensibilidad a diferentes sustancias. En el presente estudio como principales metas, se propuso generar y aprender técnicas de disección de tejido vascular, así como mejorar el montaje del mismo en el miógrafo DMT y después de esto corroborar la funcionalidad del tejido. El protocolo anterior nos ayudó a fortalecer el trabajo de investigación que predecesor a este, porque se mejoró la técnica de montaje en el miógrafo y se generaron diversos registros de contracción/dilatación vascular con la finalidad de obtener mejores respuestas.

ABSTRACT

The contraction of vascular smooth muscle is a complex process that is of great importance to study because on different pathologies the contraction process in this type of tissue is affected generating sensitivity to different substances. In the present study as main goals, set out to create and learn techniques dissection of vascular tissue as well as improve the assembly thereof in the myograph DMT and after that confirm the viability of the tissue. The previous protocol helped us to strengthen the research work preceding this one, because the mounting technique was improved in the myograph and were generated some records contraction / vascular dilation in order to obtain better responses.
Palabras clave: Musculo liso vascular, miógrafo DMT, disección de tejido.

INTRODUCCION.

La diabetes mellitus representa uno de los problemas de salud de mayor repercusión dentro de los estados mexicanos, pues su índice en la población es de 6.4 millones de personas (9.2%) incrementando su prevalencia en un 59.6%(ENSANUT 2012).Lo cual afecta principalmente en la calidad de vida de la población puesto que acarrea distintos tipos de complicaciones entre los que destacan retinopatías,ulceraciones,hipertensión,problemas renales, posibles amputaciones, compromet imiento cardiaco y neuropatías(principalmente a nivel de extremidades).Entre las afecciones de diabetes es el daño vascular, el cual se genera por daño al endotelio vascular y musculo liso debido al estrés oxidativo provocado por la hiperglucemia clásica de diabetes mellitus. Esto provoca una modificación en la funcionalidad del tejido y se altera la contractilidad del mismo, guiando este desorden a alteraciones en la resistencia vascular periférica y como subsecuente a un aumento en la presión arterial. Como tal estos desordenes en la RVP pueden ser estudiados en diversos puntos durante la contracción en el caso del tejido vascular se aborda el papel de los canales de calcio puesto que durante este proceso la presencia de

[1] Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí Av. Manuel Nava No. 6, C.P. 78260, San Luis Potosí, S.L.P., MÉXICO;king.esa@hotmail.com
[2] Facultad de Enfermería, Universidad Autónoma de San Luis Potosí Av. Niño Artillero #130 Zona Universitaria San Luis Potosí, S.L.P., MÉXICO; paola.algara@uaslp.mx

calcio es realmente importante para lograr una contracción significativa. Guiados en este tenor de la contracción del tejido vascular se propusieron diversos objetivos para ayudar en la estandarización de una técnica capaz de medir de forma eficiente la contracción y relajación vascular, el primero de ellos fue aprender de una técnica de montaje y en lo posible hacerla más sencilla para el manejo de tejido, como segunda propuesta estuvo generar un protocolo el cual estableciera las condiciones óptimas para llevar a cabo el experimento y como tercer pauta montar el sistema para obtener registros y en medida de lo posible fijar dos tejidos en un sistema separado para aplicar tratamientos individuales a cada tejido.

MARCO TEORICO

La contracción vascular es un proceso de naturaleza compleja, el cual funciona gracias a receptores α adrenérgicos de membrana en el miocito unidas a proteínas G, las cuales al interaccionar con sustancias de carácter agonista para este receptor generan una vía de señalización con diferentes intermediarios cuya función es elevar la concentración citosolica de calcio y de esta manera el calcio pueda formar el complejo calcio-calmodulina que active a la cinasa de cadena liviana de miosina y esta a su vez ayude en el solapamiento que origina la contracción de las fibras de actina y miosina. El proceso de relajación vascular es diferente, pues en él se necesita de las células endoteliales, las cuales cuando son activadas por agonistas colinérgicos que activan una vía de señalización la cual genera óxido nítrico y este a su vez difunde por la célula endotelial y pasa al miocito, en el cual se activa otra vía de señalización que incrementa los niveles de GMPc que son responsables de activar una fosfatasa con la finalidad de relajar las fibras de actina y miosina previamente solapadas en el proceso de contracción.

METODOS Y MATERIALES

Se trabajó con ramificaciones de la arteria mesentérica de ratas macho de la especie windstar, previamente diseccionadas. Primero se obtuvo tejido con ramificaciones de la arteria mesentérica, las cuales fueron limpiadas usando pinzas para disección y posteriormente se fijaron con alambres de metal para ser ancladas al miógrafo.

El tejido muscular fue montado en el miógrafo DMT (wire miograph system-420A), con el fin de medir la respuesta frente a fármacos contra la tensión del tejido. Cada una de las puntas de los alambres fue puesta fija a los tornillos del vernier del miógrafo usando un desarmador de paleta y las pinzas para disección, para adicionar los fármacos se realizó con micropipeta y los lavados fueron hechos con solución fisiológica en jeringas comerciales de 10 ml.

La respuesta de contracción fue obtenida con el software Labchart.

Se utilizaron diferentes soluciones y fármacos para el montaje y experimentación de este trabajo, entre ellos:

Solución fisiológica (NaCl, KCl, $MgSO_4$, KH_2PO_4, $CaCl_2$, Hepes, Dextrosa) pH 7.4

Fenilefrina[10uM]

Carbacol [100nM]

Nifedipina[1uM]

TEA-Cl[10mM]

NS[10uM]

Materiales:

Pinzas para disección.

Microscopio óptico.

Miografo DMT (wire miograph system-420A),

Desarmador de paleta y alambres de fijación.

Tijeras.

Software Labchart.

Micropipeta y jeringas.

RESULTADOS

Figura 2.Tejido vascular montado en el miógrafo DMT.

Figura 1.Disección y alambrado de ramificaciones de la arteria mesentérica.

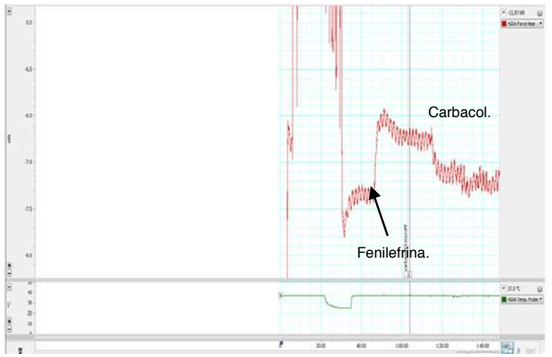


Figura 3.Registro de contracción usando fenilefrina y carbacol en tejido sin endotelio.

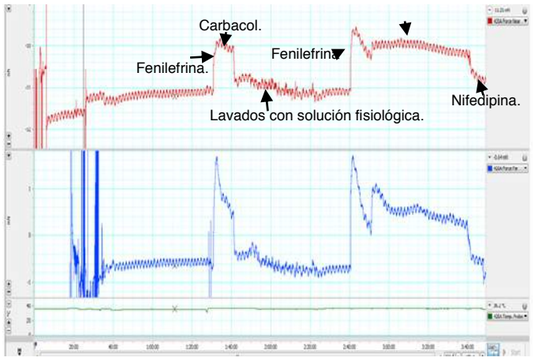


Figura 4.Registro de contracción en dos arterias diferentes con endotelio, usando fenilefrina,carbacol,TEA-Cl y nifedipina para ambos tejidos.

En la figura 1 es posible observar el tejido diseccionado, limpiado y alambrado para su posterior montaje en el miógrafo DMT, posteriormente en la figura 2 fue posible montar un sistema de 2 tejidos anclados a este sistema que está dividido en 2 secciones listas para recibir un tratamiento farmacológico diferente para comparar la acción de cada uno de ellos en los vasos sanguíneos, cuya precarga inicial fue fijada en 6 mN.

En la figura 3 y 4 es posible ver el comportamiento del tejido vascular frente a diferentes fármacos, primero se analiza la funcionalidad del tejido frente a un agonista adrenérgico como la fenilefrina y es posible ver el aumento en la contracción del vaso sanguíneo, elevando la fuerza del estado basal que registra el aparato(mN). En el caso del uso en el tejido de carbacol tenemos dos puntos de vista diferente, pues para corroborar la susceptibilidad del tejido y que la respuesta sea debida al carbacol usamos ramificaciones con y sin endotelio puesto que la acción colinérgica-relajante de este fármaco comienza en el endotelio y sin él es imposible que la relajación del vaso se lleve a cabo. Lo que fue confirmado en los registros porque en el tejido sin endotelio se mantuvo la contracción, mientras que en el tejido con endotelio fue muy evidente la relajación ocurrida en el vaso.

Para cuando se usó el TEA-Cl, un bloqueador de canales de potasio fue visible el comportamiento de este ion en la relajación del musculo liso, esto debido a que para que la relajación en el musculo se produzca es necesario que el potasio salga de la célula**,** debido a que los canales estaban cerrados el potasio no pudo salir del miocito y subsecuentemente no hubo relajación muscular manteniendo el estado de contracción y alargándolo un poco.

Cuando fue administrado la nifedipina, un bloqueador de canales de calcio fue evidente el papel del calcio en la contracción muscular, porque como ya fue mencionado anteriormente el calcio y su unión a calmodulina son de gran importancia para continuar con la cascada de señalización correspondiente a la contracción. Entonces al bloquear la entrada de calcio por sus canales esta parte de la secuencia se fue cortando y como consecuente la contracción se detuvo dando como resultado que el tejido se relajara

CONCLUSIONES

Como panorama general se cumplieron gran parte de los objetivos planeados para este proyecto, entre lo más destacable es la disección y el montaje del tejido en el miógrafo DMT que a su vez nos brindó la capacidad de estandarizar las condiciones óptimas de montaje del tejido por ejemplo se trabaja con ramificaciones arteriales de rama mesentérica con una longitud de 3 mm aproximadamente y de diámetro cercano a un milímetro puesto que las ramificaciones de la arteria que no cumplen con estas especificaciones no generan registros adecuados legibles. La precarga (pequeño ajuste de tensión hecho al inicio del experimento) quedo establecido en 6 mN, porque dentro de los ensayos es la fuerza que se debe aplicar para arrojar contracciones más consistentes y en cuanto a los lavados de los tejidos se coincidió en un sistema de perfusión inicialmente rustico que utiliza jeringas para que el flujo del líquido suministrado (solución fisiológica) no genere malas lecturas en el sistema(ruido).Fue posible el montar dos tejidos en el miógrafo y aplicar tratamientos distintos, para corroborar la funcionabilidad del septo divisorio del aparato.

Respecto a los registros, se pueden hacer distintas interpretaciones respecto a cada fármaco utilizado. Las cuales ya fueron analizadas previamente, pero entre lo más destacable está el papel de los iones en la contracción vascular, como lo es el calcio o en la relajación el potasio. Aunado a esto vimos la importancia del endotelio en la señalización del tejido para relajarse debido a la producción del óxido nítrico y dado esto podemos inferir que en procesos como la diabetes que se daña este, la latencia a estar contraído el musculo es más factible. Como tal los procesos de estandarización y montaje del tejido fueron en su mayoría satisfactorios puesto que el porcentaje de error fue muy poco, por ello se generaron nuevos y mejores formas de realizarlos. Lo que en un futuro servirá de apoyo para la continuación del proyecto de investigación que precede a este trabajo y aplicarlo a modelos de ratas diabéticas lo que posiblemente genere conocimiento adecuado sobre la susceptibilidad del tejido frente a varios fármacos.

BIBLIOGRAFIA

Brauchi, R. L. (2006). Large conductance ca2+ activated k+(BK) channel: activation by ca2+ and voltage. *Biological research* .

Gregory C. Amberg, M. F. (2013). Calcium dynamics in vascular smooth muscle. *National Institute of Health.*

Michael J. Berridge, P. l. (2000). The versatility and universatility of calcium signaling. *Nature.*

Tong Lu, T. H.-C. (2006). Molecular mechanisms mediating inhibition of human large conductance ca2+-activated k+ channels by high glucose. *American heart association*, 11.

William A. Catterall, E. P.-R. (2005). Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *The american society for pharmacology and experimental therapeutics* . (Erik R. Kandel, 2001)

Erik R. Kandel, J. H. (2001). Principios de neurociencia. Interamericana.

SÍNTESIS DE DIHIDROPIRIMIDINTIONAS ASISTIDA POR MICROONDAS

Eduardo Daniel Ayala Medrano[1] y José García Elías[2]

RESUMEN

Los núcleos pirimidínicos, en especial de 3,4-dihidropirimidin-2(1H)-tiona (DHPM), representan una de las tantas soluciones que se han planteado para resolver problemas de salud tales como, cáncer, hipertensión y SIDA. Es posible obtener estos núcleos mediante una vía ambientalmente amigable, la reacción de Biginelli. Se logró sintetizar el núcleo 4-(2-hidroxifenil)-6-metil-5-metoxicarbonil-3,4-dihidropirimidin-2(1H)-tiona, mediante síntesis vía microondas sin presencia de disolvente. La purificación se realizó empleando cromatografía en columna para obtener la molécula con un 24.6 % de rendimiento. Se realizó, aunado a esto, el análisis de una predicción posible del espectro de ^{1}H-RMN que la molécula pudiese presentar. El presente trabajo destaca la búsqueda de catalizadores más eficientes que, además, disminuyan o eliminen la producción de subproductos, abriendo una línea hacia métodos más sencillos y económicos para la obtención y purificación de los núcleos de DHPM.

ABSTRACT

Pyrimidine moiety, particularly 3,4-dihydropyrimidine-2(1H)-thione (DHPM) represent one of the many solutions have been sought to solve health problems such as cancer, hypertension and AIDS. Through Biginelli reaction, an environmentally friendly way, it is possible to obtain these nuclei. It was possible to synthesize (2-hydroxyphenyl)-3,4--methoxycarbonyl-6-methyl-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-thione using microwave radiation without solvent to obtain, after purification by chromatography column, the molecule with a yield of 24.6%,. Analysis on a prediction of possible NMR spectrum of the molecule was made to facilitate future studies. This paper highlights the search for more efficient catalysts that reduces or eliminate the production of side products. In addition, the research must done for simpler and more economical methods for obtaining and purification of DHPM moiety.

Palabras Clave: Biginelli, química verde, microondas, cáncer, SIDA.

INTRODUCCIÓN

En un mundo tan dinámico, en el que miles de niños nacen diariamente dentro de una sociedad ávida de conocimientos y riquezas, surgen problemas realmente complejos, que requieren soluciones de la misma magnitud. Como muestra de ello, aumentó 0.74 °C la temperatura de la tierra en los últimos 100 años, el nivel del mar subió 20 cm y para el 2013 se habían rebasado las 400 ppm de dióxido de carbono en la atmósfera, esto sin mencionar las 22,784 especies animales que se encuentran en peligro de extinción. Por otro lado, cada año mueren aproximadamente 56 millones de personas, de las cuales el 52 % es a causa de trastornos cardiovasculares y cerebrovasculares, diabetes, cáncer y SIDA. Con esto en cuenta, las soluciones deben ser planteadas multidisciplinariamente, buscando resolver el mayor número de problemas posibles. La reacción de Biginelli, descubierta por Pietro Biginelli en 1983, resulta ser una de las herramientas más útiles para nuestra época. Los productos obtenidos en tal reacción poseen similitud con diversas moléculas vitales, representando así una excelente familia de derivados, candidatos a ser

[1] Universidad Autónoma de Zacatecas, Programa de Lic. en Ingeniería Química; Carretera Zacatecas-Guadalajara km. 6, Ejido La Escondida, C.P: 98160, Zacatecas, Zac., eduardo.ayala.medrano@gmail.com

[2] Universidad Autónoma de Zacatecas, Unidad Académica de Ciencias Químicas, Programa de Lic. en Ingeniería Química, Laboratorio de Síntesis Asimétrica y Bioenergética; Carretera Zacatecas-Guadalajara km. 6, Ejido La Escondida, C.P: 98160, Zacatecas, Zac., garciaelias_jose@uaz.edu.mx

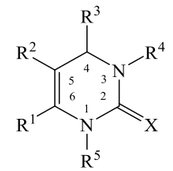
probados y comercializados como fármacos. Tal es el caso de los componentes activos propiltiouracilo, fármaco empleado en el tratamiento de hipertiroidismo, sofosvubir en el tratamiento de hepatitis C e infecciones consecuencia del VIH, capecitabina como agente antineoplásico en cáncer de colon y de mama, así como, el antiviral cidofovir. Dentro de este tipo de derivados de DHPM, nuevas estructuras aún se encuentran en fase experimental con resultados prometedores, destacando su actividad antifúngica, antimicrobiana, larvicida, antibacterial, sedante, analgésica, anti-inflamatoria, antitumoral, anticonvulsivante, como coadyuvante en el tratamiento de tuberculosis, diversos tipos de cáncer, SIDA e hipertensión. Aunado a esto, la versatilidad del procedimiento coloca a la reacción dentro de los contados procedimientos que son capaces de cumplir un gran número de los principios de la química verde.

En la expectativa de que el proyecto logre un avance significativo, se plantearon los siguientes objetivos:

- Determinar, con base a precedentes experimentales, las condiciones adecuadas para llevar a cabo la reacción de Biginelli.
- Sintetizar y purificar el derivado DHPM utilizando salicilaldehído, acetoacetato de metilo y tiourea.
- Evaluar el rendimiento de la reacción de obtención.
- Determinar las características fisicoquímicas (punto de fusión y solubilidad) del derivado obtenido.
- Predecir el espectro de resonancia magnética nuclear de ^{1}H para el núcleo con ayuda del software MestReNova.

MARCO TEÓRICO

La reacción de Biginelli consiste de una reacción de condensación multicomponente entre un aldehído, un compuesto 1,3-dicarbonílico y urea, como originalmente fue descubierta, para dar como producto una 3,4-dihidropirimidin-2(1H)--ona/tiona/imina (DHPM). Un heterociclo de 6 miembros (Figura 1), con dos nitrógenos en posición 1 y 3 un doble enlace en la posición C-5 y un doble enlace sobre la posición C-2 hacia un heterotátomo.



X = O, S o NH
R_{1-5}= H, alquilo, arilo, alilo, acilo, éster, amida, heterociclo

Figura 1. Estructura principal de una 3,4-dihidropirimidin-2(1H)-ona/tiona/imina

Las características de los reactivos, implica que puedan utilizarse tiourea, guanidina, compuestos carbonílicos con un grupo electroatractor sustituido en posición β, sin limitaciones en los sustituyentes en cualquiera de los reactivos, pudiendo así, obtenerse más de 3400 derivados diferentes, sin contemplar las condiciones a las cuales desarrollar la reacción. Aunque los métodos para obtener este tipo de derivados son diversos (adición de Michael, reducción de Meerwein-Ponndorf-Verley, transposición de Dimroth, entre otros) se requieren precursores que poseen costos elevados y los productos se obtienen con bajos rendimientos, siendo la reacción de Biginelli, la más adecuada.

La síntesis de estos derivados se ha realizado sobre dos grandes líneas, reacción en solución y reacción libre de disolventes. Dentro de las reacciones en solución los disolventes comúnmente utilizados son THF (tetrahidrofurano), etanol, acetonitrilo y agua, catalizadas con ácido clorhídrico, cloruro de zinc, sales de amonio, sales de cobre, ácidos cítrico y tartárico, entre otros. Para las reacciones libres de disolvente, se han utilizado diversas sales de hierro, niquel, zinc y cobre, yodo molecular, DCC (*N,N'*-

diciclohexilcarbodiimida), ácidos inorgánicos y orgánicos como el *p*-TSA (ácido *p*-toluensulfónico), bases fuertes, entre otros. Estas líneas generalmente implican reflujo y calentamiento por microondas, para reacciones en solución y sin disolventes, respectivamente, que, realizando una comparación, es posible reducir los tiempos desde 3 horas hasta 3 minutos, aumentando el rendimiento desde 95 hasta 97 %. Es importante recalcar la relación del uso de microondas y por consiguiente, reacciones sin disolvente, con los principios de la química verde, la cual busca diseñar procesos químicos más seguros, incorporando todos los materiales utilizados, los cuales deben ser lo más inocuos posible para la obtención de productos biodegradables, reduciendo además, el uso de sustancias auxiliares, el consumo energético y guiando siempre el proceso a utilizar recursos renovables y catálisis, evitando la derivatización. Todo esto previniendo la contaminación y trabajando con seguridad. En base a todo lo anterior es que se planteó el proyecto en cuestión.

MÉTODOS Y MATERIALES

Dentro de los reactivos y material utilizados para cumplir los objetivos planteados, se encuentran salicilaldehído Aldrich® 98 %, ácido *p*-toluensulfónico Monterrey® 99 %, acetoacetato de metilo Aldrich® 99 %, tiourea J. T. Baker® 98 %, hexano grado técnico Meyer®, acetato de etilo grado técnico Meyer®, acetona grado técnico Meyer®, metanol grado técnico Meyer® y diverso material de vidrio de borosilicato tales como columna de vidrio de 2.5x40 cm, pipetas Pasteur Corning® de 5.75'', vasos de precipitado Pyrex® de 10, 25 y 50 mL, matraces bola Kimax® de 25 mL, probetas Pyrex® de 10 mL, además, placas cromatográficas de gel de sílice 60 Merck® F_{254}, embudos Büchner Coors de 5 cm, papel filtro Whatman® de calibre 3 y 5, termómetro Brannan®. Entre los equipos utilizados se encuentran un horno reactor de microondas CEM® Discover System Modelo: 908005, medidor de punto de fusión Scorpion Scientific Modelo: A50360, lámpara UV Entela de 254 y 365 nm, balanza analítica AND GR-200, horno Arsa Modelo AR-290, espectrofotómetro de RMN Inova Varian y Mercury 400 y 200 MHz para ^{1}H y, 100 y 50 MHz para ^{13}C.

Se realizó una profunda revisión bibliográfica, enfocada a la síntesis de este tipo de núcleo asistida por microondas y en específico, del núcleo a sintetizar y los métodos de purificación de los productos. El laboratorio sede realizó además una capacitación en el uso del horno reactor de microondas, así como de las técnicas cromatrográficas desarrolladas y el software utilizado. Para la síntesis del núcleo se hizo reacciones en un matraz bola salicilaldehído, acetoacetato de metilo, tiourea y *p*-TSA.La mezcla se irradió con microondas a 100 W, monitoreando la reacción mediante cromatografía en capa fina (CCF). Transcurrido el tiempo de reacción, el crudo se lavó con hexano y agua, se secó y se purificó mediante cromatografía en columna con un sistema de hexano/acetato de etilo para alcanzar un 24.6 % de rendimiento. La solubilidad del sólido se determinó colocando 5 mg de la muestra en 0.1 mL de disolvente. Una fracción del sólido obtenido fue enviada a análisis al departamento de resonancia magnética nulcear de la UAEM.

La predicción de los espectros de RMN se realizó en el software MestReNova v.11.0.0-17609.

RESULTADOS

Reportes anteriores sobre la reacción de Biginelli, en su mayoría coinciden que la síntesis de los núcleos, realizada mediante microondas, debe ser realizada entre 100 y 300 W. En lo respectivo al método de purificación, diversos autores reportan la cristalización del producto desde etanol o acetato de etilo y el uso de la cromatografía en columna.

En lo relacionado a la obtención del núcleo, se realizó el seguimiento de la reacción, cada 5 minutos (Figura 2), se decidió detener la reacción a los 20 min, ya que se observa el aumento de la concentración de un posible subproducto (4, $R_f = 0.48$) ya que este crece proporcionalmente con el tiempo de reacción, pero con menor intensidad, con la señal del probable producto H (3, $R_f = 0.34$) [Figura 3], lo anterior

resulta, al ser la señal con mayor concentración. Se observó también, la presencia de un posible intermediario (2, $R_f = 0.15$); se decidió esto, a pesar de que la presencia de materia prima, salicilaldehído G (6, $R_f = 0.90$) y tiourea A (1, $R_f = 0.07$), ya que el crudo de reacción no reflejaba la presencia de acetoacetato de metilo F (5, $R_f = 0.48$).

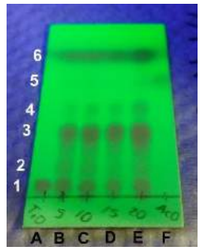


Figura 2. Transcurso de la reacción. Placa cromatográfica, vista bajo luz UV 254 nm

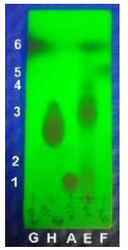


Figura 3. Fracciones recuperadas y conjuntadas del producto. Placa cromatográfica, vista bajo luz UV 254 nm

El crudo de reacción se lavó con hexano, agua y se purificó mediante cromatografía en columna, lo anterior debido a que el producto no pudo ser extraído mediante cristalización. La columna se eluyó recolectando fracciones de 25 mL las cuales se concentraban a 70 °C, recuperando y reutilizando el disolvente hacia la columna.

La presencia del producto 3 comenzó en la fracción 39, combinada con el subproducto 4. Las fracciones reunidas, 45-60 H (Figura 3), fueron aquellas en las que el producto aparecía puro (Figura 2). Se realizó un análisis mediante CCF, para comprobar su pureza, comparado con las materias primas, salicilaldehído G, tiourea A, acetoacetato de metilo F y el crudo de reacción E. La fracción obtenida, polvo blanco, indica un 24.6 % de rendimiento en la reacción, con punto de fusión entre 202-204 °C, soluble en metanol, parcialmente soluble en acetona, acetato de etilo, etanol y 2-propanol e insoluble en cloroformo y hexano.

El bajo rendimiento presentado pudo deberse a que el crudo de reacción presentaba señales de contener una cantidad significativa de materia prima, así como de subproducto, el cual según la literatura (A. Kumar, 2007), podría corresponder a la posterior epoxidación sobre el carbono C-6, del hidroxilo en el salicilaldehído. La muestra fue enviada fuera de la institución para elucidación por RMN de ^{1}H, sin embargo, los resultados no se pudieron obtener hasta la fecha.

Por otra parte, la predicción del espectro de RMN, se realizó mediante el software en un equipo de 500 MHz, en cloroformo-*d* a 64 mil puntos, con el fin de facilitar la elucidación, al momento de recibir los resultados. El espectro obtenido (Figura 4).

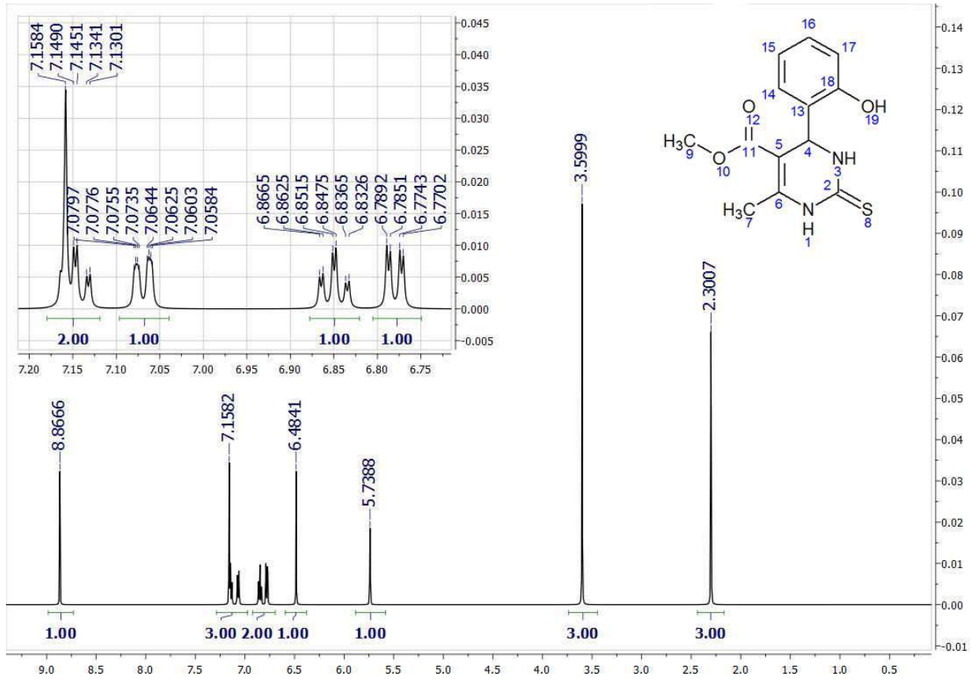


Figura 4. Espectro de ^{1}H RMN predicho para la DHPM sintetizada

Es posible observar que el espectro presenta 10 señales correspondientes a los tipos de hidrógenos en la estructura. La señal más desplazada hacia campo bajo, corresponde al hidrógeno 1, H-1 (sa, δ = 8.87 ppm; 1H) debido a la presencia del doble enlace y el grupo tionilo, en cambio, el efecto inductivo de la posición C-4, provoca un desplazamiento hacia campo alto del H-3 (sa, δ = 7.16 ppm; 1H), donde se superpone con las señales correspondientes al aromático. La presencia del hidroxilo en C-18, desactiva las posiciones donde se encuentran H-17 (dd, δ = 6.78 ppm, *J*= 7.4, 2.0 Hz; 1H) y H-14 (d, δ = 7.07 ppm, *J*= 7.4 Hz; 1H), sin embargo, la cercanía de H-14 con el núcleo, desplaza la señal a campo alto. Por otro lado, las señales correspondientes a H-14 (d, δ =7.07, *J*= 7.4 Hz; 1H) y H-17 (dd, δ = 6.78, *J*= 7.4, 2.0 Hz; 1H), se presentan a campo alto debido a la posición del hidroxilo, lo que provoca, un desplazamiento de H-14 hacia campo bajo.

Aquellas señales fuera de la región donde se presentan los aromáticos H-19 (sa, δ = 6.48; 1H), desplazada por la presencia del aromático y el oxígeno, H-4 (sa, δ = 5.74 ppm; 1H), que se desplaza medianamente debido a los sustituyentes en esta posición y; H-9 (s, δ = 3.60 ppm; 3H) y H-7 (d, δ = 2.30 ppm, *J*= 1.0 Hz; 3H), correspondientes a los metilos, el primero desplazado hacia campo bajo debido a su enlace directo al éster.

CONCLUSIONES

Se llevó a cabo la recopilación y revisión bibliográfica, encontrando un rango de 100 y 300 W, por un tiempo de entre 10 y 20 minutos. De tal modo que la síntesis del núcleo 4-(2-hidroxifenil)-6-metil-5-metoxicarbonil-3,4-dihidropirimidin-2(1H)-tiona, se realizó mediante irradiación por microondas sin presencia de disolvente alcanzando un rendimiento del 24.6 %, posterior a su purificación por cromatografía en columna. Se realizó además la predicción de un espectro de ^{1}H-RMN, y sobre este, la asignación de las señales correspondientes a la estructura, desplazadas por la presencia de los sustituyentes presentes en la molécula. Sería necesario, para trabajos posteriores, realizar ensayos con diversos catalizadores para elevar rendimientos y elevar la rentabilidad del proceso.

BIBLIOGRAFÍA

ABBAS, E. M. H. (2008). "Behaviour of Salicylaldehyde and Some of Its Derivatives in the Biginelli Reaction for the Preparation of Aryl Tetrahydropyrimidines" en *Turkish Journal of Chemistry,* Núm. 3, Vol. 32, Abril, [pp. 4569-4571].

DING, L. (2012) "Synthesis, Crystal Structure and Anticancer Activities of Tetrahydropyrido[4,3-d]dihydropyrimidine-2-thiones", en *Chinese Journal of Chemistry*, Núm. 10, Vol. 10, [pp. 2509-2516].

KAUR, R. (2013). "Design, Synthesis and Study of Fused 1,4 dihydroPyrimidines of Biological Interest-A Review" en *Journal of Applibable Chemistry*, Núm. 2, Vol. 5, Agosto, [pp. 1102-1115].

LAURO, G. et. al. (2014) "Exploration of the dihydropyrimidine scaffold for the development of new potential anti-inflammatory agents blocking prostaglandin E2 synthase-1 enzyme (mPGES-1)" en *European Journal of Medicinal Chemistry*, Vol. 80, Abril, [pp. 407-415].

LIU, Z. (2016). "New Efficient Synthesis of 3,4-Dihydropyrimidin- 2(1H)-ones Catalyzed by Benzotriazolium-Based Ionic Liquids under Solvent-Free Conditions" en *Molecules*, Núm. 4, Vol. 21, Abril, [pp. 462].

MANHAS, M. S. (2006). "Microwave initiated reactions: Pechmann coumarin synthesis, Biginelli reaction, and acylation" en Tetrahedron Letters, Núm. 14, Vol. 47, Abril, [pp. 2423–2425].

MURTHY, Y.L.N. (2012) "Solvent free synthesis of 3,4-dihydropyrimidine-2-(1H)- ones/thiones catalyzed by N,O-bis(trimethylsilyl)acetamide and dicyclohexyl carbodimide" en *Arabian Journal of Chemistry*, Núm. 2, Vol. 4, [pp. 125-24 4, Abril, [pp. 125-242].

PETERSON, E. (2015). *Green Chemistry Strategies for Drug Discovery*, Cambridge: The Royal Society of Chemistry.

YADLAPALLI, R. (2012). "Synthesis and in vitro anticancer and antitubercular activity of diarylpyrazole ligated dihydropyrimidines possessing lipophilic carbamoyl group" en *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Núm. 22, Marzo, [pp. 2708–2711].

ZARE, A. (2016). "A green approach for the synthesis of 3,4-dihydropyrimidin-2-(1H)-ones (and -thiones) using N,N-diethyl-N-sulfoethanaminium hydrogen sulfate" en *Journal or Molecular Liquids*, Núm, 216, Enero, [pp. 364-369].

LAL, J, (2016) "Synthesis and pharmacological activity evaluation of curcumin derivatives" en *Chinese Chemical Letters*, Núm. 3, Vol. 27, [pp. 305-486].

ZHOU, Z.-L. et. al. (2016). "Bronsted acidic ionic liquid [C3SO3HDoim]HSO4 catalyzed one-pot three-component Biginelli-type reaction: An efficient and solvent-free synthesis of pyrimidinone derivatives and its mechanistic study" en *Chinese Chemical Letters*, Núm. 2, Vol. 27, Febrero, [pp. 226–230].

PURIFICACIÓN DE H^+-ATPASA A PARTIR DE MEMBRANA PLASMÁTICA DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE Y PURIFICACIÓN DE CA^{2+} ATPASA A PARTIR DE TEJIDO MUSCULAR DE CONEJO

María Fernanda Bajonero Arroyo[1] y José Guadalupe Sampedro Pérez[2]

RESUMEN

Las ATPasas constituyen un amplio grupo de enzimas cuya función es la hidrólisis o la síntesis de ATP; dentro de este grupo se encuentran la H^+-ATPasa y la Ca^{2+}-ATPasa. La actividad de ambas ATPasas es importante para el correcto funcionamiento celular por lo que su estudio se considera relevante. La obtención de ambas ATPasas en forma pura permitiría la realización de estudios estructurales y cinéticos en diversas condiciones. En el presente reporte se detalla la manera en que la H^+-ATPasa y la Ca^{2+}-ATPasa fueron purificadas a partir de *Saccharomyces cerevisiae* y de músculo de conejo. En la purificación de las enzimas se utilizaron las técnicas de centrifugación diferencial y ultracentrifugación, así como la realización de geles de poliacrilamida para confirmar la purificación de dichas enzimas.

ABSTRACT

ATPases are a large group of enzymes whose function is the hydrolysis or synthesis of ATP; H^+-ATPase and Ca^{2+}-ATPase are within this group. The activity of both ATPases is important for correct cell function; thus their study is considered relevant. In this regard, the isolation of both ATPases at high purity is a priority, as it would allow structural and kinetics studies. In this report, it is described the purification of H^+-ATPase and Ca^{2+}-ATPase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and rabbit muscle. Differential centrifugation and ultracentrifugation were used for enzymes purification. Polyacrylamide gels and Coomassie blue stain were performed in order to confirm the presence of the purified enzymes.

Palabras clave: enzimas, ATPasas, P-ATPasas, H^+-ATPasa, Ca^{2+}-ATPasa, purificación.

INTRODUCCIÓN

Las ATPasas son proteínas de tipo transmembranal, cuya función es la hidrólisis o la síntesis de ATP acoplada al transporte activo de cationes a través de la membrana. En general, se puede mencionar que existen 3 tipos diferentes de ATPasas, los cuales son: las ATPasas de tipo P que se encuentran localizadas en la membrana plasmática que son las encargadas del transporte de cationes (H^+, Na^+, K^+, Cu^{2+}, Cd^{2+} y Mg^{2+}) en contra de un gradiente de concentración y son autofosforiladas por el ATP durante dicho proceso; las ATPasas de tipo F (F_1F_0) cuya función es la translocación de protones hacia el interior de las mitocondrias y la síntesis de ATP; las ATPasas de tipo V que se encuentran presentes en las membranas vacuolares de las plantas y que pueden considerarse homólogas a las ATPasas de tipo F; las

[1] Instituto Tecnológico Superior de Irapuato; Carretera Irapuato-Silao km 12.5, C.P. 36821, Irapuato, Guanajuato, MÉXICO; marifer1995com22@gmail.com

[2] Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Instituto de Física, Materiales Biomoleculares y Biofísica; Av. Manuel Nava #6, Zona Universitaria, C.P. 78290, San Luis Potosí, San Luis Potosí; sampedro@ifisica.uaslp.mx.

ATPasas de tipo ABC cuyo nombre deriva de las siglas de su denominación en inglés "ATP-binding cassette" tienen entre sus funciones principales la resistencia a ciertos fármacos, además algunas alteraciones de las mismas se encuentran implicadas en procesos patológicos. [1] [2]

La H^+-ATPasa de la membrana plasmática de hongos se fosforila transitoriamente como parte del ciclo catalítico en dónde se hidroliza el ATP. [3] El estudio de la H^+-ATPasa se remonta a los años sesenta [4], pero la propuesta de la existencia de este tipo de transportadores en la membrana plasmática de levaduras fue presentada hasta los años 70 por Rothstein [5]; sin embargo, muchos de los estudios realizados en este tema datan de las década de los ochenta y noventa.

La utilización de la levadura *S. cerevisiae* para la obtención de la H^+-ATPasa se debe a que esta especie es considerada un modelo en el estudio de las levaduras. En este estudio se utilizó la cepa silvestre BY4741 y otra que presenta la eliminación del gen codificante de la proteína BMH1; lo anterior debido a que se ha observado que una modificación de la proteína BMH1 puede llegar a causar modificaciones menores en el crecimiento y viabilidad de las células de levadura. [6] [7]

Por otra parte, la Ca^{2+}-ATPasa es una enzima hidrolítica que posee dos estados energéticos en su ciclo: E1 de alta afinidad al calcio y E2 de baja afinidad al calcio [8]; su actividad es el trasporte de calcio al lumen del retículo sarcoplásmico de las células musculares utilizando la energía de hidrólisis del ATP. [9] Por lo anterior, la obtención de la enzima pura permitiría la realización de estudios estructurales y cinéticos que brindarían información sobre su estructura y función.

MARCO TEÓRICO

El proceso de purificación de proteínas forma parte de una serie de actividades complejas que permiten el estudio de dichas moléculas, por ello es necesario el establecimiento de las técnicas adecuadas que permitan lograr los mejores resultados dentro del proceso. El análisis científico de las ATPasas, específicamente aquellas que son objeto de estudio en este reporte, puede remontarse hasta la década de los setenta, tal como lo muestra el artículo publicado por Rothstein, A. [4]; sin embargo, el proceso de purificación de dichas enzimas comenzó a ser mejorado en las décadas de los ochenta y noventa, cuando el estudio de las ATPasas, especialmente la H^+-ATPasa comenzó a tener una mayor relevancia, tal como lo demuestra el artículo realizado por Perlin, D. *et al* en 1989[10], donde se menciona la utilización de la técnica de centrifugación para obtener la H^+-ATPasa. Posterior a las décadas anteriormente mencionadas, se pueden encontrar una gran variedad de artículos donde el uso de la técnica de centrifugación es empleada para la obtención de ATPasas específicas, tal es el caso de aquel publicado por Sampedro, J. *et al* [11], en el año 2002.

MÉTODOS Y MATERIALES

Purificación de las membranas plasmáticas

El proceso de purificación comenzó cuando una muestra de *S. cerevisiae* de la cepa BY4741 y otra con la mutación denominada Δ*BMH1* se colocaron en medio YPD y se incubaron durante 25 hrs a 30 ºC con una agitación de 250 rpm, para después obtener la biomasa por medio de centrifugación a 5,000 rmp durante 10 min. Posteriormente, las células de levadura fueron incubadas a 30 ºC, en buffer de sorbitol 1.0 M el cual contenía liticasa (50 U/g levadura), por aproximadamente 2 hrs durante las cuales se tomó lectura de absorbencia cada 15 min, con el propósito de detectar una disminución en la misma la cual indicaría la formación de esferoplastos. Una vez se terminó de medir la absorbencia, ambas muestras se sometieron a sonicación y posteriormente se centrifugaron a 3,500 rpm durante 10 min, se obtuvo una pastilla y un sobrenadante (respectivamente). El sobrenadante obtenido fue centrifugado a 12,000 rpm durante 30 min y se obtuvo un sobrenadante que se centrifugó a 18,000 rpm durante 60 min para

nuevamente obtener un sobrenadante y una pastilla, dicha pastilla fue resuspendida con ayuda de un pincel en buffer que contenía EGTA.

Una vez resuspendida la pastilla, ésta se centrifugó a 18,000 rpm durante 60 min y se obtuvo una pastilla. La misma fue resuspendida con pincel en buffer EGTA, la muestra fue depositada en un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se guardó a -72 ºC para su conservación y evitar que las proteínas presentes en dicha muestra perdieran actividad. Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida para corroborar la presencia de la enzima en las membranas de ambas cepas.

Purificación de la H^+-ATPasa a partir de las membranas plasmáticas

Se procedió a diluir las muestras (BY4741 y Δ*BMH1* de *S. cerevisiae*) en una solución buffer hasta alcanzar un volumen de 20 mL; se sometieron a agitación constante durante 10 min, posteriormente dichas muestras se centrifugaron a 100,000g durante 60 min.

Al término de la centrifugación, se realizó un ensayo de Lowry a la pastilla y el sobrenadante obtenidos para determinar la cantidad de proteína presente. La pastilla se disolvió con ayuda de un pincel en una solución amortiguadora y se centrifugó a 100,000g durante 60 min.

Como resultado del proceso anterior se obtuvo un sobrenadante al que se le determinó la cantidad de proteína presente, una vez hecho el cálculo, se procedió a agregar azolectina (previamente sometida a sonicación) y zwittergent que se mezcló con ayuda de un equipo Wise Stir. Después de realizado el paso anterior, se tomaron 8 mL de la muestra de membranas obtenida de la cepa BY4741 los cuales fueron colocados en un gradiente de trehalosa (45%, 40%, 35% y 30%) para posteriormente ser centrifugados a 100,000g durante 14 hrs. Al finalizar el proceso anterior, se recuperó la proteína presente entre las fracciones de trehalosa, así como también se recuperó la fracción remanente de muestra y otra fracción que se encontraba por encima del gradiente de trehalosa de 30% la cual presumiblemente correspondía a lípidos.

Purificación de Ca^{2+}-ATPasa

La purificación comenzó con la molienda de tejido muscular proveniente de las extremidades traseras de un conejo, para centrifugarse a 3,000 rpm durante 5 min; el sobrenadante obtenido se centrifugó a 9,200 rpm durante 15 min, del cual se obtuvo un sobrenadante que fue centrifugado a 16,700 rpm durante 2 hrs. La pastilla resultante fue dividida en dos fracciones las cuales se solubilizaron con sacarosa y trehalosa, respectivamente. Posteriormente, ambas fracciones fueron centrifugadas a 10,100 rpm durante 4 min; el sobrenadante obtenido se llevó a una concentración de 0.6M de KCl y 0.15M de sacarosa o trehalosa (de acuerdo a la fracción solubilizada con el azúcar correspondiente) y se centrifugaron a 18,000 rpm durante 2 hrs con 45 min. Las pastillas obtenidas se solubilizaron en buffer de EGTA 2mM, KCl 0.1M, TRIS 5mM y 0.3M de sacarosa o trehalosa según correspondiera y se guardaron a -72 ºC para su conservación.

Electroforesis en geles de poliacrilamida

Para corroborar la presencia de la ATPasa y por ende, la correcta realización del proceso, se procedió a realizar un gel de poliacrilamida.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una vez realizado el proceso de purificación de las enzimas se procedió a la realización de la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida con el propósito de visualizar la presencia de las ATPasas purificadas.

En las siguientes figuras, se muestran los geles SDS-PAGE de las muestras correspondientes al proceso de obtención de membranas a partir de *S. cerevisiae* de la cepa BY4741 y de la mutación Δ*BMH1*. En los mismos geles también se corrieron muestras que correspondían a distintas fracciones (sobrenadante o

pastilla) obtenidas en el proceso de purificación; esto con el propósito de comprobar que la proteína no había quedado en alguna otra fracción al momento de purificarla.

En las figuras antes mencionadas también se puede observar una flecha que indica la banda correspondiente a un peso de 100kDa, en la cual se encuentra la H^+-ATPasa; la aseveración anterior se hace en base a experimentaciones similares previamente realizadas en este laboratorio[12]; por lo que, al observar la presencia de dicha banda en el carril donde se colocó la muestra de membrana (de la cepa BY4741 y de la mutación Δ*BMH*, respectivamente), se puede afirmar que el proceso de obtención de membranas se llevó a cabo de manera correcta.

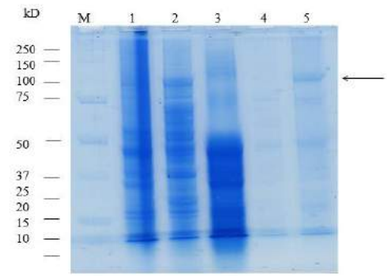


Figura 1. Gel de membranas obtenidas de la cepa BY4741. Carril 1, pastilla de la primera centrifugación; carril 2, pastilla de la segunda centrifugación; carril 3, sobrenadante de la tercera centrifugación; carril 4, sobrenadante de la cuarta centrifugación; carril 5, membranas obtenidas en dilución 1:10.

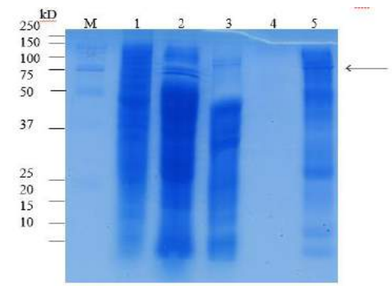


Figura 2. Gel de membranas obtenidas de la cepa con mutación ΔBMH1. Carril 1, pastilla de la primera centrifugación; carril 2, pastilla de la segunda centrifugación; carril 3, sobrenadante de la tercera centrifugación; carril 4, membranas obtenidas (sin diluir).

A continuación, se muestra el gel donde se pueden observar, tenuemente, algunos de los estados oligoméricos de la H^+-ATPasa obtenida a partir de la cepa BY474, ya que fue la única muestra de membrana sometida al proceso de purificación en gradiente de trehalosa; la muestra de membrana de la cepa con la mutación Δ*BMH1* no se sometió al proceso de purificación anteriormente mencionado debido a que la cantidad de proteína presente era muy poca (2.7 mg/ml).

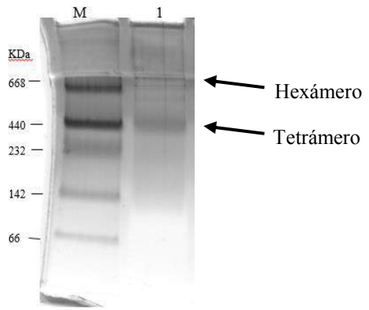


Figura 3. BN-PAGE de los distintos estados oligoméricos de la H^+-ATPasa de la cepa BY4741. Carril 1, muestra obtenida del proceso de purificación.

Así mismo, se realizó un gel en poliacrilamida para corroborar la presencia de la Ca^{2+}-ATPasa obtenida del tejido muscular de conejo. En la figura siguiente se puede observar la banda que indica la presencia de dicha enzima, en un peso de alrededor de 100 kDa. En los demás carriles del gel se colocaron las distintas fracciones (de sobrenadante y pastilla) obtenidas durante el proceso.

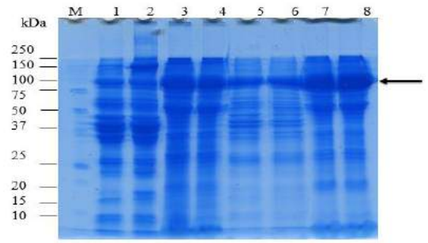


Figura 4. Gel de Ca^{2+}-ATPasa obtenida. Carril 1, pastilla de la primera centrifugación; carril 2, pastilla de la segunda centrifugación; carril 3, pastilla (en sacarosa) de la cuarta centrifugación; carril 4, pastilla (en trehalosa) de la cuarta centrifugación; carril 5, sobrenadante (en sacarosa) de la quinta centrifugación; carril 6, sobrenadante (en trehalosa) de la quinta centrifugación; carril 7, Ca^{2+}-ATPasa (en sacarosa) dilución 1:10; carril 8, Ca^{2+}-ATPasa (en trehalosa) dilución 1:10.

CONCLUSIONES

Como ya se ha mencionado anteriormente, la purificación de las enzimas mencionadas en este reporte constituye un paso esencial dentro del estudio de las mismas, además de que dicho proceso requiere de gran precisión al momento de llevarse a cabo; por ello, los resultados obtenidos durante esta estancia de investigación representan la culminación de actividades que permitirán el estudio posterior de las funciones de ambas ATPasas, lo cual podrá llegar a brindar información relevante sobre las mismas, y ésta podrá ser aplicable en experimentos futuros.

BIBLIOGRAFÍA

[1] Voet, D.; Voet, J. (2004). *Bioquímica*. 3º Edición. Argentina: Editorial Médica Panamericana. 766-770.

[2] Lorenzo, P.; Moreno, A.; Lizasoain, I; Leza, J.; Moro, M.; Portolés, A. (2008). *Farmacología básica y clínica*. 18º Edición. España: Editorial Médica Panamericana. 93-95.

[3] Taiz, L; Zeiger, E. (2006). *Fisiología vegetal*. España: Publicacions de la Universitat Jaume I. 185-189.

[4] Ramírez, J; Peña, A. (2000). *Intercambiadores catión/protón en levaduras*. Revista Latinoamericana de Microbiología. Vol. 42. 181-187.

[5] Rothstein, A. (1974). *Relationship of cation influxes and effluxes in yeast*. The Journal of General Physiology, 64, 608-621.

[6] Gelperin, D.; Weigley, J.; Nelson, K.; Roseboom, P.; Irie, K.; Matsumoto, K; Lemmon, S. (1995). *14-3-3 proteins: Potential roles in vesicular transport and Ras signaling in Saccharomyces cerevisiae*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Diciembre. 11539-11543.

[7] Trembley, M.; Berrus, H.; Whicher, J.; Humphrey-Dixon, E. (2014). *The yeast 14-3-3 proteins BMH1 and BMH2 differentially regulate rapamycin-mediated transcription*. Bioscience reports. Abril.

[8] Velandia, M.; Garavito, Z.; Caldas, M.; Hurtado, H. (2001). *ATPasa de calcio en el sistema nervioso.* Revista Biomédica del Instituto Nacional de Salud de Colombia. Vol. 21. 62-9.

[9] Berg, J.; Tymoczko, J.; Stryer, L. (2007). *Bioquímica*. 6º Edición. España: Editorial Reverté. 354-357.

[10] Perlin, D.; Harris, S.; Seto-Young, D.; Haber, J. (1989). *Defective H^+-ATPase of Hygromycin B-resistant pma1 Mutants from Saccharomyces cerevisiae*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. Vol. 264. 21857-21864

[11] Sampedro, J.; Muñoz-Clares, R.; Uribe, S. (2002). *Trehalose-Mediated Inhibition of the Plasma Membrane H^+-ATPase from Kluyveromyces lactis: Dependence on Viscosity and Temperature*. Journal of Bacteriology. 43844391

[12] Ávila, N.; Sampedro, J.; De La Cruz, V. (2015). *Purificación de la H+-ATPasa de la membrana plasmática de Saccharomyces cerevisiae*. Verano de la Ciencia de la Región Centro. Volumen I. 826-830

IDENTIFICACION DE MACROINVERTEBRADOS ACUATICOS DE LOS RIOS DE JALPAN DE SERRA QUERETARO

Ballesteros García Juan Diego Universidad[1] y Juan Pablo Ramírez Herrejón[2]

RESUMEN

En el siguiente trabajo se menciona la metodología para llevar a cabo la clasificación taxonómica de algunos de los macro invertebrados presentes en los ríos de Jalpan Querétaro, además de cómo poder colectarlos en campo. Este trabajo no se realizó ningún tipo de experimentación, pero es una fuente importante de información para poder determinar la calidad del hábitat y del agua, tomando como un potencial indicador los macro invertebrados presentes, como es el caso de que en los ríos con alta contaminación el orden de las moscas y moscos (Diptera) aumenta sus poblaciones, al contrario de los ríos poco contaminados donde aparecen un gran número de ordenes diferentes.

ABSTRACT

In this paper, the methodology mentioned to conduct the taxonomic classification of some of the macro invertebrates in rivers of Jalpan Queretaro, and how to collect them in the field. This work any experiment was not performed, but it is an important source of information to determine the quality of habitat and water, taking as a potential indicator macroinvertebrates present, as is the case in rivers with high pollution the order of flies and mosquitoes (Diptera) increases their populations, unlike the slightly polluted rivers where a large number of different orders appear.

INTRODUCCIÓN

Un organismo es un indicador de calidad de agua cuando este se encuentra invariablemente en un ecosistema de características definidas y cuando su población es porcentualmente mayor o ligeramente similar al resto de los organismos con los que comparte el mismo hábitat (Pérez, 1999).

En este punto los macroinvertebrados suelen ser utilizados comúnmente como indicadores de calidad, no solo del agua sino también como calidad del ecosistema. La importancia de estos insectos radica en que los diferentes órdenes presentan niveles de tolerancia muy variados, asociados a los diferentes tipos de perturbaciones del ecosistema y tal como mencionan Ladrera, Rieradevall y Prat (2013) se pueden asociar la presencia de diferentes grupos de macroinvertebrados con la existencia o no de alguna perturbación en el ecosistema.

[1] Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento Forestal Calzada Antonio Narro 1923, Buenavista, 25315 Saltillo, COAH. Jdbg_mk@hotmail.com
[2] Universidad Autónoma de Querétaro. Departamento de Manejo Integrado de Cuencas. Cerro de Las Campanas, s/n, Las Campanas, 76010 Santiago de Querétaro, QRO. ramirezherrejon@gmail.com

Ladrera (2012). Menciona que de los macroinvertebrados más importantes y considerados como indicadores se encuentran los insectos acuáticos donde los más abundantes y con una distribución más alta se encuentran los órdenes Ephemeroptera, Plecoptera, Odonata, Hemiptera, Coleoptera, Trichoptera y Diptera, donde como menciona Roldan (1999, citado por González et al. ND), los órdenes Ephemeroptera y Plecoptera son considerados los mejores indicadores para buena calidad de agua, al contrario del orden Diptera que son los mejores indicadores de una pobre calidad de agua.

METODOS Y MATERIALES.

Para recolectar los macro invertebrados en el rio primero se deben identificar las unidades hidromorfologicas, después con ayuda de una red para raspar superficialmente el sustrato del rio y un traje especial de hule llamado wader, este impide que el agua toque el cuerpo se toman 3 muestras por cada unidad.

Cuando se recoge el sustrato este se deposita en una charola plástica, y se procede a separar con pinzas los insectos. Esto último también se puede hacer en el laboratorio, pero es preferible hacer la separación en campo ya que los macros se están moviendo, después se colocan en un frasco de 75 ml con alcohol al 70%, se etiquetan y se guardan.

Los macro invertebrados se identificaron a nivel de familia con ayuda de claves de identificación de macro invertebrados acuáticos donde de menciona las características que distinguen a cada familia.

Los macro invertebrados fueron colocados en cajas de Petri con alcohol al 70% para evitar que se secaran. Para poder ver las partes de los macro invertebrados se utilizó un estereoscopio y pinzas para poder moverlos.

Al terminar con la identificación de las familias se colocaron en frascos de 75 ml glicerina hasta cubrirlos y se rellenó el resto con alcohol al 70%. Además se colocaron 2 etiquetas adentro de papel albanene escritas con lápiz, la primera con la información del sitio y el método de recolecta, en la segunda la información de la familia y la persona que identifico la familia. En la tapa del fisco también se colocó la clave del sitio y la familia que se colocó en él.

RESULTADOS

Los macroinvertebrados que fueron colectados en los ríos de Jalpan se muestran en la tabla 1, donde podemos observar que el orden que tuvo la mayor cantidad de individuos, fue el orden Odonata, orden al que pertenecen las libélulas y los caballitos del diablo.

Tabla 1. Ordenes de macroinvertebrados colectados en los ríos de Jalpan Querétaro.

Orden	Individuos	Orden	Individuos
Ephemeroptera	124	Lepidioptera	5
Odonata	239	Crustacea	0
Orthoptera	0	Mollusca	85

Plecoptera	21	Turbellaria	13
Hemiptera	222	Acari	0
Megaloptera	3	Pulmonata	113
Trichoptera	179	Annelidae	116
Coleoptera	103	Corbiculidae	78
Diptera	203	Haplotaxida	10

Los insectos colectados en cada uno de los ríos de Jalpan se muestran en las siguientes tablas.

En la tabla numero 2 tenemos al rio de "Puente USEBEQ" donde el orden Odonata tiene la mayor cantidad de muestras presentes, en segundo lugar el orden Pulmonata, y por último el orden Megaloptera con solamente una muestra, algunos otros ordenes no tuvieron ninguna muestra en este rio.

Tabla 2. Macroinvertebrados colectados en Puente USEBEQ

Puente USEBEQ			
Orden	**Individuos**	**Orden**	**Individuos**
Ephemeroptera	8	**Lepidioptera**	0
Odonata	68	**Crustacea**	0
Orthoptera	0	**Mollusca**	3
Plecoptera	0	**Turbellaria**	1
Hemiptera	18	**Acari**	0
Megaloptera	1	**Pulmonata**	28
Trichoptera	19	**Annelidae**	3
Coleoptera	2	**Corbiculidae**	5
Diptera	16	**Haplotaxida**	0

Para rio "Saldiveña" como se muestra en la tabla numero 3 el orden Odonata sigue siendo el que tiene el mayor número de muestras, pero a diferencia del rio anterior aquí se presentan un mayor número de muestras por orden, además de que se hacen presentes muestras para los órdenes Haplotaxida y Lepidoptera.

Tabla 3. Macroinvertebrados colectados en rio Saldiveña

Saldiveña

Orden	**Individuos**	**Orden**	**Individuos**
Ephemeroptera	18	**Lepidioptera**	1
Odonata	82	**Crustacea**	0
Orthoptera	0	**Mollusca**	70
Plecoptera	0	**Turbellaria**	7

Tabla 4. Macroinvertebrados colectados en el rio Trapiche

El Trapiche

Orden	**Individuos**	**Orden**	**Individuos**
Ephemeroptera	20	**Lepidioptera**	1
Odonata	21	**Crustacea**	0
Orthoptera	0	**Mollusca**	0
Plecoptera	21	**Turbellaria**	0
Hemiptera	31	**Acari**	0
Megaloptera	0	**Pulmonata**	45
Trichoptera	0	**Annelidae**	35
Coleoptera	5	**Corbiculidae**	44
Diptera	44	**Haplotaxida**	7

Hemiptera	15	**Acari**	0
Megaloptera	2	**Pulmonata**	0
Trichoptera	78	**Annelidae**	0
Coleoptera	24	**Corbiculidae**	0
Diptera	14	**Haplotaxida**	0

En el "Trapiche" el orden con mayor número de muestras fue el orden Trichoptera, seguido por el orden Coleoptera, para los otros ordenes las muestras se mantienen muy bajas y algunos como el caso de Mollusca y Corbiculidae no aparecieron en este rio.

En el rio "La Purísima" el orden Diptera (moscas y moscos) fue el que tuvo la mayor cantidad de muestras presentes, seguido por el orden Annelida (sanguijuelas) ambos con una alta cantidad de muestras los otros órdenes a excepción de donde no hubo ninguna muestra, la cantidad de insectos colectados fue muy similar. De acuerdo con Gamboa y colaboradores (2008), el orden Diptera son considerados como buenos indicadores de aguas de baja calidad.

Tabla 5. Macroinvertebrados colectados en el rio la Purísima

Purísima

Orden	**Individuos**	**Orden**	**Individuos**
Ephemeroptera	53	**Lepidioptera**	1
Odonata	63	**Crustacea**	0
Orthoptera	0	**Mollusca**	11
Plecoptera	0	**Turbellaria**	5
Hemiptera	54	**Acari**	0
Megaloptera	0	**Pulmonata**	25
Trichoptera	3	**Annelidae**	78
Coleoptera	53	**Corbiculidae**	27
Diptera	101	**Haplotaxida**	0

Tabla 6. Macroinvertebrados colectados en el rio Santa María

Santa María

Orden	**Individuos**	**Orden**	**Individuos**
Ephemeroptera	25	**Lepidioptera**	2
Odonata	5	**Crustacea**	0
Orthoptera	0	**Mollusca**	1
Plecoptera	0	**Turbellaria**	0
Hemiptera	104	**Acari**	0
Megaloptera	0	**Pulmonata**	15
Trichoptera	79	**Annelidae**	0
Coleoptera	19	**Corbiculidae**	2
Diptera	28	**Haplotaxida**	3

En el rio Santa María el orden con el mayor número de muestras fue el orden Hemiptera, orden de las "chinches". En segundo lugar fue el orden Trichoptera en los otros ordenes podrían considerarse presentes por la poca cantidad de muestras. Al respecto de esto Roldan (1999, citado por González et al. ND) los órdenes Ephemeroptera y Hemiptera son indicador es de buena calidad de agua.

CONCLUSIONES

Como conjunto los ríos que pertenecen a la comunidad de Jalpan de Serra Querétaro se puede establecer que la calidad del agua de media a baja, por la gran cantidad de muestras que aparecen en los órdenes Diptera indicando un calidad pobre de agua, sin embargo también aparece una cantidad aún mayor de

Hemípteros y una cantidad considerable de Ephemeropteros, los cuales son indicadores de buena calidad de agua.

Por separado en cada uno de los ríos se puede concluir, por ejemplo en puente USEBEQ la calidad de agua es media, lo cual se puede ver por la cantidad tan alta de Odonatos, pero para el orden Diptera aún no aumenta lo suficiente para ser considerado como una calidad pobre de agua.

Para el rio Saldiveña y el Trapiche las calidades de agua también son media baja, siento el rio Saldiveña el que podría considerarse más contaminado de los dos por la gran cantidad de Dípteros y Anélidos.

El rio Purísima es el rio más contaminado de todos, debido a que presenta la mayor cantidad de Dípteros y Anélidos, donde deberían de tomarse medidas para remediar el problema antes de que sea mucho más grande, al contrario del Rio Santa María es el rio con la mejor calidad de agua, además de ser el rio más grande de todos y considerado como un área para el turismo, las condiciones son buenas.

BIBLIOGRAFIA

Ladrera F. R. (2012). Los macroinvertebrados acuáticos como indicadores del estado ecológico de los ríos. Información ambiental 39. Consultada el 15 de agosto del 2016.

Pérez G. R. (1999). Los macroinvertebrados y su valor como indicadores de la calidad del agua. Rev. Acad. Colomb. Cienc. 23(88): 375-387. Versión electrónica formato pdf. Consultada el 18 de agosto del 2016

González A. N., Sánchez M. S. & Mairena V. A. (ND) Macroinvertebrados bentónicos como bioindicadores de calidad de agua del trópico húmedo en las microcuencas de los alrededores de Bluefields, RAAS. Bluefields Indian & Caribbean University. Versión electrónica formato pdf. Consultada el 18 de agosto del 2016.

Gamboa M. Reyes R. & Arrivillaga J. (2008). Macroinvertebrados bentónicos como bioindicadores de salud ambiental BOLETÍN DE MALARIOLOGÍA Y SALUD AMBIENTAL Vol. XLVIII, Nº 2, Versión electrónica formato pdf. Consultada el 18 de agosto del 2016.

Ladrera R., Rieradevall M. & Prat N. (ND). Macroinvertebrados acuáticos como indicadores biológicos: una herramienta didáctica Departamento de Ecología, Universidad de Barcelona. Versión electrónica formato pdf. Consultada el 18 de agosto del 2016.

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO DE PLANTAS DE ZONAS NATURALES PROTEGIDAS DEL ESTADO DE GUANAJUATO

Víctor Eduardo Becerra Lira[1] y Blanca Estela Gómez Luna[2]

RESUMEN

Las rizobacterias promotoras de crecimiento de plantas (PGPR) juegan un papel muy importante en el crecimiento y control de patógenos de las plantas, al igual que los sideróforos, que secuestran el hierro para que hongos patógenos no lleguen a producirse. Se requiere de un medio específico para poder aislar a las bacterias. Este medio contiene ACC desaminasa que es de vital importancia en el crecimiento de las plantas, ya que limita la producción de etileno. Se aislaron PGPR y se realizaron pruebas de antagonismo entre microorganismos fitopatógenos y PGPR, también se hicieron pruebas de germinación entre las distintas cepas para conocer que cepa es mejor y proporciona mayores beneficios a las plantas.

ABSTRACT

The promoting growth plant rhizobacteria (PGPR) play a very important role in the growth and control of phytopathogenic microorganisms, as siderophores, which sequester iron to reach phytopathogenic microorganisms not occur. It requires a specific medium to isolate bacteria. This medium contains ACC deaminase that is vital in the growth of plants by limiting the production of ethylene. PGPR were isolated and evidence of antagonism between pathogens and microorganisms PGPR were carried out germination tests were also made among different strains to know that strain is better and provides greater benefits to plants.

Plabras claves: Rizobacteria, PGPR, microorganismos fitopatógenos, fitohormonas.

INTRODUCCIÓN

Existen dos tipos de bacterias que proporcionan beneficios a la planta. Una es de tipo simbiótica, pues forma nódulos en las raíces de la planta y el otro tipo de bacteria habitan de forma libre en la tierra. Estas últimas se denominan rizobacterias promotoras del crecimiento (Penrose y Glick, 2003). Las Rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas (PGPR) por sus siglas en inglés *promoting growth plant rhizobacteria*, son significativamente relevantes para el crecimiento de las plantas. Son muchos los beneficios que aportan las PGPR a las plantas como son: un mayor crecimiento y disponibilidad de nutrientes y protección contra microorganismos fitopatógenos. Otra característica de es la producción de fitohormonas. Esta producción es importante ya que ayuda a la planta, pues aumenta su elongación de raíz o su volumen radicular entre otras características y esto ayuda a que la planta pueda asimilar de mejor manera los nutrientes (Molina-Romero Dalia*, et al*., 2015).

[1] Instituto Superior de Purísima del Rincón, Blvd. Del Valle #2301 colonia Guardarrayas, C.P. 36413, Purísima del Rincón, Guanajuato, horo_black@hotmail.com
[2] Universidad de Guanajuato, Campus Celaya-Salvatierra, Departamento de Ingeniería Agroindustrial; Prolongación Río Lerma s/n , Colonia, Nombre, C.P: 00000, Celaya, Guanajuato, be.gomez@ugto.mx

Las rizobacterias llevan a cabo su función sobre la planta mediante dos mecanismos: directo e indirecto. Los mecanismos directos ayudan a las plantas para mejorar su nutrición, pues existe mayor disponibilidad de nutrientes. Mientras que los mecanismos indirectos juegan un papel antagónico contra microorganismos fitopatógenos (Esquivel-Cote Rosalba, *et al., 2013*).

ACC desaminasa

Las PGPR son beneficiosas para el crecimiento de las plantas ya que el medio que las rodea es cambiante y las fuerzan a producir etileno (Penrose y Glick, 2003). La producción de etileno detiene la elongación de la raíz, acelera la senescencia de las flores y finalmente provoca la muerte de la planta. La producción de etileno se lleva a cabo en cualquier tejido de la planta y su síntesis comienza cuando el ATP activa a la metionina y es catalizada por SAM sintetasa el producto es S-adenosilmetionina (SAM). Posteriormente SAM se convertirá en ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) por la enzima ACC sintasa. A partir de aquí con ayuda de la enzima ACC oxidasa el etileno es sintetizado. En este paso es en donde las PGPR realizan su función, pues las PGPR convierten el ACC en α-cetobutirato y amonio mediante la enzima ACC desaminasa (Esquivel-Cote Rosalba, *et al.,* 2013).

Sideróforos

Los microorganismos que producen sideróforos capturan el hierro y esto es un factor que limita a patógenos que dependen del hierro (Bach Álvarez Teresa y Díaz Marisa, 2008). Varios estudios han demostrado que las bacterias que se asocian con las plantas llegan a producir sideróforos. La excreción de sideróforos puede llegar a ser de vital importancia para las plantas, pues puede llegar a mejorar la nutrición de las plantas y lo más importante es que puede inhibir el crecimiento de patógenos mediante el secuestro de Hierro (Souza *et al*. 2015).

METODOLOGÍA

Aislamiento de rizobacterias

Se tomaron cuatro muestras de suelo de distintos árboles. Se preparó 90 ml de agua estéril, se agregaron 15 gramos de suelo. Se agitó por 20 minutos y posteriormente se dejó sedimentar por 10 minutos.

Medio selectivo ACC para el aislamiento y purificación de rizobacterias

El medio 1-Amino-Ciclopropano-1-Carboxilato (ACC) se preparó con las indicaciones de Penrose y Glick, 2003. A este medio se le agregó 4gr/ml de KH_2PO_4, 6 gr de Na_2HPO_4, 0.2 gr de $MgSO_4$, 1 mg de $FeSO_4$, 10 µg de H_3BO_5, 10 µg de $MnSO_4$, 50 µg de $CuSO_4$, 10 µg MoO_3, 70 µg de $ZnSO_4$, glucosa 0.2%, ácido gluónico 0.2% y ácido cítrico 0.2%. La suspensión de suelo se inoculo en este medio selectivo y se incubo a 28°C por 24 horas.

Tinción Gram

Se realizó tinción Gram a los aislados, después se llevó al microscopio para determinar formas y grupo.

Medio PDA

Las cepas que se obtuvieron en el medio ACC se vuelven a sembraron en un medio PDA, el cual se preparó con 200 gr de papa se someten a ebullición con agua por 20 minutos. Se filtró y se agregó glucosa al 2% y agar al 2%.

Medio Agar CAS (Producción de Sideróforos)

Se preparó el medio agar CAS se necesitan 4 soluciones. Se esterilizó las soluciones por separado (Alexander & Zuberer, 1991). En la solución 1 o solución indicadora se mezcló 10 ml de solución 1mM de $FeCl_3.6H_2O$ (en HCl 10 mM) con 50 ml de una solución acuosa de CAS, con una concentración de 1,21 mg/ml. A esta mezcla azul oscuro se le agregó una solución de 40 ml de HDTMA, con una concentración

de 1.82 mg/ml, mientras se agitó constantemente. En la solución 2 o solución reguladora se disolvió 30.24 gr de PIPES en 750 ml de una solución de sales (0.3 gr de KH_2PO_4, 0.5 gr de NaCl y 1 gr de NH_4Cl). Se ajustó pH a 6.8 con KOH al 50%, posteriormente se aforó a 80 ml. Se agregó 15 gr de agar. En la solución 3 se añadió en 70 ml de agua 2 gr de glucosa, 2 gr de manitol, 493 mg de $MgSO_4.7H_2O$, 11 mg de $CaCl_2$, 1.17 mg de MnSO4.H2O, 1.4 mg de H_3BO_3, 0.04 mg de $CuSO_4.5H_2O$, 1,2 mg de $ZnSO_4.7H_2O$ y 1 mg de $Na_2MoO_4.2H_2O$. Mientras que en la solución 4 se preparó 30 ml de casaminoácidos al 10% (p/v) (Difco Laboratories), se esterilizó por filtración a través de una membrana Milipore tipo GS de o.22 µm de diámetro. La solución 1, 2 y 3 se esterilizó y se enfrió a 50 °C. Para la preparación del medio agar CAS se adicionó la solución 3 a la solución 2 y posteriormente se añadió la solución de casaminoácidos. Al final se añadió la solución indicadora y se agitó evitando la producción de burbujas.

Germinación

Se realizó una desinfección superficial de las semillas, lenteja y rábano, después se colocó en un medio de caldo de papa con cada una de las cepas y después se colocó 25 semillas en una caja Petri. Se dejó incubar de 24 a 48 horas para su germinación.

Confrontación contra hongos fitopatógenos

Se cultivaron los hongos fitopatógenos (*Bipolaris sp, Fusarium oxisporum y Alternaria, sp*) en una caja Petri con PDA. Se incuban por 24 horas y después se sembraron 4 cepas por cada caja Petri.

RESULTADOS

Selección de rizobacterias y tinción Gram

De las 100 cepas que se sembraron, seleccionamos las mejores 50 cepas. A las 100 cepas se les realizo tinción Gram. De las 7 Gram negativas que resultaron solo dos fueron hongos y las otras cepas resultaron positivas. Las 50 cepas seleccionadas fueron Gram positivas, solo 5 fueron negativas.

Tabla. 1. Primer cepa analizada con tinción Gram.

Cepa A		
	Cepa	Gram
1	A1- 101	-
2	A1- 102	+
3	A1-103	+
4	A1-106	+
5	A1-109	-
6	A1-111	+
7	A1-112	+
8	A1-114	-
9	A1-115	+
10	A1-116	+
11	A1-117	+
12	A1-119	+
13	A1-123	+
14	A1-124	+

Tabla. 2. Segunda cepa analizada con tinción Gram.

Cepa B		
	Cepa	Gram
1	B2-201	+
2	B2-202	+
3	B2-203	-
4	B2-205	-
5	B2-206	+
6	B2-207	+
7	B2-208	+
8	B2-210	+
9	B2-213	+
10	B2-214	+
11	B2-215	+
12	B2-218	+
13	B2-221	+
14	B2-222	+
15	B2-223	+
16	B2-225	+

Tabla. 3. Tercer cepa analizada con tinción Gram.

Cepa C		
	Cepa	Gram
1	C1-252	+
2	C1-253	+
3	C1-255	+
4	C1-256	+
5	C1-258	+
6	C1-261	+
7	C1-270	+
8	C1-275	+

Tabla. 4. Cuarta cepa analizada con tinción Gram.

Cepa D		
	Cepa	Gram
1	D1-301	+
2	D1-302	+
3	D1-303	+
4	D1-305	+
5	D1-306	+
6	D1-308	+
7	D1-312	+
8	D1-313	+
9	D1-314	+
10	D1-317	+
11	D1-318	+
12	D1-322	+

Asimilación de Hierro por Sideroforos

Una vez obtenido el medio CAS se dividió en 5 secciones, se hizo una picadura al medio de cada cepa en cada sección y a las 48 horas se observaron halos color naranja.

Germinación de Semillas con rizobacterias

Las rizobacterias en semilla de lenteja tuvieron efectos positivos, pues la mayoría de las semillas germinadas, que eran 25, superaron al control. Solo las cepas C1-275, D1-301 y D1-313 igualaron el porcentaje del control, mientras que D1-317 tuvo un porcentaje menor al control. En la Tabla 5 Se muestran las cepas que tuvieron un porcentaje mayor a 80%. Las cepas A1-109, A1-119 y D1-312 se eligieron por tener una radícula mayor a la de todas las muestras.

Tabla. 5. Porcentaje de germinación y longitud de la radícula de semillas que superaron al control.

	Cepa	No. Germinadas	% Germinadas	Longitud radícula
1	Control	14	56	1, 0.9, 0.6, 0.5, 0.1, 0.6, 0.3, 0.2, 0.4, 0.4
2	A1-103	22	88	1.8, 2.4, 2.7, 1.6, 1.9, 2, 1.9, 1.9, 1.7, 1.9
3	A1-109	19	76	1.5, 1.9, 1.7, 1.8, 1.8, 1.5, 1.8, 1.6, 1.5, 1.5
4	A1-112	23	92	1.8, 1.7, 1.5, 1.7, 1.4, 1.7, 1.8, 1.4, 1.5, 1.7
5	A1-119	17	68	1.9, 2, 1.5, 1.5, 1.9, 1.5, 1.7, 1.6, 1.6, 1.2
6	C1-255	20	80	1.3, 1.7, 1.3, 1.1, 1.4, 1.5, 1.3, 1.1, 1.2, 1.3
7	C1-256	23	92	1.5, 1.1, 1.5, 1.7, 1.7, 1.5, 1.7, 1.4, 1.5, 1.3
8	C1-270	20	80	1.5, 1.4, 1.4, 1.1, 1.4, 1.1, 1.4, 1.3, 1.1, 1.4
9	D1-302	20	80	1.7, 1.6, 1.2, 1.6, 1.7, 2, 1.7, 1.9, 1.9, 1.8
10	D1-305	20	80	1.5, 1.7, 1.6, 1.8, 1.3, 1.5, 1.4, 1.2, 1.2, 1.1
11	D1-312	17	68	2.3, 1.5, 2, 1.8, 1.5, 1.5, 1.7, 1.5, 1.4, 1.7

Mientras que en la germinación del rábano el control obtuvo un 100% de germinación al igual que otras 8 cepas. En la Tabla 6 Se ilustran 3 cepas más el control, de las que obtuvieron un 100%, y poseían la radícula más grande.

Tabla. 6. Cepas que obtuvieron una mejor eficiencia en germinación.

	Cepa	No. Germinadas	%Germinadas	Longitud radícula
1	Control	25	100	3.6, 2, 2.1, 2.6, 2.1, 2.8, 3, 2.2, 2.6, 2.6
2	A1-124	25	100	3.5, 2.6, 2.6, 2.7, 2, 3.2, 3.1, 2.2, 2.7, 2.2
3	B2-222	25	100	3.6, 4.4, 3.3, 3.7, 5, 2.4, 2.3, 2.2, 2.3, 3.5
4	B2-225	25	100	5, 3.3, 3.2, 3.8, 4, 4.2, 2.7, 3.1, 2.7, 3

Prueba de Antagonismo

Se probaron todas las cepas con cada hongo fitopátogeno (*Alternaria, Bipolaris, Fusarium Oxisporio*). Hubo una cepa que presento resistencia ante los hongos *Alternaria y Bipolaris* esta cepa fue D1-314. Mientras que para los hongos *Fusarium Oxisporio, Alternaria y Bipolaris* se presentaron más cepas con resistencia, estás cepas son: B2-203, C1-258, D1-302 y D1-303. En la Figura 1 se muestra como la cepa D1-303 tuvo un resultado esperado en las pruebas de antagonismo.

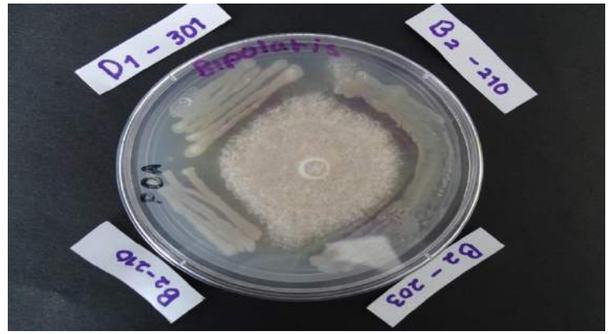


Figura 1. Pruebas de antagonismo de 4 cepas con Fusarium Oxisporio. La cepa B2-203 mostró resistencia en la prueba de antagonismo.

CONCLUSIÓN

El crecimiento de la radícula de las semillas probadas en germinación obtuvo buenos resultados, pues en comparación con el control, la radícula era mayor que el control. Se comprobó el antagonismo de las rizobacterias ante los hongos fitopatógenos, ya que las cepas B2-203, C1-258, D1-302, D1-303 y D1-314 tuvieron un gran éxito. A pesar de que el experimento se desarrolló en poco tiempo, las rizobacterias dieron buenos resultados. Estos resultados positivos demuestran que el uso de las rizobacterias puede promover el crecimiento de las plantas y esto puede ayudar en ámbitos agrícolas para mejor la producción de cultivos y evitar que microorganismos fitopatógenos se propaguen en las cosechas.

BIBLIOGRAFÍA

Jiménez, R., Virgen, Gil., Tabares S., Olalde, V. (2001). "Bacterias promotoras del crecimiento de plantas: agro-biotecnología" en Avance y Perspectiva, Vol. 20, Noviembre-Diciembre, [pp. 395-400].

Esquivel-Cote, R. Gavilanes-Ruiz, M. Cruz-Ortega, R. y Huante P. (2013). "Importancia agrobiotecnológica de la enzima ACC desaminasa en rizobacterias, una revisión" en Rev. Fitotec. Mex., Vol. 36, [pp. 251-258].

Molina-Romero, D. Bustillos-Cristales, M. Rodríguez-Andrade, O. Morales-García, Y. Santiago-Saenz, Y. Castañeda-Lucio, M. Muñoz-Rojas, J. (2015). "Mecanismos de fitoestimulación por rizobacterias, aislamientos en América y potencial biotecnológico" en Biológicas, No. 2, Vol. 17, diciembre, [pp. 24-34].

Bach-Álvarez, T. y Díaz, M. (2008). "Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) en la agricultura" en Agricultura Orgánica, No. 3, [pp. 35-38].

Penrose, D.M. y Glick, B.R. (2003). "Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria" en Physiologia Plantarum, Vol. 118, [pp. 10-15].

Souza, R. Ambrosini, A. Passaglia, L.M.P. (2015). "Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils". En Genetic and Molecular Biology. Vol 38, [pp. 401-419].

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Doctora Blanca Estela Gómez Luna y a la Universidad de Guanajuato por aceptarme en el 18° Verano de la Ciencia Región Centro, y agradezco a mi coordinadora Valeria Martín del Campo Pérez por el apoyo y la ayuda que me otorgó.

EVALUACIÓN DE LA CORROSION EN ACERO AL CARBONO 1018 Y ACERO INOXIDABLE 304

Sagrario Bernal Macareno[1] y Adrián Sosa Dominguez[2]

INTRODUCCIÓN

Se denomina corrosión al ataque destructivo que sufre un material, generalmente metálico, por reacción química o electroquímica con su medio ambiente (atmosfera, suelo, agua, etc.). La reacción que se produce durante el fenómeno de la corrosión depende de la naturaleza química del entorno y de la concentración efectiva de las especies reactivas. El efecto de la corrosión es una alteración de las propiedades de los materiales afectados, que puede venir acompañada de una perdida de materia. En los materiales metálicos el proceso de corrosión es normalmente electroquímico, es decir, una reacción química en la cual hay una trasferencia de electrones de una especie a otra (Gómez de León, Alcaraz Lorente, 2004).

Acero al carbono

El acero al carbono, constituye el principal producto de los aceros que se producen, estimando que un 90% de la producción total mundial corresponde a aceros al carbono. La composición química de los aceros al carbono es compleja, además del hierro y el carbono que no supera el 2%, hay en la aleación otros elementos necesarios para su producción, tales como silicio y manganeso. El aumento del contenido de carbono en el acero eleva su resistencia a la tracción y su dureza, incrementa el índice de fragilidad en frío y hace que disminuya la tenacidad y la ductilidad (Kalpakjian, Espinoza Limón, 2008).

El acero al carbono 1018 es ampliamente utilizado como un material de construcción en muchas industrias debido a sus excelentes propiedades mecánicas y bajo costo, por lo que la evaluación del mismo puede aportar mucha información útil al campo del control de la corrosión en la industria. Un factor importante que interviene en el proceso de corrosión es la temperatura, ya que por ejemplo la velocidad de corrosión incrementa con el aumento de la temperatura, para el medio corrosivo, sin embargo para el caso de algunos inhibidores, el efecto protector incrementa con el aumento en la concentración del inhibidor y con el aumento de la temperatura. Este efecto podría tener relación con la evolución de hidrógeno en soluciones ácidas deareadas, mientras que el incremento en la temperatura acelera la quimisorción del inhibidor en la superficie del metal (Esparza, E., Veloz, M., Reyes, V, 2008).

Acero inoxidable

Todos los aceros inoxidables contienen el cromo suficiente para darles sus características de inoxidables. Muchas aleaciones inoxidables contienen además níquel para reforzar aún más su resistencia a la corrosión. Estas aleaciones son añadidas al acero en estado de fusión para hacerlo inoxidable en toda su masa. Por este motivo, los aceros inoxidables no necesitan de ningún otro tratamiento superficial para mejorar su resistencia a la corrosión, pero también los aceros inoxidables se oxidan, pero en vez de óxido común, lo que se forma en la superficie es una tenue película de óxido de cromo muy densa que constituye una coraza contra los ataques de la corrosión. Si se elimina esta película de óxido de cromo que recubre los aceros, esta se vuelve a formar inmediatamente al combinarse el cromo con el oxígeno de la atmósfera.

[1]Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Coahuila, Carretera Torreón Matamoros Km. 7.5, Ejido el Águila, C.P:27275, Torreón, Coah, s.bernal@uadec.edu.mx
[2]Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Química, Cerro de las campanas s/n, Las campanas, Adrián Sosa Domínguez, C.P: 76000, Querétaro, Qro. adrian.sosa@uaq.mx

Los tipos 301, 302 y 304 consisten en añadir más del 7 % de níquel a una aleación con el 17 % o más de cromo, por ser aleaciones de acero al cromo níquel, poseen mayor resistencia a la corrosión que los tipos 430 y 434. Son cinco los riesgos que amenazan el éxito del uso de los aceros inoxidables. Estos son: la corrosión intergranular, la corrosión por efecto galvánico, la corrosión por contacto, la corrosión en forma de picado o de pinchazos de alfiler, y la corrosión por fatiga. Muchos fracasos pueden ser evitados dándose cuenta sencillamente de los riesgos involucrados y adoptando las medidas apropiadas para eliminarlos ("Corrosión en Aceros Inoxidables", 2016).

Técnicas electroquímicas

Las posibilidades actuales que brinda la electrónica en relación al manejo de señales eléctricas, ha favorecido el desarrollo de un número importante de técnicas electroquímicas, que no solo son útiles para estudios sobre corrosión sino para un gran número de aplicaciones. Si tenemos en mente que todas las técnicas tienen en común la aplicación de una perturbación al electrodo bajo estudio y al posterior análisis de la respuesta del sistema, ambos aspectos pueden ser realizados de diversas maneras de acuerdo a la disponibilidad instrumental. Actualmente la mayoría de los equipos disponibles en el mercado permiten contar con un gran número de técnicas sin necesidad de modificar el sistema de medida. . Las distintas perturbaciones aplicadas al electrodo son conocidas usualmente como el programa aplicado. Este programa puede tener distintas características de acuerdo al tipo de técnica en cuestión. Dentro de los programas utilizados están polarización lineal, Polarización cíclica potenciodinamica , Corrosión generalizada y Corrocimetria.

Polarización lineal

La resistencia a la polarización lineal es un método que se emplea para determinar la velocidad de corrosión. El método consiste en la aplicación de un sobrepotencial, respecto del potencial de equilibrio, lo suficientemente pequeño como para no alterar el sistema pero suficiente como para poder conocer cuál es el comportamiento del electrodo en ese medio a las reacciones de oxidación y de reducción. De esta forma, se seguir la evolución del proceso de corrosión con el tiempo. Este método asume que la corrosión electroquímica se predice de forma correcta por la ecuación clásica de Stern-Geary, ecuación 1) (Hakka et. al, 1995).

$$icor = \frac{b_a b_c}{Rp2.3(b_a+b_c)} \quad (1)$$

Dónde: *Icorr* es la densidad de la corriente de corrosión, *Rp* es la resistencia a la polarización y b_a y b_c son constantes para el metal.

La principal ventaja de la polarización lineal es que es un método no destructivo. Otra ventaja es que pueden estimarse valores de resistencia a la corrosión y ésta convertirse a velocidades de corrosión, permitiendo determinar la rapidez con la que se corroerá el metal o estimar la vida útil del miso. Entre las desventajas que presenta este método se encuentra el que únicamente mide corrosión general, además de que resulta complicado obtener los datos para metales que presentan índices de corrosión bajos.

Polarización cíclica potenciodinámica.

La polarización cíclica potenciodinámica es un método de gran utilidad a la hora de estudiar la susceptibilidad a la corrosión localizada como picaduras y hendiduras, así como el análisis de la repasivación de un material en dado medio acuoso. La polarización del sistema consiste en el barrido del

potencial del electrodo de trabajo en el rango anódico del sistema. La variación del potencial se realiza a una velocidad constante mientras se adquiere en tiempo real la densidad de corriente de respuesta del material en estudio. El término cíclico del ensayo se refiere al cambio del barrido del potencial hacia valores catódicos al alcanzar una densidad de corriente determinada. La medición del potencial es de manera referencial con respecto a otro electrodo, en donde calomel saturado (ECS: +241 vs. EEH) es comúnmente es utilizado (Roberge, 2008) (ASTM International, 1998)

MÉTODOS Y MATERIALES

Para la realización de los métodos de evaluación de polarización lineal y polarización cíclica potenciodinamica se empeló un Potenciostato modelo VSP-300 de la marca Bio-Logic (Figura 1).
Para las evaluaciones se utilizó como electrodo referencia un electrodo de calomel saturado en KCl y como contraelectrodo una placa de grafito. La solución electrolítica empleada fue una solución de NaCl al 5%. Los electrodos de trabajo fueron placas de acero al carbono y acero inoxidable, todo esto montado en una celda de vidrio de 250 mL, en su interior con solución electrolítica y conectada al equipo de la siguiente manera: cable rojo para el electrodo de trabajo, cable blanco para electrodo de referencia y cable azul para contraelectrodo (Figura 2).

Figura 1.Potenciostato VSP-300.

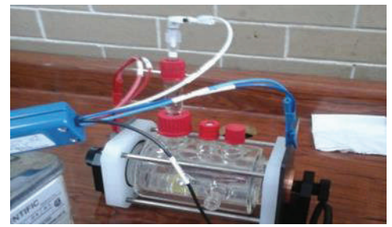


Figura 2. Celda de trabajo montada para la evaluación.

Las condiciones utilizadas para las técnicas de Polarización lineal y Polarización Cíclica Potenciodinamica se muestran en las tablas 1 y 2 respectivamente. Las condiciones fueron iguales para ambos materiales.

Tabla 1. Condiciones para la técnica de Polarización Lineal.

t_R	0h 1mn 0.00s
dE_R/dt	0.0 mV/h
dE_R	0.0 mV
dt_R	0.100 s
Escanear E_W con dE/dt	0.166 mV/s
De E_i	-0.025 V vs E oc
A E_L	0.025V vs Ref
Record	< l >
Sobre el ultimo	25 % de la duración del paso.

Tabla 2. Condiciones para la técnica de Polarización Cíclica Potenciodinamica.

t_R	0h 1mn 0.00s
dE_R/dt	0.0 mV/h
dE_R	0.0 mV
dt_R	0.100 s
Escanear E_W con dE/dt	10.000 mV/s
De E_i	-0.100 V vs E oc
A E_L	0.500V vs Ref
Limite |I| I_p	100.000 µA después t_b
t_b	0.100s desde el principio de

N	5 pasos de voltaje		exploración
E distancia	-2 V; 2V *Resolución =100 µV*	Record	< I >
		Sobre el ultimo	25 % de la duración del paso.
I distancia	Auto	N	5 pasos de voltaje
B andwidth	8	E distancia	-2 V; 2V *Resolución =100 µV*
(dE/dt ˜ 100µV/600ms) (dEN ˜ 500µV)		I distancia	Auto
		B andwidth	8
		Mantener EL hasta |I|> Ip (si no se ha alcanzado el límite anteriormente)	
		Escaneo fin a E_f	0.000V vs E oc
		Limite |I| I_f	0.000 µA
		(dE/dt ˜ 100µV/10ms) (dEN ˜ 500µV)	

RESULTADOS

A continuación en la Figura 3 y 4 se pueden observar las curvas de polarización potenciodinámicas del acero inoxidable 304 y para el acero al carbono AISI 1018.

Las curvas de polarización fueron realizados utilizando un potencial inicial de -0.5 V vs Eoc y un potencial final de +0.5 V vs Eoc. Una velocidad de barrido de 10 mV/s.

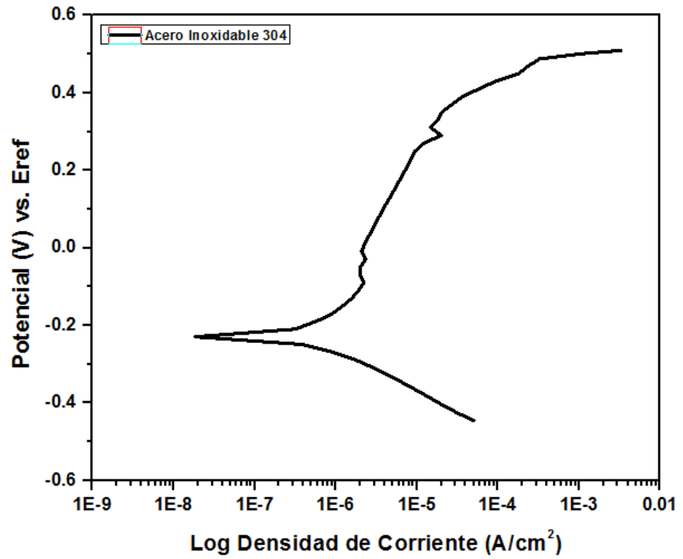


Figura 3.Curva de polarización potenciodinámica para el acero inoxidable 304.

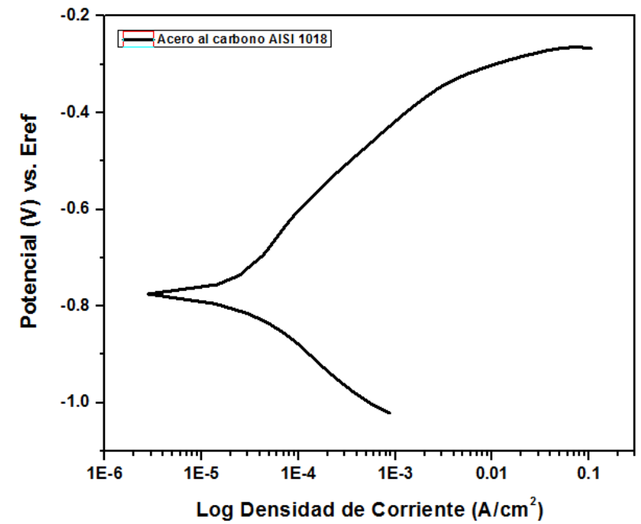


Figura 4.Curva de polarización potenciodinámica para el acero al carbono AISI 1018

Tabla 3. Potencial de corrosión y velocidad de corrosión para los materiales.

Tabla 1. Superficie	Ecorr (mV)	Icorr (µA/cm²)	CorrRate (mpy)
Acero al carbono	-770	12 µA	5.5
Acero inoxidable	-230	771 nA	0.3

Como se puede observar en la tabla 3 se puede hacer la comparación entre el potencial de corrosión presentado por el acero al carbono y el acero inoxidable de valores de -770 a -230 mV respectivamente. El valor de potencial de corrosión nos da un indicativo de la susceptibilidad que tiene el material para poder presentar en su superficie un proceso de corrosión. Por lo anterior el acero inoxidable con un valor de potencial de corrosión menos negativo nos arroja como resultado que es menos susceptible a corroerse que el acero al carbono.

Con respecto a la velocidad de corrosión para el acero al carbono es 10 veces más grande que la del acero inoxidable lo que es bastante entendible por la composición química del acero al carbono ya que su composición principal es Fe-C y en cambio para el acero inoxidable se forma un óxido de cromo sobre la superficie que pasiva al material y por lo tanto eleva las propiedades anticorrosivas.

CONCLUSIONES

Como conclusiones del proyecto de investigaciones se encuentra que se pudieron obtener algunos parámetros básicos para entender el proceso corrosivo que sufren el acero inoxidable 304 y el acero al carbono AISI 1018, los parámetros medidos fueron el potencial de corrosión o potencial mixto y la velocidad de corrosión. A partir de los resultados mostrados el acero inoxidable presenta mayor capacidad para resistir al proceso corrosivo que un AISI 1018, por lo anterior se puede definir en base a esto el uso y aplicación que tendrá cada material en la industria.

BIBLIOGRAFIA

ASTM International. *Standard Test Method for Conducting Cyclic Potentiodynamic Polarization Measurements for Localized Corrosion Susceptibility of Iron-, Nickel-, or CobaltBasedAlloys*. Estados Unidos: ASTM Standards, 1998. G61-98.

Corrosión en Aceros Inoxidables. (2016). *Resistencia a la corrosión de los aceros inoxidables*, consultado en http://www.inoxidable.com/corrosion.htm (Fecha de consulta 09-08-2016).

Esparza, E., Veloz, M., Reyes, V. (2008). *Corrosión de acero sae 1018 en aguas amargas colectadas de la industria del petróleo: efecto de la temperatura*. Consultado en http://www.uaeh.edu.mx/investigacion/icbi/LI_RecCorr/victor_reyes/EMEsparza.pdf (Fecha de consulta 09-08-2016)

Gómez de León, F., Alcaraz Lorente, D. (2004). *Manual básico de corrosión para ingenieros*. Murcia: Universidad de Murcia.

Hakka, L.E.; Bosen, Sidney, Lui, H.J. (1995). *The Role of Anion Contaminants on Corrosion in Refinery Amine Units*. Dow Chemical, Gas Treating Products & Services, Houston.

Kalpakjian, S., Schmid, S., Espinoza Limon Jaime, (2002). *Manufactura, ingeniería y tecnología*. México, D.F.: Pearson Educación.

Roberge, Pierre. *Corrosion Engineering*. Estados Unidos: McGraw Hill, 2008.

EVALUACIÓN DEL EFECTO TOXICO DEL VENENO DE ESCORPIONES DEL GENERO *VAEJOVIS* DEL ESTADO DE GUANAJUATO EN RATONES BALB/C

Juan Antonio Bueno González[1] y Xóchitl Sofía Ramírez Gómez[2]

RESUMEN

Los escorpiones son animales que se encuentran en la mayoría de la superficie terrestre a excepción de las zonas muy frías. Actualmente se registran 262 especies de escorpiones para México de las cuales la familia Vaejovidae cuenta con la mayor diversidad teniendo casi un 50% de los géneros y especies presentes en nuestro país. En el estado de Guanajuato se cuenta con 10 especies pertenecientes a esta familia. En México se presentan más de 250,000 casos de picadura de escorpión cada año. El veneno es usado por los escorpiones para capturar a sus presas o para defensa por lo cual, a lo largo de los años este ha evolucionado y contiene péptidos específicos para mamíferos, crustáceos o insectos. Debido a la gran diversidad de escorpiones de la familia Vaejovidae y a su amplia distribución en el estado de Guanajuato, en el presente trabajo se evaluó el efecto del veneno de escorpiones del género *Vaejovis* en ratones Balb/c. Al respecto se encontró que el veneno no fue tóxico ni letal para esta especie animal.

ABSTRACT

Scorpions are animals that are found in most of the earth's surface except for very cold areas. Actually in Mexico are registered 262 species of scorpions, coming from the family of Vaejovidae, having the greatest diversity captivating almost 50 % of the genus and species present in our country. In the state of Guanajuato are 10 species belonging to this family. In Mexico more than 250,000 cases of scorpion stings are occurring each year. The poison is used by scorpions to capture their prey or there defense, however over the years this has evolved and contains specific peptides to mammals, crustaceans or insects. Because of the great diversity of scorpions of the Vaejovidae family and its wide distribution in the state of Guanajuato, in our present project we evaluated the effect of the poison of scorpions *Vaejovis* in mice Balb/c. In this regard it was found that the poison was not toxic or lethal to this animal species.

Palabras Clave: Escorpiones, Familia Vaejovidae, Veneno, Ratones Balb/c.

INTRODUCCIÓN

El nombre con el cual se conoce a estos animales ya sea escorpión (de la raíz latina scorpĭo, -ōnis) o alacrán (del árabe aqrab) se refiere al mismo animal (Castillo J. *et al*., 2007). Su distribución abarca la mayoría de la superficie terrestre exceptuando zonas frías como los casquetes polares o cumbres nevadas, no todos son de importancia médica en cuanto a su picadura (de Roodt A. 2009). Todos los escorpiones poseen veneno pero solo el veneno de algunas especies son de importancia médica para el hombre (de Roodt A. *et al*., 2014). Los escorpiones son depredadores de diferentes animales, tanto invertebrados como vertebrados de pequeño tamaño, son nocturnos por lo cual se mantienen inactivos durante el día. Suelen aparearse en la temporada antes de lluvias que en nuestro país es cuando tenemos temperaturas más altas por lo cual se les ve más en tiempo de calor y la gente los asocia a esta temporada, son animales vivíparos, estos suelen refugiarse bajo rocas, corteza, en grietas etc. y algunos suelen hacer madrigueras (Ponce J. *et al*., 2013a). Actualmente se han registrado 262 especies de escorpiones para México, las cuales pertenecen a 8 familias, de estas Vaejovidae cuenta con la mayor diversidad seguida

[1]Instituto Tecnológico Superior de Irapuato, Biología; Carretera Irapuato-Silao Km. 12.5, C.P: 36821, Irapuato, Guanajuato, buenohomieswestern@hotmail.com
[2]Universidad de Guanajuato, Campus Celaya-Salvatierra, DCSI, Departamento de Enfermería Clínica; Av. Mutualismo esq. Pról. Río Lerma #303, Sede mutualismo, C.P: 38060, Celaya Guanajuato, xosofira2002@yahoo.com.mx

de Diplocentridae y en tercer lugar Buthidae. Vaejovidae cuenta con aproximadamente el 50% en géneros y especies, con 15 de los 31 géneros conocidos y 136 de un total de 262 especies registradas para México. Para el estado de Guanajuato tenemos registradas 3 familias, 5 géneros y 10 especies de escorpiones de las cuales se incluye la familia Vaejovidae con 3 géneros y 7 especies que son las siguientes; *Hoffmannius bilineatus, Hoffmannius punctatus, Thorellius cristimanus, Vaejovis dugesi, Vaejovis nigrescens, Vaejovis pococki, Vaejovis aff* (Ponce J. *et al.,* 2013b). El alacranismo se refiere al estudio de la biología del escorpión (alacrán), las implicaciones médicas, epidemiológicas, ecológicas, culturales y sociales que surgen por el envenenamiento que provoca la picadura del mismo (Castillo J. *et al*., 2007).

La gravedad del envenenamiento por picadura de escorpión depende de la especie y de las condiciones fisiológicas, el estado de salud y si se inyecta o no veneno en el paciente (Chávez H. 2011). En México se reportan más de 250,000 casos de picadura de escorpión cada año, los estados con un mayor número de reportes son Jalisco, Guerrero, Morelos, Michoacán, Guanajuato, Puebla, Nayarit, Colima, estado de México, Sinaloa, Durango, Querétaro, Sonora y Oaxaca en este orden (Chávez H. *et. al.,* 2015), en un estudio realizado entre 2006 y 2012 en centro y occidente de México nuestro estado ocupa el 7º lugar en cuanto incidencia con 3,541.90 por cada 100,000 habitantes y el 6º lugar en mortalidad con 9 (Ponce J. *et al.,* 2013b). En un estudio realizado en el estado de Guanajuato entre 2000 y 2005 se rebasaron los 24,000 casos por año y una mortalidad de 3, también se observó que los municipios más poblados como León o Irapuato presentan una mayor incidencia (Castillo J. *et al*., 2007).

El veneno de escorpión está compuesto por diversos componentes de los cuales las proteínas y péptidos de bajo peso molecular son los más importantes. En cuanto a los péptidos tenemos tres tipos, los de cadena corta que van de 31 a 39 aminoácidos son específicos para el bloqueo de canales de potasio, los segundos están compuestos por gran cantidad de polipéptidos de cadena mediana de 61 a 70 aminoácidos que interfieren el flujo de los iones de sodio a través de la membrana celular y el ultimo tipo está compuesto por polipéptidos de cadena larga contienen más de 130 aminoácidos que actúan sobre los canales de calcio (Chávez H. 2011). Los escorpiones usan su veneno para capturar a sus presas o para su defensa, tras millones de años de evolución se ha logrado la selección y diversificación de péptidos o proteínas especificas con actividades enzimáticas que comúnmente interfieren en la comunicación celular entre las células de los organismos a los que los escorpiones inyectan su veneno, estos péptidos modifican o bloquean la función de los canales iónicos, sin embargo son bastante selectivos, por ejemplo hay péptidos que reconocen solamente canales iónicos de mamíferos, crustáceos o insectos, de estos los principales péptidos que se han descrito son para canales de sodio y potasio, además de estos encontramos también péptidos antimicrobianos, anti-malarios, anticonvulsivos entre otros (Santibáñez-López *et. al.,* 2015).

Como se menciona en México se reportan más de 250,000 casos al año por lo cual esto sigue siendo un problema probablemente por la desinformación de la gente. En comunicación personal con el Dr. Alfredo Luis Chávez Haro nos comenta que hay personas que han acudido a la clínica con una sintomatología leve por picadura de escorpión y que al momento de describir al escorpión que los ataco mencionan características de escorpiones que no son considerados de importancia médica. Debido a esto y a la gran diversidad de escorpiones de la familia Vaejovidae y a su amplia distribución en el estado de Guanajuato, es importante evaluar si el efecto del veneno de escorpiones del género *Vaejovis* es tóxico para mamíferos, para lo cual se utilizó un modelo murino de la cepa Balb/c, para generar conocimiento acerca de la toxicidad del veneno de estos escorpiones.

MÉTODOS Y MATERIALES

Animales de experimentación
Se utilizaron ratones machos de la cepa Balb/c de aproximadamente 12 semanas de edad, con peso promedio de 35 g + 5 g. Los roedores fueron proporcionados por el Bioterio del Departamento de Medicina y Nutrición de la División de Ciencias de la Salud, del Campus León de la Universidad de Guanajuato. Los animales se mantuvieron en condiciones ambientales estándar de bioterio: ciclos de luz-oscuridad de 12 horas, temperatura de 23°C+2°C, agua y alimento ad libitum. El manejo y cuidado de los animales se realizó con apego a la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999 (Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio).

Obtención y Preparación del veneno para su administración
Se ordeño el veneno de los escorpiones del genero *Vaejovis* mediante estimulación eléctrica, usando corriente directa a 110 volts, para lo cual se colocó un electrodo de contacto en el cuerpo del escorpión y un electrodo estimulador en la parte del telson para cerrar el circuito. El telson se sostuvo con la ayuda de unas pinzas y el veneno se colectó con un portaobjetos situado cerca del telson al momento de la descarga, se dejó secar la gota de veneno y después se re suspendió en 300 µL de PBS (Buffer Salino de Fosfatos). Posteriormente se cuantificó la cantidad de proteína presente en el veneno por el método de Bradford haciendo una curva de calibración con BSA (Albumina Sérica Bovina) con concentraciones de 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5 µg/µL. Se determinó la densidad óptica a 590nm en un espectrofotómetro UV/Vis Genesys 10. (Bradford M. 1976). Finalmente el veneno se resuspendiò en PBS y se almaceno a 4°c hasta su posterior utilización.

Evaluación del efecto del veneno en el animal integro.
Para realizar el bioensayo, se utilizaron 2 grupos de 4 ratones. El Al grupo 1 se le administró vía intramuscular en la extremidad inferior derecha 20 µg de proteína del veneno. El grupo 2 (control) recibió vía intramuscular en la extremidad inferior derecha 100µL de PBS debido a que fue el vehículo en el que se resuspendió el veneno. En cada ratón, se determinó el tiempo de latencia de los efectos del veneno y se registraron los signos y síntomas observados, así como la duración e intensidad de los mismos.

Disposición final de RPBI (Residuos Peligrosos Biológicos Infecciosos): Todos los residuos peligrosos se dispusieron de acuerdo a la norma oficial mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002 (Protección ambiental- Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo).

RESULTADOS

En este trabajo se evaluó el efecto del veneno de escorpiones del genero *Vaejovis* en roedores de la cepa Balb/c. Al respecto se observó que inmediatamente después de la administración intramuscular del veneno todos los ratones presentaron entumecimiento en la extremidad inferior derecha (sitio donde se administró el veneno). Lo anterior les provocó ligera dificultad en la marcha. Sin embargo, este efecto fue disminuyendo a partir de los 15 min post-administración y después de los 30 min de haber inoculado el veneno se observó la recuperación total de los roedores, donde el entumecimiento de la extremidad ceso y comenzaron a realizar marcha normal.

En cambio en el grupo control no se observó entumecimiento en la extremidad inferior en la que se administró el PBS, ya que en todos los roedores se observó comportamiento y marcha normal. Por otro lado en este experimento también se observó a los 3 minutos post-administración del veneno solo dos roedores tuvieron una ligera piloerección e hiperventilación, sin embargo, este efecto pudo deberse al estrés generado por la manipulación normal de estos animales y posiblemente al malestar local que produjo el veneno en el sitio de la administración. Estos efectos no se observaron en el grupo control.

En resumen se observó un cuadro clínico con duración total de 30 minutos, los signos y síntomas observados fueron de intensidad leve y de poca duración.

CONCLUSIONES

El veneno del género *Vaejovi*s no fue tóxico, ni letal en ratones Balb/c, debido a que tras su administración no se observaron signos y síntomas que pusieron en riesgo la integridad o vida del animal, únicamente se observaron efectos locales en la zona de la administración, además estos efectos fueron de corta duración y poca intensidad.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a la Dra. Xóchitl Sofía Ramírez Gómez por aceptarme en este proyecto y por su guía y ayuda en el mismo, a la Dra. Esmeralda Rodríguez Miranda por su ayuda y por permitirnos usar su laboratorio, a la MVZ Ana Cristina Araiza Martínez (Responsable de Bioterio) y Miriam Guzmán Salas (personal operativo) por ayudarnos proporcionándonos los ratones que utilizamos en los bioensayos, al Departamento de Medicina y Nutrición, DCS, Universidad de Guanajuato, Campus León por permitirme usar sus instalaciones, al Dr. Alfredo Luis Chávez Haro de la Cruz Roja, al Dr. Juan Gualberto Colli Mull, y a Jorge Alejandro López Torres del Instituto Tecnológico Superior d Irapuato por su apoyo y ayuda en el proyecto, y finalmente a CONACYT por el apoyo económico que se me otorgo para apoyarme en la realización del proyecto.

BIBLIOGRAFIA

BRADFORD, M. (1976). “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding” en *Anal. Biochem.* Núm. 72, Enero [pp. 248-254].

CASTILLO, P., VELASCO, D., RAMÌREZ, B., VARGAS, S., LARA, L., RIVERA, T. (2007). “Distribución Geográfica del Alacranismo en el Estado de Guanajuato, 2000-2005” en *Acta universitaria*, Núm. 2 Vol. XVII Mayo-Agosto, [pp. 12-18].

CHÁVEZ, H. (2011). “Alacranismo en León Guanajuato” en D’Suze G., Corzo B. G., Paniagua S. J. (Eds.) *Emergencias por Animales Ponzoñosos en las Américas*, México: Instituto Bioclon, SA de CV, [pp. 15-30].

CHÁVEZ, H., ORTIZ E. (2015). “Scorpionism and Dangerous Species of Mexico,” en Gopalakrishnakone, P., Possani, L.D., F. Schwartz, E., Rodríguez de la Vega, R.C (Eds). *Scorpions Venonms,* México: Springer Science+Business, [pp. 201-213].

de ROODT, A. (2009). “*Estudio del veneno de algunos escorpiones de importancia médica de la Argentina*”. Tesis de maestría. Buenos Aires: Universidad Nacional de San Martín.

de ROODT, A. LANARI, L., LASKOWICZ, R., COSTA DE OLIVEIRA, V. (2014). “Identificación de los escorpiones de importancia médica en la Argentina” en *Acta Toxicol. Argent*. Núm. 1, Vol. XXII, Junio, [pp. 5-14].

Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”. Consultada en: http://www.sagarpa.gob.mx/Dgg/NOM/062zoo.pdf (fecha de consulta 02-05-2016)

Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, “Protección ambiental- Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo”. Consultada en: http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/087ecolssa.html (fecha de consulta 05-08-2016)

PONCE, J., FRANCKE, O. (2013a). “Clave para la identificación de especies de alacranes del género Centruroides Marx 1890 (Scorpiones: Buthidae) en el Centro Occidente de México” en *Biológicas*. Num. 1, Vol. XV, Marzo, [pp. 52-62].

PONCE, J., FRANCKE, O. (2013b). “Actualización taxonómica sobre alacranes del Centro Occidente de México” en *Dugesiana*, Núm. 2, Vol. 20, Diciembre, [pp. 73-79].

SANTIBÀÑEZ, L., FRANCKE, O., URETA, C., POSSANI, L., (2016). “Scorpions from Mexico: from species diversity to venom complexity” en *Toxins*. Num. 1, Vol. 8, Diciembre 2015, [pp. 2-18].

ANALISIS DE LA DIETA DE *HETERANDRIA BIMACULATA* EN LA REGION CENTRO- ESTE DE MÉXICO

Omar Carbajal Becerra[1] y Juan Pablo Ramírez Herrejón[2]

RESUMEN

Las especies invasoras son algunas de las principales causas de problemas ambientales. *Heterandria bimaculata* es considerada una especie invasora en distintas regiones como en la subcuenca del Río Laja. Tiende a ocupar gran cantidad de ambientes en los ecosistemas y presentan una alta tasa reproductiva, sin embargo, no se ha documentado cuál es su función dentro del ecosistema, por lo que es de suma importancia conocer si sus hábitos alimenticios afectan la colonización de los distintos hábitats en donde pudiera llegar a establecerse. Realizando análisis de contenido estomacal se determinó el porcentaje de los componentes de la dieta. Con los resultados obtenidos en este estudio se determinó que *Heterandria bimaculata* es una especie carnívora considerándose primordialmente insectívora.

ABSTRACT

Invasive species are some of the main causes of environmental problems. *Heterandria bimaculata* is considered an invasive species in different regions and in the Laja River sub-basin. This species tends to occupy large number of environments in ecosystems and have a high reproductive rate, however, it´s role in the whole ecosystem hasn´t been documented yet. For this reason it is very important to know its feeding habits and the degree of colonization in different habitats where it could become established. Analysis of stomach contents and the percentage of dietary components was determined. The results obtained in this study determined that Heterandria bimaculata is an carnivorous species considered primarily insectivorous.

Palabras Clave: *Heterandria bimaculata*, dieta, hábitos alimenticios, ecología trófica.

INTRODUCCIÓN

Las invasiones biológicas son vistas como serios problemas ambientales de nivel mundial para los seres humanos (Everett, 2000). La introducción de especies en ecosistemas diferentes a su ambiente natural de distribución, ha sido reconocido como la segunda causa de pérdida de biodiversidad, esto visto a nivel global (Simberloff, 2010). Por lo que es de suma importancia llevar a cabo estudios para determinar el éxito de las especies invasoras y sus posibles consecuencias.

Heterandria bimaculata es una especie de Poecilido con cuerpo robusto que cuenta con una variabilidad morfometrica y meristica alta. Tiene una longitud de 6 a 7cm en machos y de 12 a 15cm en hembras, el color de su cuerpo es gris con una coloración obscura en los radios dorsales, las escamas pueden tener destellos azules, o violetas (Wischnath, 1993), presenta una mancha obscura circular y algunas veces difusa en la parte superior de la base de la aleta caudal cerca de la línea lateral. Tiene una serie de 11 a 17 radios en la aleta dorsal y de 8 a 12 radios en la aleta anal, los machos presentan un gonopodio con una modificación en el cuarto radio anterior que se encuentra dentro de una pliegue membranoso en forma de

[1] Omar Carbajal Becerra, Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Ciencias Naturales; Avenida de las ciencias s/n, Juriquilla, C.P: 76230, Santiago de Querétaro, Querétaro, México obecerra.carbajal@gmail.com
[2] Conacyt-Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Ciencias Naturales, Campus-Aeropuerto; Carretera Chichimequillas, Ejido Bolaños, C.P: 76140, Santiago de Querétaro, Querétaro, México, jpramirezhe@conacyt.mx

gancho y esta seguido por 6 a 9 segmentos subdistales que son cortos y con pequeños ganchos ventrales, presenta un perfil ventral debajo del tercer radio del gonopodio con una forma cóncava (Rosen, 1979). Cuenta con una línea lateral de 28 a 31 escamas dispuestas en serie, su altura máxima es casi su longitud cefálica y esta abarca 3 o 4 veces su longitud patrón (Álvarez del Villar, 1970). Su boca se encuentra en posición subterminal, con mandíbulas que tienen una hilera de dientes caninos y la mandíbula superior apenas protráctil, también presenta cuatro arcos branquiales con 22 a 24 dientes faríngeos de forma cónica que se encuentran dispuestos en dos placas superiores (Álvarez del Villar, 1970).

Esta especie es vivípara y tiene una proporción de sexos de tres hembras por cada macho. El tiempo de gestación que presenta esta especie es de seis a ocho semanas, pero esto depende de la edad y tamaño de las hembras. Pueden dar a luz desde veinte a cien juveniles. Las tallas en que la especie es sexualmente madura son de los 28.3 a 32.1mm de longitud en un periodo de cuatro meses en condiciones artificiales (Wischnath, 1993). Esta especie está considerada como omnívora, mostrando que su principal dieta son insectos acuáticos y terrestres que caen al agua, En condiciones artificiales su dieta puede ser muy variada y puede ir desde insectos pequeños, alimento congelado y hojuelas (Wischnath, 1993). Su distribución va desde la Vertiente del Atlántico, entre las partes medias y bajas de arroyos que van desde el río Misantla, Veracruz hasta el sur en el río Prinzapolka, Nicaragua. Para México es conocido de Campeche, Chiapas, Oaxaca, Quintana Roo, Tabasco, Veracruz y Yucatán. Los hábitats donde podemos encontrar a esta especie son manantiales, arroyos, lagunas, ríos y estanques pantanosos. Tienen preferencia a aguas lenticas, sombreadas y normalmente claras, aunque también se les encuentra en aguas turbias y lodosas en sustratos de lodos, arcillas, limos, arenas, rocas, cantos rodados, detritus, algas o vegetación frecuentemente nula y algas. Se encuentran en la columna de agua con profundidad hasta aproximadamente 1.3 m (Miller, 2009). El propósito de este trabajo es realizar un análisis de dieta de la especie *Heterandria bimaculata* que se encontró en la región Centro- Este de México en la cuenca del río Pánuco y la Subcuenca del río Laja.

MÉTODOS Y MATERIALES

Se analizarán ejemplares de *Heterandria bimaculata* que previamente fueron recolectados entre los meses de Marzo y Julio del año 2014 por el método de electropesca, el cual fue empleado utilizando una electropesca de mochila de (600 W; 120 volts, 60 Hz, 20.8 amp). Los peces recolectados fueron fijados y almacenados en solución 70% alcohol y 30% agua destilada y que posteriormente fueron depositados en la colección ictiológica Edmundo Díaz Pardo que se encuentra adscrita a la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro.

A cada individuo colectado se le realizaran mediciones de su longitud patrón utilizando un vernier analógico y también se obtendrán sus pesos usando una balanza analítica de (120g a 0.005g). Para los análisis de la dieta, se realizara un análisis de contenido estomacal, que consta en extraer el intestino del pez y verter su contenido en un portaobjetos cuadriculado para después ser observado en un microscopio estereoscópico y contabilizar los elementos de la dieta presentes de cada individuo, tomando un cm2 de área de muestra estomacal. Una vez obtenidos los elementos de la dieta, se realizara el índice de importancia relativa de Pinkas et al. (1971) con una modificación propuesta por (Yáñez-Arancibia, et al. 1976, Citado en Ramírez-Herrejón et al. 2014). *IRI = (PA*FA)/100*

RESULTADOS

Se analizaron un total de 199 ejemplares de *Heterandria bimaculata,* A cada individuo colectado se le realizaron mediciones de su longitud patrón utilizando un vernier analógico y también se obtuvieron sus pesos usando una balanza analítica. Para los análisis de la dieta se realizó un análisis de contenido estomacal por ejemplar y se contabilizaron un total de 46 elementos de la dieta disponibles, con los cuales se obtuvieron los porcentajes del índice de importancia relativa (%IIR) Tabla 1.

Tabla 1. Índice de Importancia Relativa en porcentaje (%IIR) de los elementos de la dieta de *Heterandria bimaculata* colectados en la región Centro- Este: (Hi) Higuerillas, (Pv) Paso de vaqueros, (Pc) Presa del Carmen, (Ch) Charco del ingenio, (Ex) Extoras, (Bu) Bucareli, (Ga) Los Galvanes y (Ci) La Cieneguita.

ITEM	Hi	Pv	Pc	Ch	Ex	Bu	Ga	Ci
Aeshnidae	-	-	0.1316	-	-	-	-	-
Aranae	-	0.10341	-	-	-	-	1.0050	0.3597
Cambarellus	-	-	-	1.7544	-	-	-	-
Chironomidae	-	0.3250	72.1562	12.2807	0.4391	0.0804	-	-
Cicadidae	-	-	-	-	-	-	-	2.2302
Cladocera	-	-	-	-	15.2580	26.9293	-	-
Coleoptera terrestre	0.1106	4.2842	-	0.4386	-	-	-	1.5827
Corixidae	-	0.0295	0.1243	-	-	-	-	0.2158
Culicidae	-	0.2659	6.2525	-	-	3.2154	-	2.1583
Diptera	-	1.6398	-	-	0.0732	0.2412	-	0.6475
Dytiscidae	-	0.3546	-	-	1.2806	-	-	-
Ephemeroptera	-	0.5023	-	-	0.2195	1.1254	-	-
Formicidae	24.512	0.7830	0.1243	-	-	0.8039	-	-
Gelastocoridae	-	-	-	-	0.1098	-	-	-
Hemiptera terrestre	-	1.3591	-	-	0.0366	-	-	-
Huevo de pez	-	-	-	83.3333	-	-	-	-
Huevos de mosquito	-	-	-	-	-	-	-	0.5036
Hymenoptera	19.167	27.4191	0.1755	-	7.9034	9.2444	-	-
Larva coleoptera	0.590	-	-	-	-	0.2412	-	-
Larva de insecto	-	-	0.0585	-	-	-	-	0.4317
Larva diptera	-	-	-	-	-	0.2010	-	-
Larva neuroptera	-	-	-	-	-	0.0402	-	-
Larva odonata	-	-	0.2340	-	1.6465	1.1254	24.1206	-
Larva Trichoptera	0.0369	0.0591	-	-	-	0.1608	-	-
M. tuberculata	0.3317	-	-	-	-	-	-	-
M.O.N.I	2.2853	0.1182	16.0920	-	9.3487	19.7749	-	79.4245
Mat. Inorganica	0.9952	-	-	-	-	-	-	-
Muscidae	-	-	-	-	-	-	5.5276	-
Neuroptera	-	-	-	-	0.3842	0.3617	-	-
Notonoctidae	-	-	-	0.87719	-	-	-	-
Ostacoda	0.0369	0.3546	-	-	5.5982	0.1608	-	-
Parasito	-	-	-	-	-	-	-	1.3669
Phlaetripidae	-	-	-	-	-	-	-	0.1439
Physiidae	3.4279	-	0.2121	-	18.935	7.3955	36.1809	-
Planorbidae	-	-	0.0293	-	-	-	1.0050	-
Resto vegetal	12.385	0.1034	0.0219	-	0.6037	0.8039	-	-
Restos insectos	33.911	53.9666	2.1939	-	9.0743	25.3215	29.1457	5.6115
Restos insectos acuaticos	2.212	8.3321	-	-	28.1010	-	-	-
Restos insectos terrestres	-	-	1.9013	-	-	0.4823	0.5025	-
Roca	-	-	-	-	0.9330	-	-	-
Simulidae	-	-	0.0878	-	-	-	-	-
Stratyomidae	-	-	-	0.8772	0.0549	1.2862	-	-
Tabanidae	-	-	-	0.4386	-	-	-	-
Tejido de Pez	-	-	-	-	-	-	-	5.1799
Veliidae	-	-	0.1170	-	-	-	-	0.1439
Vivalva	-	-	0.0878	-	-	1.0048	2.5126	-
	-	-	-	-	-	-	-	-

CONCLUSIONES

En la mayoría de los diversos sitos donde se recolecto *Heterandria bimaculata* se encontró que los elementos de la dieta corresponden a insectos acuáticos y terrestres, esto reafirma lo que menciono Wischnath, 1993, donde sostiene que es una especie omnívora y que se alimenta de insectos. Cabe mencionar que en el sitio Charco del ingenio el 83.3% de los elementos de la dieta no correspondieron a insectos acuáticos, sino a huevos de pez, lo que nos genera una pregunta sobre cuáles son las preferencias alimenticias de esta especie en este sitio y si esto puede indicarnos si esta especie tiene la capacidad de llegar a ser un riesgo potencial para las especies nativas de ese lugar.

BIBLIOGRAFIA

Álvarez del Villar, J. (1970). *Peces Mexicanos (Claves) México. Serie Investigaciones Pesqueras, Instituto Nacional de Investigaciones Biológico Pesqueras,* México, DF, México, [pp. 166].

Everett R.A. (2000). *Patterns and pathways of biological invasions*. *Trends in Ecology & Evolution*. Germany. [pp. 177-178].

Miller, R. R. (2009). *Peces Dulceacuicolas de México.* México. 255 p.

Ramírez-Herrejón, J. P., Moncayo-Estrada, R., Balart, E. F., Camacho, L. A. G., Rodríguez, B. V., Villanueva, R. A., & Caraveo-Patiño, J. (2014). *Trophic interrelations between introduced common carp, Cyprinus carpio (Actinopterygii: Cypriniformes: Cyprinidae), and fish community in a eutrophic shallow lake.* Acta Ichthyologica et Piscatoria, 44(1), 45.

Rosen, D. E. (1979). *Fishes from the uplads and intermontane basins of Guatemala: Revisionary studies and comparative geography*. Ibid, [pp. 267-376].

Simberloff, D. (2010). *Invasive Specie*. En: Sodhi, N. S. & P.R. Ehrlich. Conservation Biology For all. Oxford University, Nueva York, Nueva York, EEUU, [pp. 131-132].

Wischnath, L. (1993). *Atlas of Livebearers of the World. T. F. H. Publications, Inc. U.S.A,* [pp. 336].

SÍNTESIS DEL NÚCLEO CUMARÍNICO 7-HIDROXICUMARINA-3-CARBOXILATO DE ETILO ASISTIDO POR MICROONDAS

Ethson Uriel Carrera Arellano[1] y Virginia Flores Morales[2]

RESUMEN

Se realizó una condensación de Knoevenagel para obtener la 7-hidroxicumarina-3-carboxilato de etilo. La reacción se llevó a cabo mediante una metodología de síntesis asistida por microondas y una metodología convencional empleando solo agitación magnética; esto para establecer qué método presenta mejores resultados en función de los tiempos de reacción y rendimiento. Los productos obtenidos fueron purificados mediante columna cromatográfica, empleando además, cromatografía de capa fina para monitorear el avance de la reacción y realizar el seguimiento de la purificación.

ABSTRACT

Knoevenagel condensation was carried out for 7-hydroxycoumarin the-3-carboxylate. Reaction was effected by a method of microwave assisted synthesis and conventional methodology using only magnetic stirring; this to determine which method provides better results in terms of reaction times and performance. The products obtained were purified by column chromatography further using thin layer chromatography to monitor progress of the reaction and monitoring purification.

Palabras Clave: cumarina, cromatografía, microondas, síntesis y purificación

INTRODUCCIÓN

Las cumarinas son compuestos orgánicos cíclicos, su nombre proviene del término “cumarou” nombre común que se le da al haba de tonca. Son metabolitos secundarios, es decir, son compuestos generados en las especies vegetales que no cumplen funciones vitales en las plantas, pero intervienen en las interacciones como defensa contra predadores y patógenos, o para atraer polinizadores entre otras funciones. Químicamente, las cumarinas son ésteres cíclicos insaturados o lactonas α,β-insaturadas, que se denominan, como núcleos, de benzo-2-pirona o benzo-α-pirona (Figura 1).

Las cumarinas muestran actividades biológicas importantes como analgésicos, anti-inflamatorios, anticoagulante, antimicrobianos, antivirales y actividades inhibidoras de la proteasa del VIH. También son importantes debido a su amplia gama de aplicaciones a nivel industrial, siendo empleadas como aditivos para alimentos y cosméticos, agentes abrillantadores ópticos, productos farmacéuticos y agroquímicos, por mencionar algunos.

[1] Universidad Autónoma de Zacatecas, Unidad Académica de Ciencias Químicas, Programa Académico de Ingeniería Química; Campus Siglo XXI, Edificio 6, Carretera. Zacatecas-Guadalajara Km. 6.0 s/n, Ejido La Escondida, C.P. 98160, Zacatecas, Zacatecas, ethsoncarreraa@gmail.com
[2] Universidad Autónoma de Zacatecas, Unidad Académica de Ciencias Químicas, Programa Académico de Ingeniería Química, Laboratorio de Síntesis Asimétrica y Bioenergética; Campus Siglo XXI, Edificio 6, Carretera. Zacatecas-Guadalajara Km. 6.0 s/n, Ejido La Escondida, C.P. 98160, Zacatecas, Zacatecas, virginia.flores@uaz.edu.mx

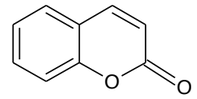


Figura 1. Estructura general de una cumarina

Las reacciones fundamentales, clásicas, para la síntesis de cumarinas son cuatro: la reacción de Perkin, el reordenamiento de Claisen-Schmidt, la condensación de Pechmann y la condensación de Knoevenagel. En esta última interviene un aldehído aromático el cual se hace reaccionar con un anhídrido de ácido y es generalmente catalizada por bases como piperidina, piridina, amoníaco o etóxido de sodio en disolventes orgánicos. Es uno de los métodos más empleados en la formación de enlaces carbono-carbono en la síntesis orgánica, con numerosas aplicaciones en la síntesis de productos químicos. Tradicionalmente la síntesis química y los métodos de preparación de compuestos se han llevado a cabo mediante un mecanismo de calentamiento de tipo conducción/convección, mediante una fuente externa que transmite el calor a las paredes del recipiente que contiene los reactivos y posteriormente el calor es transmitido hasta alcanzar el seno de la reacción y llevar a cabo las transformaciones. Otra forma de realizar la síntesis es por métodos no convencionales los cuales tienen la finalidad de llegar al mismo producto pero de una manera más sencilla o cambiando el método de proporcionar la energía necesaria con el fin de conseguir beneficios como lo son tiempos menores de reacción, menores costos en el proceso, mayor eficiencia, etcétera.

Entre los métodos no convencionales podemos encontrar: a) síntesis con ultrasonido, b) síntesis orgánica a altas presiones y c) síntesis en microondas (MO). Las reacciones en MO representan un avance en la metodología de la síntesis orgánica, el uso de energías convencionales para calentar reactivos es conocido por su ineficiencia y gran consumo de tiempo. En comparación, las MO pueden transferir energía directamente a las especies reactivas; el llamado calentamiento molecular, el cual puede promover transformaciones que el calentamiento convencional en ocasiones no permite, debido a que no se desperdicia la energía en el calentamiento de los materiales y se concentra directamente en las sustancias. Esta innovación en la tecnología proporciona ventajas como reducción significativa de tiempos de reacción, menor consumo de reactivos y disolventes; disminución en la cantidad de desechos tóxicos, control de temperatura y presión, manejo de sistemas abiertos y cerrados, aumenta rendimientos, reduce reacciones laterales, promueve la reproducibilidad, por lo cual se clasifica como un método de química verde, es decir, que va enfocada al diseño de productos y procesos químicos que implica la reducción o eliminación de productos químicos secundarios o no deseables con un ahorro de energía significativo y amigable con el medio ambiente. Así, en el presente trabajo se plantea la obtención de la 7-hidroxicumarina-3-carboxilato de etilo a partir de la condensación de Knoevenagel mediante un método convencional y un método asistido por microondas y la purificación del mismo por medio de cromatografía de columna.

MÉTODOS Y MATERIALES

Para llevar a cabo las reacciones se utilizaron matraces de reacción de la marca Pyrex de diferentes volúmenes, refrigerantes rectos, vasos de precipitados, agitadores de teflón, bomba de recirculación de agua. Todo el material fue lavado con Dextran de pH 7 y secado en una estufa a 80 °C al menos durante 12 horas. Los equipos utilizados fueron una balanza analítica marca AND modelo G-200, se utilizó un equipo de microondas marca CEM modelo Discovery System, un rotavapor Büchi modelo B-490 y una cámara de luz ultravioleta marca entela.

Los reactivos se colocaron en recipientes contenedores de plástico para su pesado. Las especificaciones de estos se muestran en la tabla 1.

Tabla. 1. Reactivos y disolventes utilizados

Reactivos	Marca	% Pureza	CAS
2,4-dihidroxibenzaldehido	Aldrich	98	95-01-2
Malonato de dietilo	Aldrich	99	105-53-3
Trietilamina	Sigma Aldrich	>99.5	121-44-8
Etanol	Química Meyer	96	5410-20
Acetato de Etilo	Química Meyer	99.7	141-78-6
Hexano	Química Meyer	99.9	110-54-3
Acetona	Química Meyer	99	67-64-1

La metodología empleada para llevar a cabo el trabajo de experimentación consistió en el monitoreo de las reacciones por medio de cromatografía de placa fina, para ello se utilizaron cromatoplacas de gel de sílice 60 F_{254} con soporte de aluminio de la marca Merck de diferentes dimensiones (1.0, 1.5, 2.0 y 4.0 cm de ancho por 4 cm de largo), para apreciar las señales, dichas placas cromatográficas fueron reveladas con luz UV y un revelador químico de sulfato cérico amoniacal y se emplearon cámaras de elución de vidrio de borosilicato y mezclas de disolventes. Para la purificación de los crudos de reacción mediante columna cromatográfica se empleó gel de sílice 60 (230 mallas) y mezclas de disolventes previamente destilados. Para eliminar el disolvente de las reacciones, así como de las fracciones obtenidas de la columna de purificación se empleó un rotavapor.

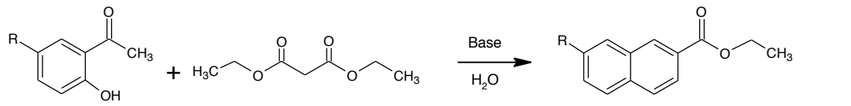
Para la obtención de la 7-hidroxicumarina-3-carboxilato de etilo (7-HC), mediante la reacción de Knoevenagel (por un método convencional) se hizo reaccionar 1.0 mol de 2,4-dihidroxibenzaldehído (2,4-DHB) disuelto en metanol, a esta solución se agregó por goteo 1.1 mol de malonato de dietilo seguido por cantidades variables de la base trietilamina (Entrada 1, Tabla 2). La reacción se dejó en agitación magnética por 24 horas a temperatura ambiente. Posterior a esto se agregó ácido clorhídrico al 10 % para terminar la reacción. Se realizó una extracción de disolvente hasta sequedad en un rotavapor y el crudo de reacción fue purificado por cromatografía en columna.

Para la obtención por método asistido por microondas se emplearon las mismas proporciones molares de los reactivos con variantes en la cantidad y tipo de base empleada. En un caso (Entrada 2, Tabla 2) donde se utilizó trietilamina como base la reacción fue sometida a irradiación de microondas a una temperatura de 60 °C durante 50 minutos por lapsos de 10 minutos, una vez transcurrido este tiempo se agregó ácido clorhídrico al 10 % para terminar la reacción.

Este procedimiento se repitió en una segunda reacción variando la cantidad de base y el tiempo de reacción, ya que este fue de 80 minutos (Entrada 3, Tabla 2). Posteriormente se realizó una última reacción donde la base utilizada fue piridina (0.76 mg) con un tiempo de reacción de 40 minutos (Entrada 4, Tabla 2). Finalmente el producto de la reacción 3 se sometió a purificación por cromatografía en columna donde se seleccionó una columna cromatográfica de 47 cm de altura y 2.5 cm de diámetro la cual fue empacada con 33.6973 gramos de gel de sílice la cual fue trabajado con diferentes mezclas de disolventes.

RESULTADOS

Se llevó a cabo una reacción para la obtención de la 7-HC por un método convencional utilizando como base trietilamina y tres reacciones por un método asistido por microondas utilizando como base piridina en un caso y en los otros dos trietilamina (Figura 2).

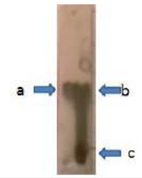
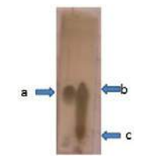
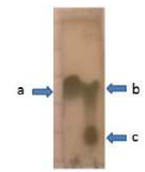
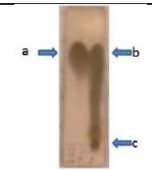


2,4-dihidroxibenzaldehido malonato de dietilo 7-hidroxicumarina-3-carboxilato de etilo

Figura 2. Obtención del núcleo base 7-hidroxicumarina-3-carboxilato

Las reacciones fueron monitoreadas mediante el uso de las placas cromatográficas lo que nos permitió observar mediante las manchas y R_f el progreso de las reacciones conforme al tipo de método utilizado, el tipo de base empleada y el tiempo de reacción, los resultados se muestran en la tabla 2.

Tabla. 2. Placas de CCF de los crudos de reacción obtenidos

Entrada	Base utilizada	Tiempo	Evolución por CCF	Observaciones
1	Trietilamina	24 horas		Después de las 24 horas de reacción se observó la presencia del producto buscado (c) acompañada de la mancha (b) que corresponde a la materia prima.
2	Trietilamina	50 minutos		Se observaron 2 manchas (a y b) con el mismo R_f que corresponden a la 2,4-DHB y la mancha (c) que corresponde a la 7-HC, con un bajo porcentaje de transformación.
3	Piridina	40 minutos		Se encontró la presencia de (b) correspondiente a la materia prima y una mancha (c) correspondiente al producto buscado que al ser comparado con la materia prima se observó un buen porcentaje de transformación.
4	Trietilamina	80 minutos		Se observó la presencia de una gran cantidad de materia prima (a y b) correspondiente al reactivo (2,4-DHB) y una muy baja transformación al producto buscado.

Después de los cuatro experimentos realizados, encontramos que el método asistido por microondas presentó ventajas respecto a acortar los tiempos de reacción y un mejor proceso de transformación al producto deseado, en comparación con el método convencional; además, las placas de la tabla 2 muestran que al utilizar piridina como base se obtuvieron porcentajes de transformación y menores tiempos de reacción que obtenidos al usar trietilamina.

Con lo anterior, la reacción de la entrada 3 se sometió a un proceso de purificación por cromatografía de columna; obteniendo 399 fracciones (Figura 7), las cuales fueron agrupadas con base en su R_f. Sin embargo, debido a la afinidad presentada por los compuestos por la fase estacionaria, se tuvieron problemas con la obtención de productos totalmente puros como se muestra en las figuras 8 y 9 donde se observa la presencia del compuesto 7-HC acompañado de un producto secundario con R_f muy similar por lo que el proceso de purificación se considera poco eficiente y se deberán evaluar otras alternativas de purificación.

Figura 7. Columna cromatográfica de la purificación del producto obtenido de la reacción 3

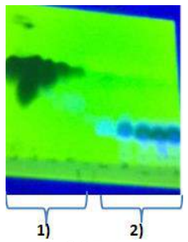


Figura 8. CCF de reacción 3 visto en lámpara UV a 254 nm: 1) fracciones 1-6, manchas con Rf de reactivos utilizados, 2)fracciones 7-12, manchas de producto buscado

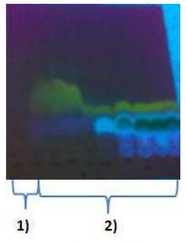


Figura 9. CCF de reacción 3 visto a 365 nm: 1) fracciones 1 y 2, reactivos utilizados , 2)fracciones 3-12, se observa la presencia de más de un producto

CONCLUSIONES

Se realizó la reacción para la obtención de la 7-hidroxicumarina-3-carboxilato de etilo mediante la reacción de Knoevenagel por una metodología convencional y vía microondas variando los tiempos de reacción, cantidades y tipo de base empleadas. Mediante cromatografía de capa fina se observó el método de microondas presenta una gran ventaja en tiempos de reacción que el método convencional, respecto a la base, piridina presentó mejores resultados que los obtenidos al usar trietilamina. La purificación del

compuesto 7-HC no se logró bajo el método de cromatografía en columna empleando como fase estacionaria gel de sílice, se sugiere evaluar otras posibilidades de purificación para este núcleo base.

BIBLIOGRAFÍA

DARIUSZ, B. (1998). "Coumarins: fast Synthesis by Knovenagel Condensation under microwave Irradiation" en *Journal of Chemical Research*, Num. 8, Vol. I, Abril, [pp.468-469].

DE, S. K., GIBBS, R. A. (2005). "An efficient and practical procedure for the synthesis of 4-substituted coumarins" en *Synthesis*, Num. 8, Vol.I, Agosto, [pp.1231-1233]

GUTIERREZ, A. R. (2007). *Nuevas moléculas conjugadas del tipo fenilenvinilideno portadores de quinonas. Síntesis convencional y mecanosíntesis, caracterización y elaboración de nano películas para el desarrollo de diodos semiconductores* (tesis de licenciatura). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Recuperado de http://dgsa.uaeh.edu.mx:8080/bibliotecadigital/handle/231104/1670

MUÑOZ F., CASTILLO J. (2009). "Departamento de ciencias nucleares (DCN). Utilización de la radiación de microonda para la síntesis de cumarinas y compuestos quinolínicos" en *Revista Politécnica*, Num. 1Vol. XXX, [pp.150–160]

KUMAR, B. V., NAIK, H. B., GIRIJA, D. (2011). "ZnO nanoparticle as catalyst for efficient green one-pot synthesis of coumarins through Knoevenagel condensation" en *Journal of. Chemical. Science,* Num. 5, Vol.CXXIII , September 2011, [pp. 615–621]

PROPAGACIÓN IN VITRO DE PLANTAS DE ZONAS ÁRIDAS

Miguel Ángel Carrera Farías[1] y Eugenio Pérez Molphe Balch[2]

RESUMEN

Las plantas son de vital importancia para la supervivencia de muchas especies y son las responsables de un hábitat determinado, al ser los productores primarios proporcionan el camino a seguir de la vida silvestre. En México contamos con gran diversidad vegetal, ya que poseemos una alta variedad de ecosistemas. Cabe mencionar que nuestro territorio puede presumir la mayor cantidad de especies de agaváceas y cactáceas en el mundo. En este trabajo se llevaron a cabo los procesos de propagación in vitro de plantas de zonas áridas y semiáridas, usando diferentes técnicas biotecnológicas para obtener resultados más eficientes, tales como el uso de hormonas para favorecer la brotación y el enraizamiento, pasos clave para la propagación correcta de esta especie de organismos.

ABSTRACT

The plants are of vital importance for the survival of many species and they're the responsible of a determinate habitat being the primary producers that contribute the path to keep the wild life. In Mexico we have immense plant diversity, because we have a high variety of ecosystems. It should be noted that our territory can show off the most quantity of agavaceae and cactaceae in the world, In this research, we can see the experimental results of an in vitro plant propagation process of arid and semi-arid zones, using different biotechnology technics to obtain the most efficient results, like the use of hormones to improve the budding and rooting, that are the key steps for a correct propagation of this specie of organism.

Key Words: Multiplicación, Agave, cactáceas, germinación, brotación.

INTRODUCCION

México es el país con mayor cantidad de especies de Cactáceas y Agaváceas en el mundo. Tan sólo del género Agave se han reportado 197 especies y en México podemos encontrar 136 y por el lado de las cactáceas se han reportado más de 600 especies mexicanas, con el 80% endémicas, lo cual convierte al territorio nacional como el país con mayor diversidad de géneros y especies (Ortega-Baes et al., 2010).

[1] Universidad de Guanajuato, División de Ciencias Naturales y Exactas; Noria Alta S/N, 36000, Guanajuato, Guanajuato, ma.carrerafarias@ugto.mx
[2] Universidad Autónoma de Aguascalientes, Unidad de Biotecnología Vegetal, Av. Universidad #940, Ciudad Universitaria, 20131, Aguascalientes, Ags, eperezmb@correo.uaa.mx

La importancia de estas familias propias de ecosistemas áridos y semiáridos no sólo se limita a su valor ecológico, se debe también a su valor económico y cultural que han tenido al pasar de los años. Tradicionalmente se ha usado a estas plantas para la producción de artesanías, bebidas alcohólicas, rituales religiosos, materiales para construcción y recientemente se han utilizado mucho como plantas ornamentales. Sin embargo, la explotación masiva de estas plantas nos ha dejado con una disminución en la diversidad biológica muy rápidamente. Es por ello que se requieren con urgencia nuevas técnicas que nos proporcionen el abasto que necesita la creciente población para realizar las actividades y que no haya una pérdida masiva de la biodiversidad.

El uso de la biotecnología vegetal y la propagación in vitro de plantas de zonas áridas y semiáridas aparece como una posible solución ya que es un proceso muy rápido y prácticamente ilimitado, donde de una sola planta puede conseguir varios brotes y de éstos seguir consiguiendo, y así sucesivamente.

El objetivo de este estudio es demostrar paso a paso el proceso de propagación in vitro de cactáceas, agaváceas y nolináceas, pasando por las siguientes etapas:

- Germinación y desinfección de semillas
- Micropropagación de cactáceas
- Micropropagación de agaváceas
- Micropropagación de nolináceas
- Etapa de enraizamiento
- Transferencia a suelo

METODOS

Desinfección y germinación in vitro de semillas

Se utilizaron semillas de dos espcies de agaves, *Agave guiengola y Agave angustifolia*, asi como dos espcies de cactáceas, *Ferocactus hamatacanthus* y *Stenocereus dumortieri.* Las semillas se desinfectaron lavándolas con detergente líquido (Dermoclean) con agua corriente de tres a cinco veces, usando un vaso de precipitados y agitador magnético. Posterior a ello se pasaron a u una solución del etanol al 70% por 30 segundos, teniendo cuidado de no sobrepasar este tiempo para no matar al embrión. Pasado el proceso anterior se trataron con solución de Cloralex al 10% por 20 minutos y se taparon con aluminio para mantener las mejores condiciones de asepsia posibles.

Para la etapa de la siembra se llevó el vaso aún tapado a campana de flujo laminar y se utilizaron pinzas estériles para la siembra. El medio de cultivo utilizado fue MS (Murasige y Skoog, 1962) basal, a ph 5.7 y con 10g/L de agar como gelificante. Los cultivos se mantuvieron a 25°C bajo luz con fotoperiodo por 5 días y se desecharon los frascos contaminados, posteriormente a ello se dejaron alrededor de 3 semanas y se deicidio proliferar aquellos que alcanzaban el borde del frasco.

En experimentos posteriores se utilizaron las mismas condiciones de incubación y el mismo medio basal, pero con algunas otras especificaciones para favorecer los procesos, en caso de trabajo con agaváceas y nolináceas se trabajó con 8g/L de agar. Los experimentos posteriores utilizaron especies proporcionadas por el banco de germoplasma de la Unidad de biotecnología vegetal de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

Multiplicación *in vitro*

La propagación se dividió en tres semanas, en cada una de ellas se trabajó con una familia de plantas diferente, Cactáceas, Agaváceas y Nolináceas. Las especies trabajadas fueron: *Myrtillocactus geometrizans, Ferocactus peninsulae, Opuntia ficus-indica, Escontria chiotilla,* por parte de las cactáceas, *Agave funkiana y Agave peacockii*, por parte de las agaváceas y por último se trabajó con *Dasylirion acrotiche (*sotol), como representante de la familia de las nolináceas.

Para la propagación de estas plantas se utilizaron concentraciones diferentes de citocininas, a fin de evaluar la respuesta de cada una de las especies a los distintos tratamientos y observar su generación de brotes: Control (MS basal), Benciladenina (BA) y 6-γ,γ-dimetilalilaminopurina (*2iP*). Las concentraciones se muestran en las tablas.

Etapa de enraizamiento

En esta etapa se utilizaron 3 condiciones diferentes para observar la generación de raíces. Se utilizó Ácido indolbutírico (IBA), una hormona de la familia de las auxinas, Carbón activado y un grupo control con medio MS basal.

Se probaron dos especies de cactáceas *Echinocereus spinigemmatus* y *Pilosocereus chrysacanthus, y* dos especies de agaváceas, *Agave bracteasa y Agave obscura*..

Transferencia a suelo

Se utilizaron explantes con raíces visibles de la especie *Pilosocereus chrysacanthus* y se aclimataron abriendo los frascos por 3 días antes de su traspaso al suelo. Los explantes se extrajeron del medio de cultivo in vitro, se lavaron con agua corriente y se impregnaron de enraizador comercial para luego sembrar en macetas con tierra. El objetivo de este proceso es observar el porcentaje de supervivencia de explantes a dos semanas de su traspaso al nuevo medio.

RESULTADOS

El porcentaje de contaminación de semillas fue inferior al 20% en las distintas especies. Los porcentajes de germinación fueron de 92.37%, 72%, 61% y 9% para *Agave angustifolia, Agave guiengola, Ferocactus hamatacanthus y Stenocereus dumortieri,* respectivamente (Fig1).

Se observó un efecto positivo con el uso de las diferentes citocininas para la etapa de propagación.

Para *Myrtillocactus geometrizans* el mejor tratamiento fue el de BA a 1mg/L con 1.64 brotes por explante, para *Ferocactus peninsulae* el mejor tratamiento fue el de 2ip a 1mg/L con .57 brotes por explante, para *Opuntia ficus-indica* el mejor tratamiento fue el de BA al 1mg/L con 2.5 brotes por explante, y por último para *Escontria chiotilla* el tratamiento de 1mg/L 2ip fue el más eficiente con 0.7 brotes por explante.

Para la propagación de los géneros de *Agave*; *Agave funkiana y Agave peacockii* se utilizaron las concentraciones de hormonas mostradas en la figura (número) y se pudo observar que hubo un efecto positivo del uso de las hormonas con respecto al control, en cada uno de los tratamientos. Tanto para

Agave peacockii como para *Agave funkiana* el mejor tratamiento resultó ser el de 2mg/L de BA, con una brotación de 6.4 y 4.52 brotes por explante, respectivamente.

Para las nolináceas no fue posible reportar el número de brotes por explante, así que se contabilizó el número de frascos que tuvieron brotación (evidencia fotográfica)

En el caso del enraizamiento se utilizaron cuatro especies, dos de cactáceas y dos de agaváceas, con dos tratamientos, uno que contenía 2g/L de carbón activado y otro con 0.5 mg/L de ácido indolbutírico (IBA), con su respectivo grupo control. Debido a la falta de tiempo no se pudo observar un crecimiento de raíces en ninguna de las 4 especies, ´por lo que sólo se reporta evidencia fotográfica. Fig (Número)

La última etapa corresponde a la transferencia a suelo, en la que sólo se utilizó una especie de la familia de las cactáceas *Pilosocereus chrysacanthus* y se dejó por periodo de 2 semanas para observar su crecimiento y supervivencia (Evidencia fotográfica).Para el traspaso a suelo se sembraron un total de 49 explantes con una supervivencia de 15 especies y un por centaje de supervivencia de 30.61%.

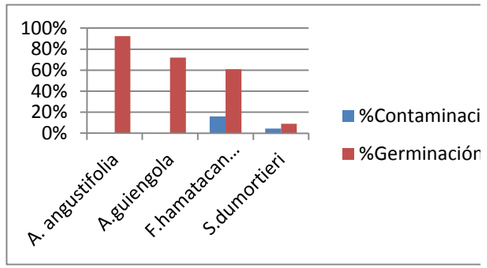


Figura 1. Porcentaje de germinación y contaminación de semillas *in vitro*

.5 BA	Azul
1 BA	VERDE
1 2ip	Amarillo
2 2ip	Rosa
Control	S/C

Figura 2. Tabla informativa de tratamientos para cactácea

Tabla 2. Número de brotes por explante de *Myrtillocactus geometrizans*

Myrtillocactus geometrizans

Exp1 T1		Exp2 T2		Exp3 T3		Exp4 T4		Exp5 T5	
1	1	1	2	1	1	1	0	1	1
2	0	2	4	2	2	2	0	2	0
3	3	3	3	3	1	3	0	3	0
4	0	4	1	4	0	4	0	4	0
5	1	5	0	5	1	5	0	5	2
6	0	6	0	6	1	6	0	6	0
7	0	7	2	7	2	7	0	7	0
8	0	8	1	8	1	8	2	8	0
9	1	9	2	9	1	9	1	9	2
10	0	10	1	10	2	10	1	10	1
11	5	11	1	11	1	11	0	11	2
12	0	12	1	12	0	12	1	12	3
13	2	13	3	13	1	13	0	13	1
14	0	14	2	14	1	14	2	14	0
15		15		15	1	15	1	15	0
16		16		16		16	1	16	0
17		17		17		17	1	17	0
18		18		18		18		18	0
19		19		19		19		19	0
20		20		20		20		20	0
Prom	0.93	Prom	1.6	Prom	1.07	Prom	0.588	Prom	0.6

Tabla 3. Número de brotes por explante de *Ferocactus peninsulae*

Ferocactus peninsulae

Exp1 T1		Exp2 T2		Exp3 T3		Exp4 T4		Exp5 T5	
1	3	1	0	1	2	1	0	1	0
2	0	2	0	2	0	2	0	2	0
3	0	3	1	3	0	3	1	3	0
4	0	4	0	4	0	4	0	4	0
5	0	5	0	5	2	5	0	5	0
6	0	6	0	6	0	6	0	6	0
7	1	7	0	7	0	7	2	7	0
8	1	8	0	8	0	8	0	8	0
9	0	9	0	9	2	9	1	9	0
10	0	10	0	10	1	10	0	10	0
11	1	11	2	11	1	11	0	11	1
12	0	12	0	12	0	12	0	12	0
13		13		13	0	13	0	13	0
14		14		14	0	14	0	14	0
15		15		15		15	0	15	0
16		16		16		16	0	16	0
17		17		17		17	2	17	1
18		18		18		18	0	18	0
19		19		19		19		19	
20		20		20		20		20	
Prom	0.5	Prom	0.3	Prom	0.57	Prom	0.333	Prom	0.11

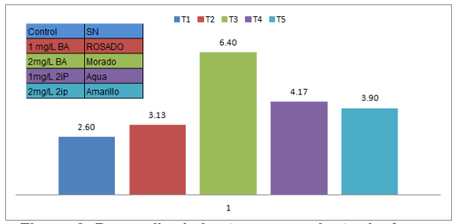


Figura 2. Promedio de brotes por explante de *Agave peacockii*

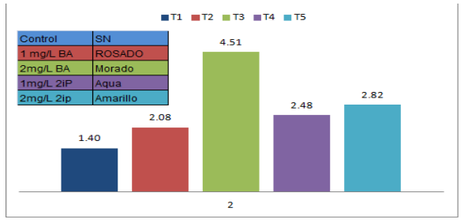


Figura 3. Promedio de brotes por explante de *Agave funkiana*

Figura 4. Observación de brotes en *Opuntia ficus-indica* con tratamiento de 1mg/L de BA

Figura 5. Observación de brotes en *Dasylirion acrotiche* (Nolináceas)

Figura 6. Observación del traslado a suelo de *Pilosocereus chrysacanthus*

Figura 7. Observación de germinación de semillas *in vitro* de *Ferocactus hamatacanthus*

DISCUSIONES

En este trabajo se realizaron diversos protocolos que requieren gran cantidad de tiempo para obtener resultados contundentes, gran parte de los mismos se vieron restringidos por el poco tiempo que se tuvo para el desarrollo experimental. En el caso específico del enraizamiento y de la transferencia a suelo los resultados se limitaron a ser sólo por evidencia fotográfica mientras que para el protocolo de propagación se observaron resultados por efecto de las citocininas, particularmente de la benciladenina que en Cactáceas la mejor concentración fue de 1mg/L y en Agaváceas 2mg/L. Con las Nolináceas se complicó

el conteo de brotes por explante, debido a la complicada manipulación y muchos de los explantes se necrosaron por lo que el resultado también se limitó a evidencia fotográfica.

CONCLUSIONES

La investigación tiene como finalidad abastecer de especies al banco de Germoplasma de la Unidad de Biotecnología Vegetal de la Universidad Autónoma de Aguascalientes para el posterior uso del material biológico en futuras investigaciones. La manera en que se logró lo anterior fue de manera muy didáctica puesto que se aprendieron las principales técnicas de propagación, comenzando desde la siembra de semillas hasta la etapa de transferencia a suelo.

REFERENCIAS

1. Casaretto J, Jordan M (2006) Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas, Ediciones Universidad de la Serena, Chile.
2. Dominguez Rosales M, Alpuche Solis A, Vasco Méndez N, Pérez Molphe Balch E (2008), Efecto de las citocininas en la propagación *in vitro* de Agaves Mexicanos, Revista Fitotecnia Mexicana, Núm. 4, Vol. 31, Octubre-Diciembre (p.317-322)
3. Pérez Molpe-Balch E, Santos-Diaz M, Ramírez-Malagón R, Ochoa-Alejo N (2015), Tissue cultura of ornamental cacti, Scientia Agricola, Num. 6, Vol. 72, Noviembre-Diciembre. (p.540-561)
4. Reyes Silva A, Morales Muñoz C, Pérez Reyes M, Pérez Molphe Balch E 2013, Propagación *in vitro* de nolináceas mexicanas, Investiación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, Núm. 58, Mayo-Agosto (17-25)

IDENTIFICACIÓN DE LA LOCALIZACIÓN CELULAR DE LAS PROTEÍNAS *ATGRDP1* Y SU PARÁLOGO *ATGRDP2* EN *NICOTIANA BENTHAMIANA* Y *ARABIDOBSIS THALIANA*

Diana Lucila Castellanos Rodríguez[1] y Juan Francisco Jiménez Bremont[2]

RESUMEN

La proteína *AtGRDP1* está involucrada en la respuesta al estrés abiótico. En un análisis de la proteína se encontró que contenía dominios como el DUF1399 de función desconocida, un motivo putativo de unión a RNA y el dominio rico en glicinas en el caso de la versión completa. En este estudio se analizó la localización celular de *AtGRDP1, AtGRDP1* $_{splicing}$ y su parálogo *AtGRDP2* en líneas transformadas de forma transitoria de *Nicotiana benthamiana* para sugerir su posible papel en la célula. La versión de splicing de *AtGRDP1* se localizó principalmente en núcleo y la versión completa y su parálogo se localizaron tanto en núcleo como en pared celular. La localización nuclear de la proteína sugiere su actividad de RNA chaperona. Adicionalmente, se estudió el comportamiento de *AtGRDP1* y *AtGRDP1* $_{splicing}$ en líneas transformantes estables de *Arabidopsis thaliana* bajo condiciones de estrés abiótico y tratamientos hormonales, observando una influencia de los tratamientos en el comportamiento de las proteínas.

ABSTRACT

The *AtGRDP1* protein is involved in the response to abiotic stress. Domains was founded in an analysis of the protein, such as DUF1399 of unknown function, a putative RNA binding motif and a rich glycines motifs in the case of the full version. The possible cellular localization of *AtGRDP1*, *AtGRDP1* $_{splicing}$ and its paralog *AtGRDP2* was analyzed in transitory transformed lines of *Nicotiana benthamiana*. The splicing versión was mainly located in nucleus and in the case of the full version and its paralog were located in nucleus and cell wall. The presence of a RNA putative motif in *AtGRDP1* and *AtGRD2* protein suggests its activity as chaperon RNA activity. Additionally, the behavior of *AtGRDP1* and *AtGRDP1* $_{splicing}$ was studied in stable transformants lines of *Arabidopsis thaliana* under abiotic stress conditions and hormone treatments, by observing an influence of the treatments on behavior of the proteins.

Palabras clave: *N. benthamiana*, *A. thaliana*, *AtGRDP1, AtGRDP1* $_{splicing,}$ *AtGRDP2,* GFP.

INTRODUCCIÓN

Las proteínas ricas en glicina (GRPs) se caracterizan por contener más del 60% de residuos de glicina (Mousavi y Hotta, 2004) y han sido encontradas en diferentes tejidos de gran cantidad de especies eucariotas. Este tipo de proteínas pueden llevar a cabo diferentes funciones en las plantas, algunas de ellas son componentes de la pared celular de plantas superiores (Mousavi y Hotta, 2004; Mangeon *et al*., 2010) y se acumulan principalmente en tejidos vasculares. La síntesis de estas proteínas son parte del mecanismo de defensa de la planta (Mousavi y Hotta, 2004).

Las GRPs que están presentes en la pared celular han sido descritas en plantas como petunia, Arabidopsis, cebada y arroz, ya que en su mayoría la expresión de estas proteínas se ha visto regulada por el desarrollo de la planta (Mousavi y Hotta, 2004). Adicionalmente, también se ha observado que la expresión de algunas GRPs está modulada por factores bióticos y abióticos (Mangeon *et al*., 2010), que van desde infección de

[1] Universidad Autónoma de Aguascalientes, Departamento de Química; Avenida Universidad 940, Ciudad Universitaria, C.P: 20131, Aguascalientes, Ags., dianacastellanos592@gmail.com
[2] Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, División de Biología Molecular; Camino a La Presa de San José 2055, Lomas 4 sección, IPICYT, C.P: 78216, San Luis, S.L.P., jbremont@ipicyt.edu.mx

patógenos hasta diversas formas de estrés ambiental, como salinidad, luz y el estrés hídrico (Mousavi y Hotta, 2004), así mismo están modulados por la fitohormona ácido abscísico (ABA) (Mangeon *et al*., 2010). Algunos GRPs se caracterizan por contener motivos de unión a RNA (Mousavi y Hotta, 2004). De este tipo de proteínas de unión a RNA (RBPs) se ha encontrado juegan un papel importante en el control post-transcripcional del RNA (Mangeon, 2010), el cual se ha reportado que es una de las principales formas de regulación de expresión génica durante el desarrollo. El control post-transcripcional puede ocurrir en diferentes etapas del metabolismo del RNA, incluyendo en la etapa de splicing, poliadenilación, estabilidad, localización y traducción del RNAm (Mee y Schedl, 2006; Mangeon, 2010). Este tipo de GRPs, además de contener regiones ricas en glicina, también presentan otro tipo de motivos de reconocimiento de RNA, dominios de respuesta a frío (CSD) en la región N-terminal y motivos tipo dedos de zinc en la región C-terminal (Flores-Fusaro y Sachetto-Martins, 2007). El motivo RRM es un dominio de aproximadamente 90 aminoácidos que contienen un octapéptido altamente conservado el cual es denominado como secuencia consenso de ribonucleoproteína (RNP-CS) (Mousavi y Hotta, 2004).

En el caso particular de *AtGRDP1, ésta* es una proteína que contiene un pequeño dominio rico en glicinas, un dominio DUF1399 localizado en la región N-terminal. En el trabajo de Rodríguez-Hernández *et al* (2014) se demostró que el gen *AtGRDP1* juega un papel regulatorio en la señalización de ABA y durante la tolerancia al estrés abiótico. También encontraron que *AtGRDP1* contiene secuencias consenso de proteínas de unión a RNA. El motivo putativo de unión a RNA (KGSCFFPI) se encontró en la región central, el cual es equivalente a RNP-1 (ribonucleoproteína-1) que se ha encontrado presente en otras proteínas con actividad RNA chaperona. Adicionalmente, el parálogo del gen AtGRDP1, el gen AtGRDP2, se encontró que comparte la presencia del dominio rico en glicinas y un motivo putativo de reconocimiento de RNA (RRM) (Ortega-Amaro *et al.,* 2016). *AtGRDP2* principalmente se expresa en estructuras como las flores. Se sugiere que este se encuentra desempeñando un papel importante en el crecimiento y desarrollo de *A. thaliana* y *Lactuca sativa,* mostrando una conexión con la señalización de auxinas, además de que interviene en la respuesta al estrés salino.

En este trabajo, nuestro principal objetivo fue demostrar la posible localización celular de la proteína *AtGRDP1* y para ello llevamos a cabo el análisis de líneas transformantes estables en *A. thaliana* y la transformación de las construcciones reporteras con *AtGRDPD1, AtGRDP1* $_{splicing}$ y AtGRDP2 de forma transitoria en hojas de *Nicotiana benthamiana.*

2. Materiales Y métodos

2.1. *Transformación transitoria*

Para llevar a cabo la agroinfiltración se utilizaron plantas de *Nicotina benthamina* de tres a cuatro semanas de edad crecidas en día corto (8 horas de luz).

Se emplearon cepas de *Agrobacterium tumefaciens* (GV3101 p35S) resistentes a kanamicina y rifampicina con las siguientes transformaciones: *35S::AtGRDP1, 35S::AtGRDP2, 35S::AtGRDP1* $_{splicing}$, proteína verde fluorescente (GFP), *mRFP* y *p19*. Se colocaron en obscuridad por 24 horas a 28°C. Posteriormente, las bacterias con una O.D. $_{600}$ entre 1 y 2 fueron cultivadas en solución de transformación por 5 horas, la cual contiene $MgCl_2$ 10 mM, MES 10 mM y acetosiringona en DMSO (50 µl/50ml).

Se llevó a cabo una agroinfiltración en el envés de las hojas de tabaco. Se realizaron cuatro ensayos diferentes colocado la misma proporción de cada inóculo con las siguientes combinaciones: 1) *AtGRDP1* + *p19* + RFP, 2) *AtGRDP2* + *p19* + RFP, 3) *AtGRDP1* $_{splicing}$ + *p19* + RFP y 4) *GFP* + *p19* + RFP.

Una vez agroinfiltradas, las plantas fueron colocadas en cámaras de crecimiento durante 48 horas y posteriormente se observaron en microscopía de epifluorescencia.

2.2. Análisis de localización de la expresión de AtGRDP1

Plántulas de *Arabidopsis thaliana* con los tres diferentes genotipos, Col-0, *AtGDP1* y *AtGRDP1* $_{splicing}$ fueron sembradas en medio MS y vernalizadas por 48 horas a 4°C. Posteriormente se mantuvieron a 22°C por 15 días. Fueron observadas en microscopía de epifluorescencia.

2.3. Análisis de localización de la expresión de AtGRDP1 bajo condiciones de estrés y tratamiento de fitohormonas.

Para inducir una respuesta de estrés las plántulas de 15 días fueron pasadas a un medio MS líquido suplementado con diferentes tratamientos. Para el estrés salino se utilizó medio MS suplementado con 175 mM de NaCl, para estrés osmótico se empleó una concentración de sorbitol 6%. Para el caso de las fitohormonas probadas las plantas fueron incubadas en medio MS en presencia de dos diferentes concentraciones de ABA (Ácido abscísico) (10 y 25 µM) o de IAA (Ácido indolacético) (10 µM). Los ensayos de expresión fueron llevados a cabo utilizando dos plantas del control (Col-0), *AtGRDP1* y *AtGRDP2*$_{splicing}$ por tratamiento y fueron mantenidas por un periodo de 24 horas a 22°C.

2.4. PCR de comprobación del gen AtGRDP1 y AtGRDP1$_{splicing}$ *en cepas trasnformadas de A. tumefaciens*
Para identificar el gen AtGRDP1 en *Agrobacterium tumefaciens (*GV3101 p35S) se colocó una alícuota del inóculo a 95°C para lisar la célula y posteriormente se realizaron ensayos de PCR utilizando primers correspondientes a las inserciones *AtGRDP1* y *AtGRDP1*$_{splicing.}$ Los primers utilizados fueron: FW ATG 22, 5'ATGGATAAGGAGAAGGATCAT y RV DUF, 5'TCAAGCTCATAAGGTTCATC. Las condiciones de tiempo y temperatura empleadas para realizar el PCR fueron las siguientes: 94° 5 min; 35 ciclos de: 94° 45 s, 58°C 45 s y 72°C 45 s; por último, la extensión final a 72°C por 5 min.

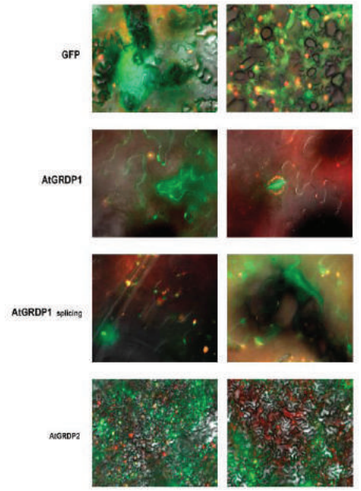


Figura 1. Imágenes tomadas en microscopio de fluorescencia de hojas de *Nicotiana benthamiana* de cuatro semanas de edad transformadas de forma transitoria con las construcciones reporteras *AtGRDP2, AtGRDP1* y *AtGRDP1*$_{splilcing.}$ Se realizaron cuatro ensayos diferentes colocado la misma proporción de cada inóculo con las siguientes combinaciones: 1) GFP + p19 + RFP, 2) *AtGRDP1* + p19 + RFP, 3) *AtGRDP1*$_{splicing}$ + p19 + RFP y 4) *AtGRDP2* +

3. RESULTADOS

3.1. Localización celular en sistema transitorio de N. benthamiana de* AtGRDP2, *AtGRDP1 y AtGRDP1$_{splilcing}$
Se realizó un ensayo de expresión transitoria para determinar la posible localización celular de las proteínas AtGRDP2, *AtGRDP1* y *AtGRDP1*$_{splilcing}$ en hojas transformadas de *N. benthamiana.* Para ello utilizamos construcciones con cada gen en el vector pMDC43 para realizar la fusión tradicional con GFP. Para inhibir el sistema de silenciamiento génico post-transcripcional realizado por la planta, se empleó el vector pMDC43 con la proteína p19 del virus del enanismo arbustivo del tomate (TBSV) que bloquea la degradación del RNA procedente del transgen *AtGRDP2*, *AtGRDP1 o AtGRDP1*$_{splilcing}$ según sea el caso. La localización de las proteínas *AtGRDP2*, *AtGRDP1* y *AtGRDP1*$_{splilcing}$ pudo ser visualizada por la fusión traduccional con la GFP. La siguiente construcción utilizada, pMDC43:mRFP, fue empleada para localizar el núcleo celular. La fusión de los fluoróforos RFP y GFP a *AtGRDP2, AtGRDP1* y *AtGRDP1 splicing* respectivamente, permitió que ambas proteínas se visualizaran y co-localizaron al mismo tiempo en el microscopio de fluorescencia.

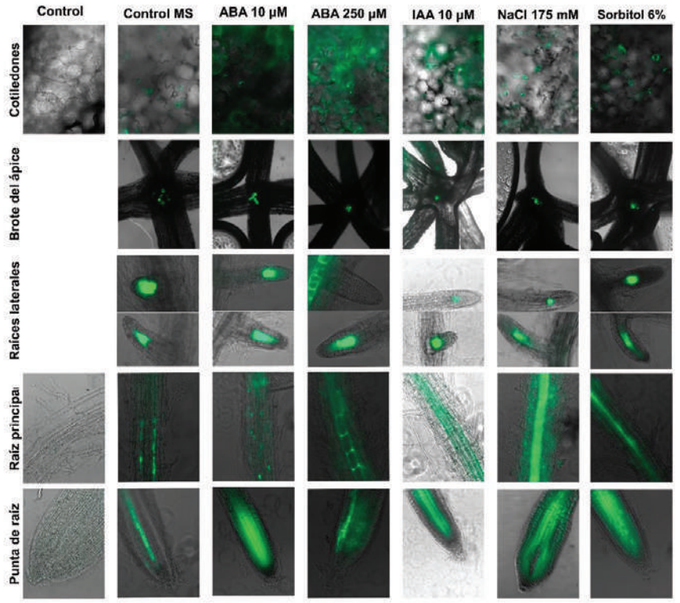


Figura 3. Localización celular de AtGRDP1 tras la exposición a estrés abiótico y tratamiento de fitohormonas en plantas transformadas estables de A. thaliana. Plántulas de 15 días fueron colocadas en medio MS líquido suplementado con diferentes tratamientos: ABA 10 y 25 µM, IAA 10 µM, NaCl 175 mM y sorbitol 6%. Las imágenes son individuos representativos de dos plántulas tratadas en dos repeticiones. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio de fluorescencia.

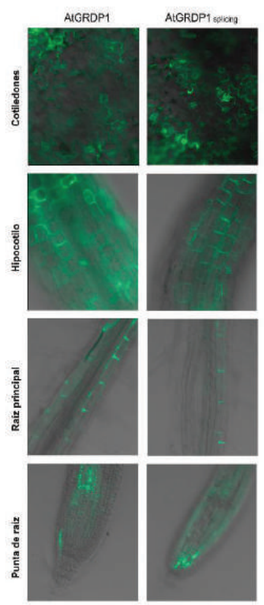


Figura 2. Líneas transformadas estables de *Arabidopsis thaliana* de ocho días de edad con los genotipos *AtGRDP1* y *AtGRDP1*$_{splicing}$ observadas en microscopio de epifluorescencia. Las imágenes representan.

Lo primero fue analizar la construcción control pMDC43:GFP, en el cual se pudo observar fluorescencia verde distribuida por núcleo y citoplasma. Por otro lado, al analizar las construcciones que contenía tanto *AtGRDP1* como *AtGRDP2* se encontraron en núcleo y citoplasma, en cambio, la proteína *AtGRDP1*$_{splicing}$ se observa principalmente en núcleo donde colocaliza con RFP. En el ensayo realizado con *AtGRDP1* se observó fluorescencia en células estomáticas, específicamente fluorescencia verde en cámara subestomática. Este resultado puede sugerir que la fluorescencia en la cámara subestomática se debe a la emisión verde fluorescente del ostiolo.

En cuanto a la colocalización encontrada en las células oclusivas, se puede sugerir que se debe tanto a la fluorescencia verde de cloroplastos, como a la fluorescencia roja del almidón contenido dentro del cloroplasto (Fig. 1). La localización nuclear de *AtGRDP1* y *AtGRDP1 splicing* podría fortalecer la hipótesis sobre su posible papel como chaperona de RNA sugerida en el trabajo de Rodríguez-Hernández *et al* (2014), acerca del motivo putativo de unión a RNA encontrado en *AtGRDP1,* el cual resultó equivalente a otras proteínas con actividad RNA chaperona.

3.2. Localización celular de la proteína AtGRDP1 y *AtGRDP1 splicing en líneas transformantes estables de Arabidopsis thaliana*

El dato obtenido en líneas transitorias representa una información valiosa pero es necesario complementarla con las líneas que expresen establemente ambas construcciones. Con el fin de corroborar los datos obtenidos en transformación transitoria de tabaco acerca de la localización de *AtGRDP1* y *AtGRDP1 splicing*, evaluamos líneas transformantes estables en *A. thaliana.* Para evidenciar la localización de las proteínas *AtGRDP1* y *AtGRDP1 splicing*, se utilizó el vector pMDC43 para realizar la fusión traduccional con GFP En la figura 3 se muestra un ensayo realizado con una línea col-0.

En el área adyacente a la cofia, las proteínas *AtGRDP1* y *AtGRDP1 splicing* se observaron principalmente en núcleo (Fig. 2). En raíz principal e hipocotilo la emisión de fluorescencia se observa en núcleo, pared celular y en algunas uniones intercelulares (Fig. 2). En los cotiledones, las dos proteínas se observan únicamente en pared celular, incluyendo pared de estomas (Fig. 2). La localización de las proteínas en las dos líneas transformadas estable confirma la presencia del gen en núcleo, pero también sugiere una movilidad de la proteína del núcleo al citoplasma.

3.3. Efecto en Localización celular de AtGRDP1 y AtGRDP1 splicing al exponer las plantas a estrés abiótico.

Para analizar el comportamiento de la proteína *AtGRDP1 y AtGRDP1splicing*, específicamente su localización bajo condiciones de estrés abiótico, las líneas transoformantes de *A. thaliana* se expusieron a tratamientos con NaCl 175 Mm, el cual genera estrés salino y tratamientos con sorbitol al 6%, el cual causa estrés osmótico en la planta (Fig. 3 y 4).

Un aumento en la fluorescencia que emite *AtGRDP1* es evidente en tejidos meristemáticos en comparación con los otros tejidos analizados (Fig. 3).

En raíces, los tratamientos de NaCl y Sorbitol, incrementaron la emisión de fluorescencia de *AtGRDP1* y *AtGRDP1 splicing* en comparación con el tratamiento control (Fig. 3). En Se observó el mismo

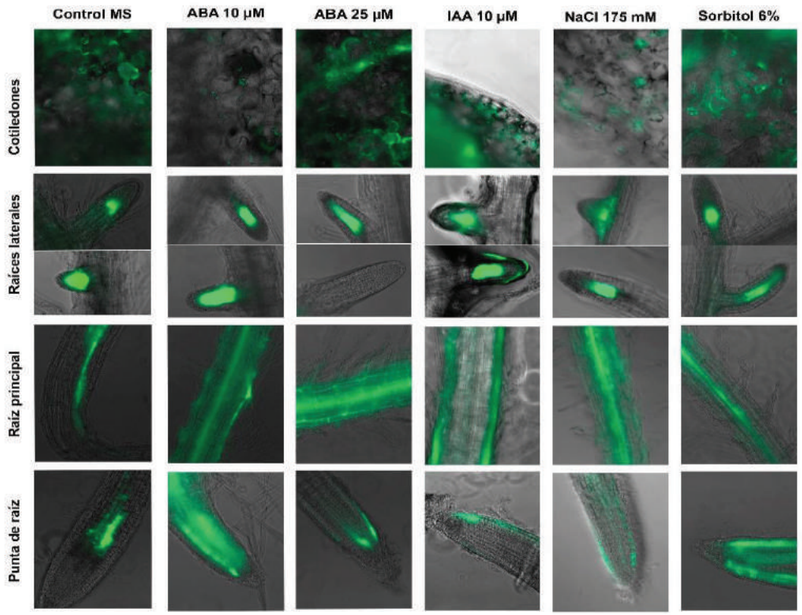


Figura 4. Localización celular de AtGRDP1splicing tras la exposición a estrés abiótico y tratamiento de fitohormonas en plantas transformadas estables de A. thaliana. Plántulas de 15 días fueron colocadas en medio MS líquido suplementado con diferentes tratamientos: ABA 10 y 25 µM, IAA 10 µM, NaCl 175 mM y sorbitol 6%. Las imágenes son individuos representativos de dos plántulas tratadas en dos repeticiones. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio de fluorescencia.

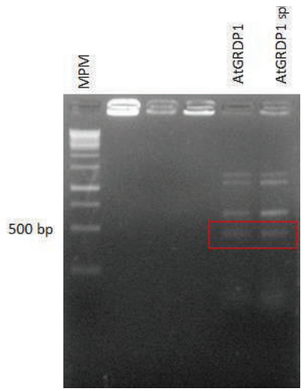


Figura 5. Gel de agarosa al 0.8% con los productos de PCR de *AtGRDP1* y *AtGRDP1splicing* visualizadas bajo emisión UV. En el primer carril se observa el marcador de peso molecular de 1kb, en el quinto carril se muestra el gen *AtGRDP1* y en el último carril se muestra el gen *AtGRDP1splicing.*

comportamiento en la proteína *AtGRDP1 splicing* (Fig. 4). Con estos resultados se demuestra que *AtGRDP1* y *AtGRDP1 splicing* son inducidos por estrés abiótico.

El efecto de NaCl y sorbitol aumentó la emisión de fluorescencia de *AtGRDP1 splicing* en raíces secundarias desarrolladas, principalmente en zona meristemática. Por el contrario, *AtGRDP1* en raíces secundarias, presenta el mismo comportamiento que el tratamiento control.

Lo que nos sugiere que no hay un cambio en la localización celular por la inducción de estrés abiótico en las líneas con la versión completa del gen *AtGRDP1.*

En cotiledones y brotes de ápices la emisión de fluorescencia de *AtGRDP1* y *AtGRDP1 splicing* se observa semejante con los dos tratamientos que indujeron estrés abiótico.

3.4. Efecto en Localización celular de AtGRDP1 y AtGRDP1 splicing bajo tratamiento con fitohormonas.

Se analizó el efecto de IAA y ABA en la localización de *AtGRDP1 y AtGRDP1 splicing*. Con el tratamiento de ABA 10µM, AtGRDP*1* y *AtGRDP1 splicing* presentan mayor fluorescencia en raíz en comparación con el control. En contraste con el tratamiento de ABA 25µM exógena, la cual disminuyó la presencia de *AtGRDP1 y AtGRDP1 splicing* en raíces laterales. Observamos un comportamiento similar en las raíces laterales mas desarrolladas tratadas con IAA. Este comportamiento sugiere que ABA interrumpe la producción de *AtGRDP1 y AtGRDP1 splicing,* además de que las dos proteínas son altamente sensibles a ABA (Fig. 3 y 4).

En resumen, la proteína *AtGRDP1* se localizó principalmente en en raíz cuando se indujo a estrés salino. Bajo condiciones normales, la localización principal de *AtGRDP1* se encuentra en la zona mersitemática de raíces laterales. Adicionalmente, la proteína *AtGRDP1splicing* se localizó prncipalmente en raíces laterales con tratamientos de ABA 10µM, y bajo condiciones normales, la mayor fluorescencia se observó en raíces laterales jóvenes.

Un dato que podría aportar sobre la regulación específica que lleva a cabo el promotor del gen *AtGRDP1* sería el análisis de las líneas reporteras del promotor de este gen.

3.5. Reacción en cadena de la polimerasa del gen AtGRDP1 y AtGRDP1splicing

Para verificar la presencia de los genes *AtGRDP1 y AtGRDP1splicing* en las cepas de *Agrobacterium tumefaciens (*GV3101 p35S) utilizadas en la transformación transitoria de *N. benthamiana,* se llevó a cabo un análisis de PCR, empleando los primers correspondientes a *AtGRDP1 y AtGRDP1splicing.* Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, donde se observó una banda cercana a la zona de 500 bp bajo la emisión de luz UV. Este resultado confirmó la presencia de los genes, siendo que éstos tienen un tamaño de 428 bp (Fig. 5).

CONCLUSIÓN

Mediante transformación transitoria encontramos que hubo una mayor señal en núcleo para *AtGRDP1splicing* y para *AtGRDP1* y *AtGRDP2* se observó acumulación tanto en núcleo como en citoplasma.

En cuanto a la acumulación de las proteínas en líneas transformantes estables de *A. thaliana,* se observó que, en la zona adyacente a la cofia, las proteínas *AtGRDP1* y *AtGRDP1 splicing* se observaron principalmente en núcleo, y en las zonas cercanas a los cotiledones, la acumulación se observó en citoplasma. Estos resultados sugieren un traslado de la proteína desde el núcleo hasta el citoplasma.

Finalmente, en un trabajo previo se reportó que esta proteína está involucrada en la respuesta al estrés abiótico. Por otro lado, en un análisis de la proteína se encontró que contenía dominios como el DUF1399 de función desconocida, un motivo putativo de unión a RNA y el dominio rico en glicinas en el caso de la versión completa. Encontrar la localización celular de estas proteínas podrá sugerirnos su posible papel en la célula.

BIBLIOGRAFÍA

- Flores-Fusaro, A. y Sachetto-Martins, G. (2007). "Blooming Time for plant Glycine-Rich Proteins" en *Plant Signaling & Behavior*, Vol. II, [pp. 270-271].
- Mangeon, A., Magrani-Junqueira, R. y Sachetto-Martinis, G. (2010). "Functional diversity of the plant glycine-rich proteins superfamily" en *Plant Signaling & Behavior,* Vol. V, [pp. 99-104].
- Mee, M-H. y Schedl, T. (2006). "RNA-binding proteins" en *WormBook.* Consultda en http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK19709/ (fecha de consulta 22-06-2016).
- Mousavi, A. y Hotta, Y. (2004). "Glycine-Rich Proteins" en Applied Biochemistry and *Biotechnology*, Vol. CXX, [pp. 169-174].
- Ortega-Amaro, M. A., Rodríguez-Kessler, M., Rodríguez-Hernández, A. A., Becerra-Flora, A., Rosales-Mendoza, S. y Jiménez-Bremont, J. F. (2016). "Overexpression of *AtGRDP2* gene in common bean hairy roots generates vigorous plants with enhanced salt tolerance" en *Acta Physiol Plant,* Vol. V, [pp. 38-66].
- Rodríguez-Hernández, A. A., Ortega-Amaro, M. A., Delgado-Sánchez, P., Salinas, J. y Jiménez-Bremont, J. F. (2014). "*AtGRDP1* Gene Encoding a Glycine-Rich Domain Protein Is Involved in Germination and Responds to ABA Signalling" en *Plant Molecular Biology Reporter,* Num. 2, Vol. XXXII, [pp. 303-616].

USO DE LA TEORÍA DEL FUNCIONAL DE LA DENSIDAD PARA DETERMINAR LOS ISÓMEROS DE MÍNIMA ENERGÍA EN FULLERENOS FUNCIONALIZADOS CON GRUPOS SCH_3

Sarai Contreras Andrade[1] y Rigoberto Chavira Quintero[2]

RESUMEN

Los fullerenos son altamente inestables en aplicaciones prácticas por lo que hay que proteger y solubilizar estos compuestos de carbono mediante la funcionalización de su superficie con diversas moléculas. El fullereno C_{60} funcionalizado con adsorbatos SCH_3 se optimizó con el fin de encontrar la estructura de mínima energía. Para encontrar la energía de las moléculas optimizadas se empleó un enfoque DFT usando la aproximación del pseudopotencial para la interacción de electrones en una base de ondas planas. Las estructuras más estables del C_{60} para tres adsorbatos es cuando están opuestos sobre una cadena de carbonos hexagonal y para dos adsorbatos la más estable es cuando están adyacentes. Las diferencias de energía entre las estructuras optimizadas varían con el software empleado.

ABSTRACT

Fullerenes are highly unstable in practical applications so must be protected and carbon solubilize these compounds by functionalization of its surface with various molecules. Fullerene C60 functionalized adsorbates SCH3 optimized in order to find the minimum energy structure. To find the energy of a DFT approach molecules optimized using the pseudopotential approach for interaction of electrons in a base plane wave it was used. The stablest structures for three adsorbates is C60 when opposite on a hexagonal carbon chain and two adsorbates is the most stable when they are adjacent. The energy differences between the optimized structures vary with the software used.

Palabras clave: Fullerenos, adsorbatos, ondas planas.

INTRODUCCIÓN

Los materiales nanoestructurados a base de carbono se encuentran en una posición privilegiada dentro del alcance de los científicos e ingenieros en todo el mundo como consecuencia de sus propiedades inusuales y aplicaciones actuales y futuras casi ilimitadas en prácticamente todas las áreas de la ciencia y la tecnología.

Uno de estos sorprendentes materiales son los llamados fullerenos, que consiste en una jaula más o menos esférica de 60 átomos de carbono dispuestos en hexágonos y pentágonos entrelazados (C_{60}). Desde su descubrimiento en 1985, el C_{60} ha capturado una gran atención como consecuencia de su composición química única y sus propiedades físicas. Los fullerenos no son muy reactivos debido a la estabilidad de los enlaces tipo grafito, y son también muy poco solubles en la mayoría de disolventes. Entre los disolventes comunes para los fullerenos se incluyen el tolueno y el disulfuro de carbono. El fullereno es la única forma alotrópica del carbono que puede ser disuelta. Una de las características a destacar es que el fullereno puede resultar peligroso para diversos organismos, por lo que actualmente se utiliza, aunque con extremo cuidado. Los fullerenos son, en general, altamente inestables en aplicaciones prácticas debido a su insolubilidad y extrema sensibilidad al aire. Sin embargo, nuevos procedimientos han sido desarrollados para solubilizar y proteger estos compuestos de carbono mediante la realización de la funcionalización de su superficie con una variedad de moléculas además de que se ha comprobado que su reactividad aumenta

[1] Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Dr. Salvador Nava No. 6, 78260 San Luis Potosí, San Luis Potosí, sarai.contreras28@outlook.es.
[2] Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Dr. Salvador Nava S/N, 78260 San Luis Potosí, San Luis Potosí, rigo@fisica.uaslp.mx.

uniendo grupos activos a las superficies de los fullerenos, abriendo nuevas oportunidades para potenciales aplicaciones en la ciencia biomédica y los nanomateriales. Uno de los adsorbatos son grupos funcionales que contienen azufre, tales como tioles o disulfuro que se utilizan para unir selectivamente moléculas orgánicas multifuncionales grandes o nanopartículas metálicas a fullerenos C_{60} y nanotubos de carbono. La unión tiol para el material de carbono se hace a través de especies de nitrógeno, de átomos metálicos, o estructuras en forma de anillo, mientras que el átomo de S está siempre apuntando hacia el exterior, que se utilizan normalmente para procedimientos posteriores de funcionalización.

Se pretende hacer varias configuraciones de adsorbatos que contienen azufre funcionalizados con el fullereno C_{60} con el fin de conocer los isómeros relevantes para en un futuro estudiar los efectos térmicos y determinar si con un aumento de la Temperatura son igual de estables o si podría existir algún cambio. Además del fullereno C_{60} existen una gran variedad de fullerenos en los que cabe destacar el C_{20} que es el fullereno más pequeño y el C_{960} que es el más grande. Además del C_{60} hablaremos del C_{82} que tiene varios isómeros pero que nos enfocaremos en el C_{82}-cs pues han sido reportados resultados afines a los aquí buscados.

METODOLOGÍA

Las propiedades estructurales y electrónicas neutrales de nuestra molécula se obtendrán dentro del enfoque DFT usando la aproximación del pseudopotencial para la interacción de electrones y de iones en una base de ondas planas, fijando para las funciones de onda con el uso del código PWscf que resuelven las ecuaciones de Kohn y Sham. Para todas nuestras estructuras consideradas, la energía de corte para la expansión de ondas planas se toma como 408.17 eV y la energía de corte de la densidad es de 2993.25 eV, cabe mencionar que el valor de la energía de corte de la densidad oscila en un intervalo de 6 a 8 veces el valor de la energía de corte.

Se empleó para los cálculos una supercelda cúbica con una dimensión lateral tan grande como 35 Å y sólo el punto Γ para la integración en la primera Zona de Brillouin (ZB). En todos los casos, se utiliza el pseudopotencial Perdew-Burke-Ernzerhof (PBE) porque ha arrojado buenos resultados y las optimizaciones estructurales se realizaron sin restricciones para todos los isómeros considerados. El criterio para la convergencia en la energía se estableció como 10^{-6} y la optimización estructural se realizó hasta que un valor inferior a 1 meV/Å fue alcanzado por las fuerzas restantes para cada átomo. Se utilizaron los visualizadores Avogadro y Jmol para obtener las figuras de las moléculas optimizadas. Cabe mencionar que es un método de primeros principios por lo que los resultados son a T=0, donde T es la temperatura.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la determinación de los isómeros más estables en fullerenos funcionalizados con grupos SCH_3 se comparó la energía en eV además se observó la longitud de los diferentes enlaces y el valor del gap HOMO-LUMO. Para poder corroborar que las estructuras optimizadas del C_{60} con los SCH_3 adsorbidos fueran las correctas se compararon los ángulos entre los distintos átomos así como la longitud de los enlaces, la referencia eran los datos que arrojaba cada una de las moléculas por separado. La distancia entre el enlace C-S oscila entre 1.87-1.88 Å mientras que la longitud del enlace S-C es del orden de 1.81-1.82 Å, además el ángulo formado entre los átomos enlazados C-S-C se encuentra en el rango de 100-105°.

El primer caso que se analizó es cuando dos grupos SCH_3 están funcionalizados a la superficie del fullereno C_{60} encontrando que existe sólo un isómero relevante respecto al isómero de menor energía. El criterio empleado para saber si un isómero es relevante o no es que la diferencia de energía del isómero del que se desea saber su importancia sea menor o igual a 0.1301 eV respecto al isómero de menor energía. El isómero más relevante resultó cuando los grupos SCH_3 se encuentran adyacentes sobre el mismo enlace C-C adsorbidos a la superficie del C_{60} como se observa en la Figura 1a), seguido por el fullereno C_{60} funcionalizado con dos adsorbatos cuando están opuestos sobre una cadena de carbonos hexagonal (Figura 1b)) con una diferencia de energía de 0.0267 eV con respecto al isómero más estable. En ambas figuras se puede observar que el azufre presente en los adsorbatos cede carga hacia los carbonos con los que está enlazado generando la deformación del C_{60}, es decir, un aumento en la distancia C-C sobre el carbono que esta adsorbido el tiol. La energía de adsorción para dos adsorbatos funcionalizados a la superficie del C_{60} es del orden de 2.4-2.5 eV. El gap HOMO-LUMO del isómero más estable es del orden de 1.4 eV.

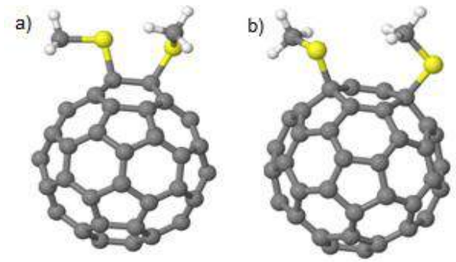


Figura 1. Configuraciones de mínima de energía del fullereno C_{60} funcionalizado con dos adsorbatos SCH_3: a) adyacentes, b) opuestos sobre una cadena de carbonos hexagonal

Una vez encontrados los isómeros relevantes con dos adsorbatos se procedió a optimizar el fullereno C_{60} con tres grupos funcionales probando varias configuraciones, encontrando que la estructura más estable es cuando los grupos SCH_3 se encuentran cada uno opuestos sobre una cadena de carbonos hexagonal como se observa en la Figura 2a). Las Figuras 2b) y 2c) nos muestran los isómeros relevantes respecto a la Figura 2a) que es la estructura optimizada de menor energía, las diferencias de energía de la Figura 2 son 0 eV, 0.0994 eV y 0.1180 eV respecto al orden observado en dicha figura. Cabe mencionar que no se estudiaron todas las configuraciones posibles debido a la gran variedad de éstas si no que se observó la tendencia y en base a ello se estudiaron ciertas configuraciones. Una de las tendencias que se empleó para conocer la importancia de los isómeros para dos y tres adsorbatos funcionalizados al C_{60}, es la trayectoria que se observa con una línea en zigzag de color rojo en la Figura 2b) y 2c).

Respecto a la configuración mínima de energía de dos grupos funcionalizados a la superficie del fullereno C_{60} se encontró que sólo un isómero es relevante además de que se encontró una relación con la separación de los SCH_3, en el caso de dos grupos funcionales adsorbidos al fullereno resultó que un isómero relevante es cuando los SCH3 están opuestos sobre una cadena de carbonos hexagonal mientras que la estructura más estable cuando tenemos tres grupos adsorbidos es cuando cada uno de ellos se encuentra opuesto en una cadena hexagonal de carbonos, con esta información se podría explorar que cuando el número de grupos funcionales es impar la estructura más estable sería cuando cada una de las moléculas SCH_3 están opuestas en una cadena de carbonos hexagonal basándonos en los resultados arrojados por tres adsorbatos. Para el caso de dos adsorbatos se probaron algunas configuraciones posibles para encontrar isómeros relevantes, encontrando que al seguir un camino en forma de zigzag ningún isómero es relevante, sin embargo, cuando las moléculas adsorbidas están separadas por dos o cuatro carbonos su energía tiende a ser más cercana a la del isómero más relevante.

Ésta tendencia se probó con tres adsorbatos funcionalizados a la superficie del C_{60} resultando que cuando dos adsorbatos están adyacentes sobre el mismo enlace C-C y uno ésta separado por dos y cuatros carbonos el isómero si resulta relevante. Las similitudes encontradas para dos y tres grupos funcionalizados al C_{60} podrían ponerse en práctica para cualquier número de adsorbatos. Además de las estructuras optimizadas se graficó la densidad de estados de cada uno de los isómeros relevantes observando que los niveles de energía son prácticamente idénticos. De igual manera se aprecia la transferencia de carga por parte del Azufre hacia los carbonos con los que está enlazado observando el incremento del enlace C-C sobre el

carbono que esta adsorbido al SCH_3 sobre la superficie del fullereno C_{60}. El orden de la energía de adsorción para tres adsorbatos oscila entre 3.4 y 3.6 eV, ésta energía nos dice que tan fuerte es la adsorción del grupo funcional hacia el fullereno. Cuando la energía de adsorción está muy por debajo de 0.8673 eV hablamos de fisisorción y en este caso si se incrementa la temperatura y desciende la presión puede ocurrir el fenómeno de desorción, por lo tanto los tres adsorbatos SCH_3 están fuertemente adsorbidas al fullereno.

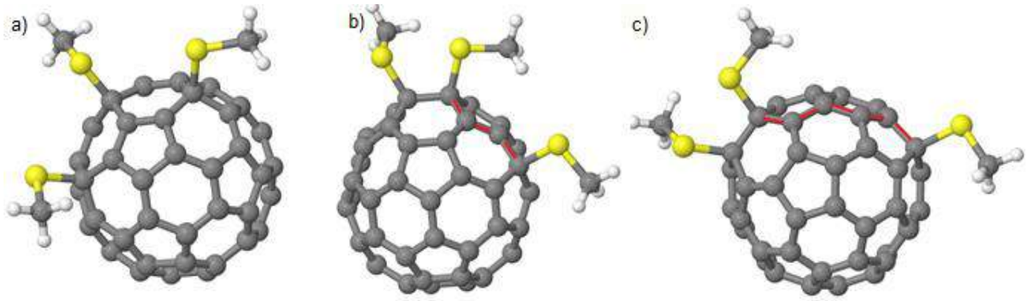


Figura 2. Configuraciones de mínima energía del fullereno C_{60} funcionalizado con tres adsorbatos SCH_3: a) opuestos sobre una cadena de carbonos hexagonal, b) dos adsorbatos adyacentes y un adsorbato separados por dos carbonos sobre una cadena en zigzag, c) dos adsorbatos adyacentes y un adsorbato separados por cuatro carbonos sobre una cadena en zigzag

Algo interesante que hay que destacar es que el gap HOMO-LUMO tiende a ser mayor para el isómero más estable sin embargo esto no se cumplió para tres adsorbatos, el mayor gap se presentó para un isómero no relevante.

Dado que el objetivo es encontrar isómeros relevantes para el estudio posterior de los efectos térmicos, en la revisión bibliográfica se encontró que en el artículo "Unprecedented Chemical Reactivity of a Paramagnetic Endohedral Metallofullerene La@Cs-C82 that Leads Hydrogen Addition in the 1,3Dipolar Cycloaddition Reaction" (TAKANO YUTA, 2014) donde las estructuras ya habían sido relajadas por otro software y que además cumplía con las características que estamos buscando, es decir, las diferencias de energía entre los isómeros relevantes era menor a 0.1301 eV respecto a la estructura más estable. Se optimizó la estructura La@C82CMe_2NMeCHPh donde Me representa un metilo y Ph un benceno.

Basados en el artículo anteriormente mencionado se optimizaron cuatro estructuras con dicha molécula pero con diferente colocación obteniendo que la estructura más estable es la Figura 3a) y se encontró que el único isómero relevante es la Figura 3b) con una diferencia de energía de 0.0218 eV con respecto al isómero más estable, los resultados fueron comparados con el artículo anteriormente mencionado observando diferencias sustanciales en los datos debido a que en el estudio usaron un software que usa un esquema de cálculo *all electron* y el software en el que nos apoyamos utiliza un esquema de cálculo de pseudopotenciales y esto claramente causó una diferencia significativa.

Esto nos pone a pensar que los isómeros que consideramos no relevantes con el software que empleamos pudieran ser relevantes si se estudian con el software en el que está basado el artículo mencionado con anterioridad debido a que es más preciso aunque también requiere mayor tiempo de cómputo y su uso es bajo licencia, mientras que el usado en nuestro estudio es de distribución libre.

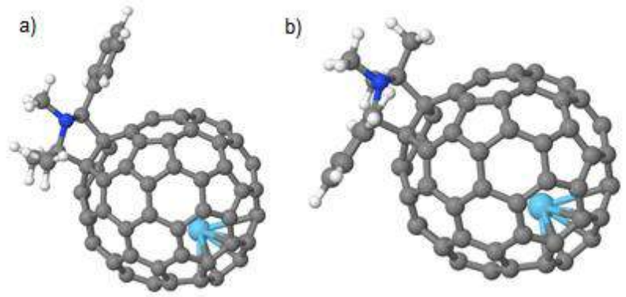


Figura 3. Configuraciones de mínima energía de la molécula La@C82CMe2NMeCHPh: a) B1, b) C1

.CONCLUSIONES

Para el caso de dos adsorbatos se encontró sólo un isómero relevante respecto al isómero de menor energía resultando que la configuración más estable es cuando dos moléculas de SCH_3 adsorbidas a la superficie del fullereno C_{60} están adyacentes sobre la misma cadena de carbonos. Se encontraron tendencias en la colocación de las moléculas adheridas al fullereno y se usaron para tres adsorbatos determinando que las inclinaciones de dos adsorbatos difieren para tres moléculas adsorbidas, sin embargo ambas resultan importantes debido a que empleando estas preferencias se obtuvieron isómeros relevantes esto se comprobó al observar que el isómero más estable para tres adsorbatos fue cuando cada una de las moléculas se encuentran separadas sobre una cadena de carbonos hexagonal.

Estas tendencias podrían ser estudiadas para cualquier número de adsorbatos esperando que arrojen los mismos resultados que los que estudiamos. Respecto a las estructuras optimizadas del fullereno La@C82-cs funcionalizado con la molécula CMe2NMeCHPh al comparar los datos obtenidos con el artículo donde se obtuvieron las coordenadas ya optimizadas de las estructuras se encontró una gran diferencia debido al software que se usó, sin embargo eso nos pone a pensar como proyecto a futuro que los isómeros que encontramos irrelevantes para el C_{60} con el software en el que nos apoyamos con el software que emplearon en el artículo mencionado podrían ser relevantes debido a que la diferencia de energía entre cada isómero es menor además de investigar el efecto de la Temperatura en cada uno de los isómeros estudiados con anterioridad.

BIBLIOGRAFÍA

LEYVA FABELO A., PIÑERA HERNÁNDEZ I., LEYVA PERNÍA D., CRUZ INCLÁN C. M., ABREU ALFONSO Y., DÍAZ GARCÍA A., MARTÍNEZ TURTÓS R. (2012). Monte Carlo calculation of carbon atom displacement damage in C60 fullerene bulk materials irradiated with gamma rays. *Nucleus No. 51, 20-21*

CHAVIRA QUINTERO R., GUIRARDO LÓPEZ R. (2013). Thiol-based molecular overlayers adsorbed on C60: Role of the end-group and charge state on the stability of the complexes. *The journal of Chemical Physics No. 139, 174307-1- 174307-3*

TAKANO YUTA, SLANINA ZDENEK, MATEOS JAIME, YOSHI TSUCHIYA TAKA, KURIHARA HIROKI, UHLIK FILIP, HERRANZ MARÍA ÁNGELES, MARTÍN NAZARIO, NAGASE SHIGERU, Y AKASAKA TAKESHI (2014). Unprecedented Chemical Reactivity of a Paramagnetic Endohedral Metallofullerene La@Cs-C82 that Leads Hydrogen Addition in the 1,3Dipolar Cycloaddition Reaction. *Journal of the American Chemical Society No. 136, 17537-17546*

ANÁLISIS MULTIVARIADO DE LOS EFECTOS DE LA EROSIÓN EN LA INFAESTRUCTURA URBANA DE ZACATECAS

Melissa Contreras Delgado[1] y Felipe de Jesús Escalona Alcázar[2]

RESUMEN

En el estado de Zacatecas son pocos los criterios que se toman en cuenta para planear el desarrollo urbano. Las autoridades solo consideran como riesgo las actividades mineras (jales, oquedades y lixiviados) mientras que la erosión y sus efectos son considerados de poca importancia. En los últimos años se han publicado trabajos donde se definen la erosión y la geomorfología como agentes de riesgo. Por lo tanto la falta de aplicación de criterios de protección al medio ambiente, geomorfología y a los efectos de la erosión han provocado que los sitios hacia donde crecen las ciudades de Zacatecas y Guadalupe estén sujetos a perdida de soporte en las cimentaciones, fracturamiento y hundimientos.

ABSTRACT

In the state of Zacatecas few criteria are taken into account for planning urban development. The authorities only considered as risk the mining activities (tailings, hollows and leachates) while the erosion and its effects are considered of minor importance. In the past years studies have been published where erosion and geomorphology are defined as risk agents. Therefore the lack of application of this criteria for the protection of the environment, geomorphology and the effects of erosion have caused in the sites to where the cities of Zacatecas and Guadalupe grow the loss of support foundations, fracturing and subsidence.

Palabras Clave: Erosión, fracturas, riesgo y geomorfología.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años las ciudades de Guadalupe y Zacatecas han crecido exponencialmente ignorando algunos de los lineamientos establecidos en el Programa de Desarrollo Urbano 2004-2020 (SECOP, 2004) que sugiere evitar el crecimiento hacia áreas geológicamente y topográficamente inestables. El Plan Estatal de Desarrollo 2010-2016 considera que se debe respetar el medio ambiente en la planeación del crecimiento urbano y el código urbano para el estado solo está basado en el cambio de uso de suelo.

Sin embargo, en el estado de Zacatecas el medio ambiente, el cambio de uso de suelos y la geomorfología del terreno no son elementos que se toman en cuenta en el planeamiento del crecimiento urbano, desde hace mucho tiempo solo se consideran como peligros potenciales las actividades mineras. En años recientes se han publicado trabajos en los que se definieron que la erosión (Escalona-Alcázar *et al*., 2012) y la geomorfología (Escalona-Alcázar *et al*., 2003) son agentes de peligro (Escalona-Alcázar *et al*., 2012). Como estos efectos son muy lentos las autoridades no los consideran como un peligro potencial en la generación de zonas de riesgo.

El área de estudio de este trabajo es la zona norte de la ciudad de Zacatecas, el objetivo general es identificar las áreas susceptibles de riesgo por erosión y con esta información realizar un análisis multivariado para poder definir las causas de la erosión en la zona urbana y de esta manera poder realizar acciones de prevención y planeación del desarrollo urbano. El objetivo particular es realizar un registro sobre los efectos de la erosión presentes en las colonias (Figura 1): Díaz Ordaz primera, segunda y tercera

[1]Unidad Académica de Ciencias de la Tierra, Universidad Autónoma de Zacatecas; Calzada de la Universidad 108, Col. Progreso, C.P: 98058, Zacatecas, Zacatecas, Contreras.delgado@hotmail.com
[2]Unidad Académica de Ciencias de la Tierra, Universidad Autónoma de Zacatecas; Calzada de la Universidad 108, Col. Progreso, C.P: 98058, Zacatecas, Zacatecas, eaaf005321@uaz.edu.mx

sección, De Olivos, Pedro Ruiz Gonzales, García Salinas, Ramón López Velarde, Mexicapan, Las Margaritas, parte de la Filarmónica y el centro de la ciudad, así como en los barrios de la Pinta y Las Mercedes.

Figura 1. Colonias en las que se tomaron los datos.

MARCO GEOLÓGICO Y GEOMORFOLÓGICO

La zona urbana de Zacatecas está en las unidades litológicas conocidas como Formación Zacatecas, Complejo Las Pilas y Conglomerado Zacatecas. La Formación Zacatecas aflora en la parte occidental de la ciudad y está formada por secuencias turbidíticas del Triásico Tardío al Cretácico Temprano (Escalona-Alcázar *et al*., 2009 y 2014; Ortega-Flores *et al*., 2016). Lo cubre en forma concordante el Complejo Las Pilas que está formado por derrames de lava de composición basáltica a andesítica basáltica que tiene interestratificadas turbiditas e intrudido por lacolíticos dioríticos (Escalona-Alcázar *et al*., 2009). Lo cubre en discordancia erosional el Conglomerado Zacatecas que está formado por la alternancia de conglomerado y arenisca con tobas interestratificadas (Escalona-Alcázar *et al*., 2016). Cada una de las unidades litológicas tiene distinta consolidación y estructura, aunque todas están cortadas por fallas y fracturas. La ciudad de Zacatecas está ubicada en la parte central de la Sierra de Zacatecas; el paisaje es joven, esto es, con arroyos con pendientes pronunciadas y pequeños valles intermontanos. El drenaje es de tipo dendrítico y está mejor desarrollado en donde los sedimentos están de poco a moderadamente consolidados. En cambio, en el Complejo Las Pilas la estructura de la roca y el fracturamiento, favorecen la caída de bloques.

MÉTODOS Y MATERIALES

En este trabajo se identificaron algunos fenómenos de erosión en la traza urbana, obras civiles y de infraestructura en la zona norte de la ciudad de Zacatecas, estos son fracturamiento en casas, calles y bardas, fracturas semicirculares, hundimientos, derrumbes y pérdida de soporte de cimentaciones. El trabajo de campo consistió en recorrer las calles de las colonias: Díaz Ordaz primera, segunda y tercera sección, De Olivos, Pedro Ruiz Gonzales, García Salinas, Ramón López Velarde, Mexicapan, Las Margaritas, parte de la Filarmónica y el centro de la ciudad, así como en los barrios de la Pinta y Las Mercedes. Y llevar un

registro de estos efectos con la siguiente información; características generales del lugar donde se encuentran, ubicación geográfica (coordenadas UTM, Datum NAD27), dimensiones, espesor, profundidad, apertura, orientación, azimut del eje de extensión, azimuts del frente de erosión y de la longitud máxima de la erosión. El material para realizar el trabajo de campo fue el siguiente:

- GPSmap 60CSx marca Garmin
- Brújula Brunton
- Cinta métrica Truper 5m
- Protactor

RESULTADOS

Debido a la modificación del terreno, los procesos de erosión y el crecimiento urbano en áreas geológicamente no estables los efectos de erosión son: fracturamiento en calles, casas y bardas, hundimientos, derrumbes y pérdida de soporte en las cimentaciones (Figura 2).

Figura 2. Efectos de la erosión en la infraestructura urbana: a)Perdida de sorporte de una cimentación b)Fracturamiento en una calle c)Fracuramiento en una barda d)Hundimiento

Cada uno de los efectos de erosión identificados durante el trabajo de campo implica el intemperismo de la roca y erosión o pérdida del material de soporte que puede ser del tamaño de un limo o grava. Los materiales pueden ser de origen natural o artificial, cualquiera de los dos casos cuando estos son removidos generan inestabilidad en el sitio provocando derrumbes o deslizamientos.

Figura 3. a)Derrumbe de barda b)Oquedades en el terreno.

Los procesos geomorfológicos son lentos pero constantes debido a las condiciones de clima semiárido y el principal agente de erosión es el agua. La pérdida de la estabilidad de los sitios donde los sedimentos son removidos se refleja de distintas maneras, dependiendo si el material está consolidado (rocas) o no consolidado (sedimentos, rellenos artificiales o suelo).

Figura 4. a) Transporte de sedimentos debido a fuertes lluvias b) Perdida de material dejando al descubierto tuberías.

CONCLUSIONES

El proyecto “Análisis multivariado de los efectos de la erosión en la infraestructura urbana de Zacatecas” sigue en proceso, por lo tanto las actividades realizadas durante el VCRC solo servirán para la actualización de una base de datos sobre los efectos de erosión en la zona urbana. La base de datos está en arcGIS y se actualizara con más de 600 datos recolectados durante el trabajo de campo, cada uno de ellos corresponde a algún efecto de la erosión, desde pequeñas fracturas en fachadas hasta casas en peligro de derrumbe con aviso de protección civil, así como fracturas en calles, hundimientos y pérdida del material de soporte. Los efectos de erosión observados en las calles de Zacatecas son abundantes ya que en esta zona no se tomaron las medidas de construcción apropiadas, por ellos es importante conocer las zonas de riesgo potencial y llevarse a cabo acciones de prevención y planeación del desarrollo urbano.

BIBLIOGRAFIA

Escalona-Alcázar, F.J., Escobedo-Arellano, B., Castillo-Félix, B., García-Sandoval, P., Gurrola-Menchaca, L.L., Carrillo-Castillo, C., Núñez-Peña, E.P., Bluhm-Gutiérrez, A. y Esparza-Martínez, A. (2012). "A Geologic and Geomorphologic Analysis of the Zacatecas and Guadalupe Quadrangles in Order to Define Hazardous Zones Associated with the Erosion Processes" In, S. Curkovic (ed.), Sustainable Development - Authoritative and Leading Edge Content for Environmental Management. InTech, 411-434, DOI: 10.5772/45852.

Escalona-Alcázar, F.J., Delgado-Argote L.A. and Rivera-Salinas F.A. (2010). Assessment of land subsidence associated with intense erosion zones in the Zacatecas and Guadalupe quadrangles, Mexico. In, Land Subsidence, Associated Hazards and the Role of Natural Resources Development, Publ. 339. [pp. 210-212]

PRODUCCIÓN DE FITOHORMONAS A TRAVES DE FERMENTACIONES SUMERGIDAS

Jesús Alejandro Córdova Cortez[1] y Yesica Nataly Mora Cura[2]

RESUMEN

En el presente trabajo, tuvo como objetivo optimizar el proceso de fermentación sumergida para la producción de la fitohormona "Ácido indolacético" a nivel planta piloto con el fin de utilizarlo como materia prima para insumos agrícolas. Se evaluaron cinéticas con distintos valores para ver la interacción de estas con el fin de recabar datos para obtener la máxima producción de AIA. Otro de los objetivos específicos fue diseñar las dimensiones de un reactor para la fermentación semi-industrial de AIA a un volumen de 200 litros.

ABSTRACT

In this paper, it has had as aim optimize the process of submerged fermentations to produce "Indolacetic acid" to pilot plant level with the purpose to use it as raw material for agricultural inputs. The kinetics was evaluated with different values to see the interaction between these to get the maximum IAA production. Another specific objective was design the dimensions of a reactor for the semi-industrial fermentation IAA to a volume of 200 liters.

Palabras Clave: Fitohormonas, ácido indolacético, auxinas.

INTRODUCCIÓN

Las fitohormonas son moléculas orgánicas producidas por la misma planta, regulando sus propios procesos fisiológicos (Villalobos, 2006). Diversos estudios según reportan Frankenberger y Arshad, (1995) han comprobado que la eficacia de las fitohormonas que son de origen biológico producen aumentos en los rendimientos y la calidad de las cosechas. Las hormonas más importantes que controlan la formación de la raíz así como el crecimiento del tallo y callo son las auxinas y las citocininas. Aunque algunas veces se han usado las giberelinas con el fin de inducir el alargamiento de los tallos (Hartmann y Kester, 1987).

Una de la principales auxinas naturales es el ácido indol acético, que se encuentra presente en la mayoría de las plantas (Castillo *et al*., 2005). La mayoría de las moléculas que integran este grupo son derivados indólicos, aunque también se encuentran algunos compuestos fenoxiacéticos, benzoicos o picolínicos con actividad auxínica.

Según Okon y Vanderleyden, (1997) el ácido induce la deformación y aumento de pelos radiculares, logrando con esto una mayor captación de nutrientes y promoviendo en consecuencia el crecimiento y rendimiento de los cultivos.

La industria agroquímica proporciona un amplio repertorio de fitorreguladores que, en general, se obtienen por síntesis química por tanto existe, un interés creciente en desarrollar una agricultura

[1] Universidad Autónoma de Coahuila, Facultad de Ciencias Biológicas, Carr. Torreón – Matamoros km. 7.5,Ciudad Universitaria, Torreón Coahuila, México C.P: 27275, jesus.acc.10@hotmail.com
[2] Biorganix Mexicana S.A. de C.V. Departamento de Microbiología y Biología Molecular. C. Airea 240 Parque Industrial Ramos Arizpe, C.P:25903, Ramos Arizpe Coahuila, México
yesica.mora@biorganix.com.mx

sostenible que sustituya la utilización masiva de plaguicidas, fertilizantes y reguladores del crecimiento sintéticos (análogos a las fitohormonas) por productos naturales (Castillo *et al*., 2005).

La síntesis microbiológica de fitohormonas puede constituir una alternativa viable en el contexto de una Agricultura ecológica sostenible ya que la aplicación de caldos de fermentación que contengan estos productos reduce el impacto medioambiental y su obtención a escala industrial resulta económicamente más atractiva (Frankenberger y Arshad, 1995).

Los usos de las auxinas en el contorno agrícola son muy diversos y se aplican de forma rutinaria en biofábricas, en los cultivos in vitro de material vegetal y en las plantaciones. El empleo de microorganismos con potencial biofertilizante productores de AIA ha demostrado ser eficiente. El ácido indolacético es sintetizado por algunos microorganismos como *Azospirillum, Azotobacter, Pseudomonas, Rhyzobium*, etc. (Patten y Glick 1996).

Los procesos fermentativos son influenciados por factores ambientales, físicos y biológicos, tales como la concentración de sustrato y biomasa, pH, temperatura, oxígeno disuelto e inhibidor de crecimiento (Bastin y Dochain 1990).

MÉTODOS Y MATERIALES

Cinética de producción de AIA nivel planta piloto

Se evaluaron 2 cinéticas para la producción de ácido indolacético utilizando el medio 5J con distintos volúmenes de aireación así como el porcentaje de inoculo añadido, a una temperatura de 30 °C y 150 rpm. Se tomaron alícuotas por triplicado para su evaluación.

Las muestras se centrifugaron por 15 minutos a 14000 rpm para obtener el caldo libre de células. Al sobrenadante se le añadió reactivo de Salkowski (600 mL de H_2SO_4 18M, 4.5 gr de $FeCl_3$ anhidro y se completó hasta 1L con agua destilada) (Relación muestra-reactivo 1:1). La reacción se incubo a temperatura ambiente por 30 minutos y se leyó la absorbancia a 540 nm en espectrofotómetro (Genesys 20, Thermospectronic). Paralelamente se elaboró una curva patrón con AIA sintético (SIGMA) a concentraciones de 0 a 100 ppm (µg/mL).

Se evaluó el crecimiento bacteriano (biomasa) mediante el método de Neubauer.

Propuesta del diseño del reactor

Se calcularon las dimensiones de un reactor semi-industrial de 200 L. (altura, ancho, ancho de bafles, ancho y largo de impulsores, altura del piso del tanque al impulsor). También se calculó la velocidad de agitación y potencia necesaria por volumen suministrado de acuerdo a las características reológicas del fluido se sugirió el tipo de impulsor a utilizar.

RESULTADOS

Cinética de producción de AIA nivel planta piloto

Se realizó una primer cinética con un 10 % de inoculo de 24 horas de antigüedad, 0.5vvm, 150 rpm y 30°C de temperatura. Tomando alícuotas por triplicado por intervalos de 8 y 16 horas para su análisis.
La segunda cinética fue evaluada con un 15% de inoculo de 72 horas de antigüedad, 1vvm, 150rpm y 30°C de temperatura. Tomando alícuotas por triplicado por intervalos de 8 y 16 horas para su análisis.

Tabla 1. En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos de la primera cinética de fermentación

TIEMPO (h)	BIOMASA (cel/ml)	AIA (ppm)	pH
0	3,221,153,846	6.157	6.82
4	4,432,692,308	20.779	6.53
8	6,038,461,538	26.779	6.58
24	7,500,000,000	46.025	6.58
32	8,437,500,000	158.364	6.61
48	12,500,000,000	282.892	6.64
56	10,288,461,538	323.144	6.65
72	1,807,692,308	436.792	6.78
80	4,615,384,615	622.010	6.89
96	1,884,615,385	716.352	7.08

Tabla 2. En la siguiente tabla se muestra los resultados de la segunda cinética de fermentación

TIEMPO (h)	BIOMASA (cel/ml)	AIA (ppm)	pH
0	442,500,000	45.02	6.81
4	560,000,000	55.40	6.43
8	2,462,000,000	55.87	6.69
24	2,981,000,000	61.57	6.68
32	4,096,000,000	118.49	6.64
48	3,808,000,000	139.49	6.25
56	3,038,000,000	141.38	6.43
72	2,846,000,000	258.49	6.28
80	2,808,000,000	292.83	6.57
96	1,327,000,000	479.24	7.19

En las gráficas siguientes se muestra detalladamente la interacción que se obtuvo de las variables como fue la producción de ácido, la biomasa y el pH a los distintos intervalos de tiempo de las cinéticas de

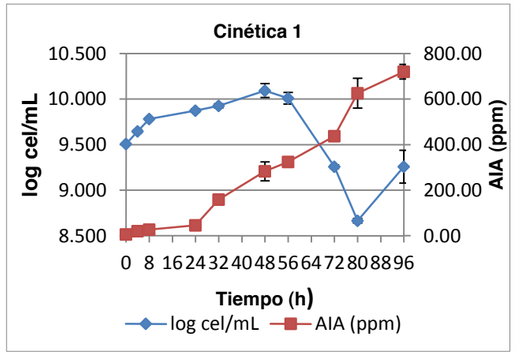


Figura 1. En esta grafica se muestra la interacción de la biomasa con la producción de AIA en la primera cinética de fermentación.

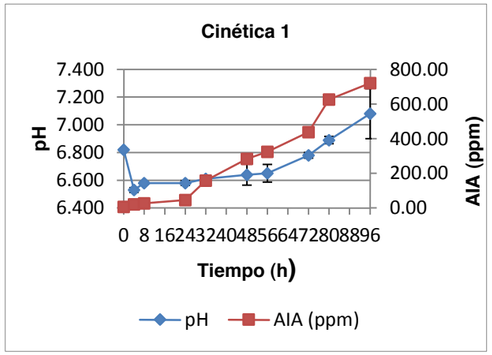


Figura 2. En la siguiente figura se muestra la interacción de pH con la producción de AIA de la primera cinética de fermentación.

fermentación.

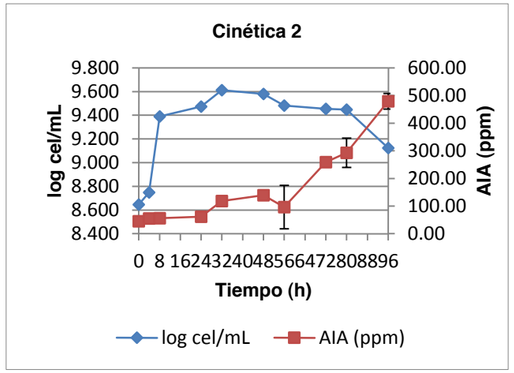


Figura 3. En esta grafica se muestra la interacción de la biomasa con la producción de AIA en la segunda cinética de fermentación.

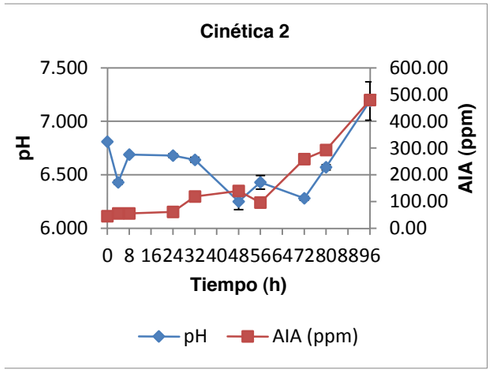


Figura 4. En la siguiente figura se muestra la interacción de pH con la producción de AIA de la segunda cinética de fermentación.

Después de las 96 horas se llevó a cabo la toma de muestra por triplicado para la cuantificación de AIA cada 24 horas con el fin de saber cuáles fueron sus máximas producciones.

Tabla 3. En esta tabla se muestra los resultados de AIA producidos después de las 96 horas

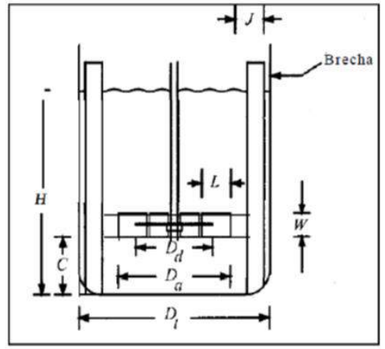
TIEMPO (h)	Primer cinética	Segunda cinética
	AIA (ppm)	AIA (ppm)
144	1125.15	606.12
168	1239.83	1012.65
192	1483.01	1248.23
216	1612.99	1407.25
240	2095.17	1684.27

Propuesta del diseño del reactor

Para el diseño del tanque se tomó una capacidad de 250 L. debido a que los reactores solo se llenan con una capacidad del 80%. Y el volumen requerido es de 200 L.

La altura del tanque será 3 veces mayor que su diámetro.

Figura A. En la figura siguiente se muestra las proporciones básicas de un tanque.



Dt: Diámetro del tanque
H: Altura del tanque
Da: Diámetro del impulsor
C: Altura del impulsor al piso del tanque
W: Altura de impulsor
Dd: Largo del rotor
L: Largo de impulsor
J: Ancho de bafles.

Tabla 3. En la siguiente tabla se observan los resultados de las dimensiones del tanque agitado para una capacidad de 250 L.

Referencia	Medida	
	Centímetros (cm)	Metros (M)
Dt	50	0.5
H	150	1.5
Da	25	0.25
C	16.6	0.166
W	5	0.05
Dd	16.6	0.166
L	6.25	0.0625
J	4.16	0.0416

DISCUSION

De acuerdo a la tabla de resultados de la cinética se muestra la cantidad de ácido indolacético que se iba formando a los distintos intervalos de tiempo que se fueron tomando las muestras.

En la primer cinética que se realizó se puede observar que al tiempo cero cuando se agregó el inoculo llevaba una producción de ácido de 6.157 ppm, por otro lado la segunda cinética al tiempo cero llevaba una producción de 45.02 ppm de ácido.

El motivo por el cual se observa una gran diferencia significativa de producción de ácido indolacético es que el inoculo de la segunda cinética duro un tiempo de 72 horas en el shaker con una velocidad de agitación de 150 rpm y el inoculo de la primer cinética solo duro 24 horas con las mismas condiciones.
En cuanto al impulsor que se recomendó usar para la fermentación de 200 L. se decidió recomendar uno del tipo turbina con hojas planas inclinadas, ya que con este se imparte cierto flujo axial, de modo que hay una combinación de flujos radial y axial. Que va a ser útil para que los sólidos en suspensión, que debido a las corrientes fluyan hacia abajo y luego levantan los sólidos depositados en el fondo. Otro punto importante es este impulsor lleva valores de viscosidades entre 1 y 10000 (Geankopolis, 1998) por lo que cae en el rango del ácido indolacético.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados de la cinética la bacteria no necesita mucha aireación debido a que se llegó a un mejor rendimiento con 0.5 vvm de aireación que con 1. Se observó que conforme transcurre el tiempo en la cinética con 0.5 vvm aumento más la producción del ácido, de lo contrario en la fermentación de 1 vvm, se observa un aumento pero no es muy significativo. Por lo que se tiene una producción del 35% menos de ácido respecto a la otra cinética, el resultado después de 10 días (240 h.) de fermentación arroja un rendimiento de 2095 ppm y 1684 ppm respectivamente. El impulsor del tanque con capacidad de 250 L. para la fermentación será del tipo turbina con 6 hojas planas inclinadas a 45°.

BIBLIOGRAFIA

BASTIN G. Y D. DOCHIAN (1990). "*On-line Estimation and Adaptive Control of Bioreactors,* en Elsevier Amsterdam.

FRANKENBERG JRWT, ARSHAD M. (1995). "Phytohormones in soils" en *Microbial Production and Function*. Marcel Dekker, Inc. New York, [pp. 4-40].

GEANKOPLIS C.J. (1998) *"Procesos de transporte y operaciones unitarias"* University of Minnesota, Compañía editorial continental, S.A. de C.V. [pp 161-170].

GROLAMYS CASTILLO *et al.* (2005). "Cuantificación del conteo de ácido indolacetico (AIA) en un caldo de fermentación microbiana" en *Anales de Biología 27* [pp. 137-142].

HARTMANN H. T. Y KESTER D. E. (1997). "Propagación de plantas, principios y prácticas" Continental. [pp. 760].

HERRERA E. *et al.* (2009) *"Matemático del Cultivo en Lote y Continuo del Proceso Fermentativo del Tequila"* en Congreso de México de Control Automático, Zacatecas, México.

OKON Y VANDERLEYDEN (1997). "Root associated Azospirillum species can stimulate plants" *ASM New* 63 [pp. 366-370].

PATTEN CHL. AND GLICK (1996). "*Bacterial biosynthesis of Indole-3-acetic acid" (review),* en Canadian Journal of Microbiology 42. [pp 207-220].

VILLALOBOS R. E. (2006). "Germinación y crecimiento de la planta*"* en *Fisiología de la producción de los cultivos tropicales.* Núm.1, Vol. 4. [pp. 57].

SOBRE LAS MÉTRICAS DE CONTROLABILIDAD

David Cortés Servín[1] y Juan Gonzalo Barajas Contreras[2]

RESUMEN

El presente trabajo se basa en el artículo *Controllability Metrics, Limitations and Algorithms for Complex Networks*; publicado por *Fabio Pasqualetti, Sandro Zampieri* y *Francesco Bullo* en *Transactions on control of network systems*}, vol. 1, no. 1, marzo 2014. Las tres aportaciones principales de dicho artículo son:

1. La propuesta de una métrica para cuantificar la dificultad del problema de control de una red en función de la energía de control requerida.
2. Establecer una relación entre el número de nodos de control y la energía de control en función de la topología y dinámica de la red.
3. Desarrollar una estrategia de control de *lazo-abierto* con garantías de desempeño.

Como resultado de lo anterior, se obtiene que para redes *Schur*-estables y simétricas, la energía de control crece de manera exponencial con el número de nodos totales si el número de nodos de control es constante; ciertas redes pueden ser controladas con energía constante independientemente de su cardinalidad si el número de nodos de control es un porcentaje fijo del total de nodos; y, las redes *agrupadas* pueden ser más fáciles de controlar ya que, para un número suficientemente grande de nodos de control, la energía de control sólo depende de la *controlabilidad* de cada *cúmulo* de nodos y de su fuerza de conexión.

Se incluye además la implementación de algunos ejemplos utilizados para corroborar los algoritmos desarrollados.

Palabras Clave: Sistema autónomo, redes complejas, controlabilidad, control distribuido, particiones de redes.

INTRODUCCIÓN

A pesar de los grandes avances que ha tenido la teoría del control de sistemas dinámicos en los últimos años, en el ámbito de las redes complejas cuestiones como la relación entre la topología de una red y su grado de controlabilidad, y garantizar el desempeño de una ley de control o su complejidad computacional son aún problemas explorados en la literatura actual.

El problema de control de redes complejas reside en la selección de un conjunto de nodos controlados y el diseño de una estrategia de control que conduzca la red a un estado objetivo.

Para medir la controlabilidad de una red se consideró aquí como métrica el valor propio más pequeño en valor absoluto de la *matriz Gramiana de controlabilidad*.

Se caracteriza además la retribución que hay entre la energía de control y el número de nodos controlados. Se calcula también una cota superior para la métrica escogida y una cota inferior para el número de nodos de control cuando la energía de control es fija.

[1] Universidad de Gunajuato, Departamento de Matemáticas; Camino del Jalisco 37A, Valenciana, 36240 Guanajuato, Gto., servindc@cimat.mx
[2] IPICYT, División de Matemáticas Aplicadas; Camino a La Presa de San José 2055, Lomas 4 sección, 78216 San Luis, S.L.P., jgbarajas@ipicyt.edu.mx

Se obtiene entonces que para redes estables y simétricas con energía de control constante, se requiere que el número de nodos de control crezca de manera lineal con respecto al número total de nodos de la red.

Se propone luego una *estrategia de control desacoplado* para el control de redes estables, utilizando *particiones de redes* para la selección de los nodos de control y diseñando una ley de control distribuido de *lazo abierto*. Se muestra también que con suficientes nodos de control en la red, la energía de control depende únicamente de las propiedades de controlabilidad de sus partes.

Por último se revisan algunos ejemplos comparando la ley de control aquí desarrollada contra otros métodos de control de redes. Tras dicha revisión se concluye que la estrategia de control desacoplado presenta como ventajas sobre las demás el ser escalable y de implementación distribuida accesible.

Adicionalmente, se obtienen resultados sobre el problema de selección de nodos de control para maximizar la traza de la matriz Gramiana (dicho problema admite una solución de forma cerrada), se generalizan los resultados para el problema de observabilidad de redes complejas y se describe una estrategia heurística basada en {\it controlabilidad modal} para seleccionar nodos de control.

MARCO TEÓRICO

Consideremos una red representada por el grafo dirigido G := (V, E), donde V := {1, 2, . . . , n} y E ⊆ V × V son el conjunto de vértices y de aristas del grafo. Sea $a_{ij} \in R$ el peso asociado a la arista (i, j) ∈ E (con dirección de j a i) y definamos la matriz de adyacencia con pesos de G como A = [a_{ij}], donde $a_{ij} = 0$ si (i, j) no pertenece a E. Supondremos que la matriz A es diagonalizable, i.e., A admite una base de vectores propios. Asociamos también un valor real (estado) con cada nodo, consideramos el vector formado por los estados de los nodos (estado de la red) y definimos el mapeo $x : N_{\geq 0} \rightarrow R$ n que describe la evolución (dinámica de la red) del estado de la red en el tiempo.
Consideramos la dinámica de la red a tiempo discreto, lineal e invariante en el tiempo descrita por

$$x(t+1) = Ax(t). \tag{1}$$

Decimos que la red G es controlable cuando es posible conducir el estado de la red a alguna configuración arbitraria mediante controles externos. Definimos al conjunto de nodos de control como:

$$K := \{k_{1,} \dots k_m\} \subseteq V$$

y suponemos que dicho conjunto puede ser controlado de manera independiente; así definimos la matriz de entrada como

$$B_K := \left[e_{k_1} \cdots e_{k_m}\right] \tag{2}$$

donde e_i denota el i-ésimo elemento de la base canónica de dimensión n. Siendo K el conjunto de nodos controlados de la red, el sistema queda expresado como

$$x(t+1) = Ax(t) + B_K u_K(t) \tag{3}$$

donde $u_K : N_{\geq 0} \rightarrow R$ es la señal de control aplicada a la red a través de los nodos en K. Una red es controlable en T ∈ N pasos por el conjunto de nodos de control K si, y sólo si, para todo estado $x_f \in R^n$ existe una entrada u_K tal que x(T) = x_f y x(0) = 0. Una condición estructural que asegura la controlabilidad del sistema parte de la construcción de la matriz de controlabilidad $C_{K,T}$, con T ∈ $N_{\geq 1}$, definida como

$$C_{K,T} := [B_K \; AB_K \; \cdots \; A^{T-1}B_K].$$

Se cumple entonces que el sistema (3) es controlable en T pasos por los nodos en K si, y sólo si, la matriz de controlabilidad $C_{K,T}$ es de rango pleno en sus filas. El criterio anterior de controlabilidad es sólo cualitativo, y no nos dice qué tan difícil es el problema de control con base, por ejemplo, en la energía de control necesaria para alcanzar el estado deseado.

Aunque una red sea controlable, la energía necesaria para llegar a ciertos estados puede rebasar los límites prácticos. Con esta motivación definimos la matriz Gramiana de controlabilidad en T pasos como

$$W_{K,T} := \sum_{\tau=0}^{T-1} A^\tau B_K B_K^{\mathrm{T}} (A^{\mathrm{T}})^\tau = C_{K,T} C_{K,T}^{\mathrm{T}}.$$

Se satisface entonces que la matriz $W_{K,T}$ es positiva definida si y sólo si la red es controlable en T pasos por los nodos en K.
Supongamos que tenemos una red controlable en T pasos y sea x_f el estado final deseado, con $\|x_f\|_2 = 1$.
La energía del control de entrada u K se define como

$$E(u_K, T) := \|u_K\|_{2,T}^2 = \sum_{\tau=0}^{T-1} \|u_K(\tau)\|_2^2.$$

El único control de entrada que conduce la red de x(0) = 0 a x(T) = x_f con energía mínima es

$$u_K^*(t) := B_K^T (A^{\mathrm{T}})^{T-t-1} W_{K,T}^{-1} x_f, t \in \{0, \dots T-1\}. \tag{4}$$

Por tanto

$$E\left(u_K^*, T\right) = \sum_{\tau=0}^{T-1} \left\|u_K^*(\tau)\right\|_2^2 = x_f^{\mathrm{T}} W_{K,T}^{-1} x_f \leq \lambda_{\min}^{-1}\left(W_{K,T}\right); \tag{5}$$

con igualdad en la última expresión siempre que x_f sea un vector propio de $W_{K,T}$ asociado a λ_{min} ($W_{K,T}$) [Lema 1]. Ya que la energía de control es limitada en las aplicaciones, las redes controlables con valores propios pequeños en su matriz Gramiana de controlabilidad no pueden ser conducidos a ciertos estados.

Ejemplo 1 (Red controlable con estados prácticamente incontrolables): Consideremos la red G con n nodos, matriz de adyacencia con pesos A = [a_{ij}] definida como

$$a_{ij} = \begin{cases} \frac{1}{2} \; sij = i-1, i \in \{2, \dots, n\}; \\ 0 \; enotrocaso \end{cases}$$

y nodos de control K = {1}. Veamos, usando inducción, que la j-ésima columna de $C_{K,T}$ cumple:

$$C[:, j] = \frac{1}{2^{j-1}} e_j, \forall j = 1, \dots, n.$$

Caso base: $C[:,1] = B = \frac{1}{2^0} e_1.$

Hipótesis de inducción: $C[:, i] = \frac{1}{2^{i-1}} e_i, \forall i = 1, \dots, j.$

Paso inductivo:

$$C[:, j+1] = A^j B = AA^{j-1}B = AC[:, j] = A\left(\frac{1}{2^{j-1}} e_j\right) = \frac{1}{2^{j-1}} Ae_j = \frac{1}{2^{j-1}}\left(\frac{1}{2} e_{j+1}\right) = \frac{1}{2^j} e_{j+1}, \forall i = 1, \dots, j.$$

Así, la matriz de controlabilidad $C_{K,n}$ es diagonal y no singular, y su i-ésima entrada diagonal es 2^{-i+1}. El polinomio característico de A es $p_A(x) = x^n$, por lo que $A^n = 0_{n\times n}$ y así $A^t B_K = 0$ para toda $t \geq n$. De aquí notamos que $C[:, t] = 0\ \forall\ t > n$, por lo que

$$W_{K,\tau} = C_{K,n}C_{K,n}^T = \mathrm{diag}\left(1, 2^{-2}, \dots, 2^{-(2n-2)}\right)$$

para toda $\tau \geq n$ y así $\lambda_{mín}(W_{K,\tau}) = 2^{-2n+2}$ para toda $\tau \geq n$. Como $W_{K,\tau}$ resulta invertible $\forall\, \tau \geq n$, concluimos que la red G con nodos de control en K es controlable en $T \geq n$ pasos, pero la energía de control crece exponencialmente con la cardinalidad de la red, ya que siempre existe un x_f para el cual $E(u_K^*(t))$ alcanza su cota superior en (5).

Lema 1. *Sea $x \in R^n$, con $||x||_2 = 1$, y $W \in M_{n\times n}$ (R) una matriz simétrica. Entonces $x^T W x \leq \lambda_{máx}(W)$.*

Métricas de controlabilidad :
Ejemplos de otras métricas cuantitativas de controlabilidad en sistemas dinámicos son la traza de la matriz inversa de la matriz Gramiana $tr(W_{K,T}^{-1})$ y el determinante de la matriz Gramiana $det(W_{K,T})$.
Se ha mostrado que $det(W_{K,T})$ es proporcional al volumen del elipsoide que contiene a los estados que pueden ser alcanzados con un control de entrada unitario, mientras que $tr(W_{K,T}^{-1})$ mide la energía de control promedio sobre estados finales aleatorios. La selección de los nodos de control para la optimización de estas métricas es usualmente un problema computacional combinatorio difícil, para el cual se han propuesto heurísticas sin garantías de desempeño y procedimientos de optimización no escalables.

Simulación 1

En esta sección utilizaremos una estrategia de *retroalimentación de estados* para controlar la dinámica de un sistema lineal dado, mediante un control unidimensional. Consideremos el sistema

$$\dot{x}(t) = Ax(t) + Bu(t) \text{con } A = \begin{bmatrix} 2 & 1 \\ 0 & 3 \end{bmatrix},\ B = \begin{bmatrix} 1 \\ 2 \end{bmatrix}; \qquad (6)$$

con $x : R \to R^2$, $u : R \to R$ y condición inicial $x(0) = x_0$. La matriz de controlabilidad C del sistema es entonces

$$C := [B\ AB] = \begin{bmatrix} 1 & 4 \\ 2 & 6 \end{bmatrix},$$

y así el sistema (6) es controlable, por ser C de rango pleno en sus filas. Supongamos que nuestra condición inicial es el estado $x(0) = x\ 0 = 2\ 3$ y nos interesa llevar al sistema a un estado final $x_f = [3\ 5]^T$. Los valores propios de A son 2 y 3, por lo que el sistema

$$\dot{x}(t) = Ax(t)$$

no es asintóticamente estable (en particular no es estable). La estrategia escogida nos dice que existe un control de la forma $u(t) = -K[x(t) - x_f]$, con $K \in M_{1\times 2}(R)$, que vuelve al sistema (6) asintóticamente estable. Con dicho control e introduciendo la nueva variable $v(t) = x(t) - x_f$ en el sistema resulta que:

$$\dot{v}(t) = \dot{x}(t) = Ax(t) + Bu(t) = Ax(t) + B\left(-K\left[x(t) - x_f\right]\right) = A\left(v(t) + x_f\right) - BKv(t)$$
$$= (A - BK)v(t) + Ax_f.$$

Siendo A':=A-BK y b:=Ax_f, debemos encontrar ahora el valor K tal que el sistema

$$\dot{v}(t) = A'v(t) + b,\ v(0) = 0 \qquad (7)$$

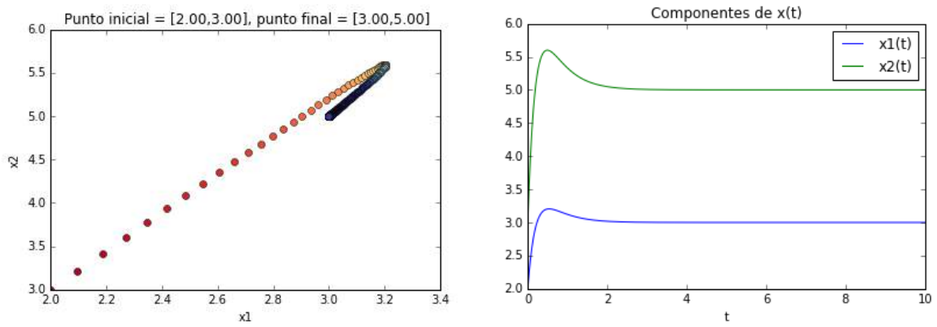
sea asintóticamente estable, i.e., encontrar K tal que los valores propios de A' tengan parte real negativa. Para esto, fijamos los valores propios que queramos tenga A', en nuestro caso serán $\lambda_1 = -2$ y $\lambda_2 = -5$. Así, debemos escoger K de manera que el polinomio característico $p_{A'}$ de A' tenga como raíces a λ_1 y λ_2. Resolviendo para K, en nuestro caso obtenemos que $K = [28\ \ -8]$, y el sistema (7) resulta ser asintóticamente estable. Ahora, la solución de (7) es:

$$v(t) = e^{A't}(v_0 + (A')^{-1}b) - (A')^{-1}b = \begin{bmatrix} -2e^{-5t} + e^{-2t} \\ \frac{-14}{3}e^{-5t} + \frac{8}{3}e^{-2t} \end{bmatrix};$$

por lo que

$$x(t) = \begin{bmatrix} -2e^{-5t} + e^{-2t} + 3 \\ \frac{-14}{3}e^{-5t} + \frac{8}{3}e^{-2t} + 5 \end{bmatrix}$$

es solución de (6) y satisface $x(0)=0$ y $\lim_{t\to\infty} x(t) = x_f$. La energía asociada al control u(t) fue $E(u(t)) = 2.4135139236$.



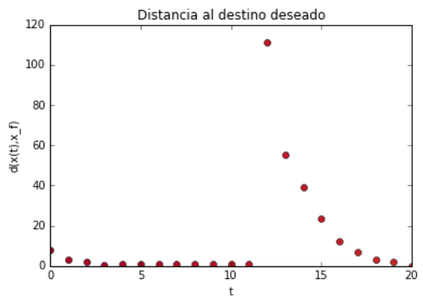
Simulación 2

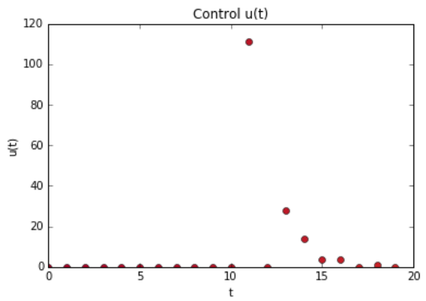
Para el caso disceto, trabajaremos ahora con el sistema del ejemplo 1, cuyas matrices de adyacencia y de control son:

$$A = \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 & \cdots & 0 & 0 \\ \frac{1}{2} & 0 & 0 & \cdots & 0 & 0 \\ 0 & \frac{1}{2} & 0 & \cdots & 0 & 0 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots & \vdots \\ 0 & 0 & 0 & \cdots & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & \cdots & \frac{1}{2} & 0 \end{bmatrix}, B = \begin{bmatrix} 1 \\ 0 \\ 0 \\ \vdots \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix},$$

con $A \in M_{n\times n}$ (R), $B \in M_{n\times 1}$ (R), n = 20. Vimos ya que dicho sistema es controlable en T pasos, para toda $T \geq n$. Escogemos el control $u_K^*(t)$ definido en (4), con $x_f = (0.108, 0.43, 0, 0.43, 0.217, 0.433, 0.43, 0, 0.433, 0)^T$, $\|x_f\|_2 = 1$, $x_0 = (3, 1, 4, 2, 0, 4, 0, 4, 1, 3)^T$; (ambos escogidos aleatoriamente).
Para T = 20, comprobamos que $x(T) = x_f$, obteniendo que la energía E del control u_K^* satisface:

$$E = 13324.812 \leq 262144 = \lambda_{mín}^{-1}(W_{K,T}); \qquad \text{(desigualdad (5)).}$$





CONCLUSIONES

Se introdujeron fundamentos de la teoría de control para entender el problema de controlabilidad en redes complejas y se propuso una métrica que cuantifica la dificultad en base a la energía requerida en un sistema dado. En base a dicha métrica, se estableció una relación entre la cantidad de nodos de control y la energía de control, mostrando de qué manera el número de nodos controlados debe crecer con respecto al número total de nodos, en redes estables y simétricas. Se comprobó además en los ejemplos 1 y 2 que la desigualdad (5) en efecto se satisface y se resolvieron dos problemas de control en caso continuo y discreto respectivamente.

BIBLIOGRAFIA

F. PASQUALETTI, S. ZAMPIERI, F. BULLO. (2014). "Controllability Metrics, Limitations and Algorithms for
Complex Networks", en Transactions on control of network systems, no. 1 ,vol. 1, Marzo.

T. KAILATH, (1980). *Linear Systems.* Englewood Cliffs, NJ, USA: Prentice-Hall.

R. A. HORN AND C. R. JOHNSON. (1985). *Matrix Analysis.* Cambridge, U.K.: Cambridge Univ. Press.

Y. Y. LIU, J. J. SLOTINE, AND A. L. BARABÁSI. (2011). "Controllability of complex networks", en Nature, vol.
473, no. 7346, pp. 167–173.

EXPRESIÓN HETERÓLOGA Y CARACTERIZACIÓN DE UNA ASPARAGINASA PARA EL TRATAMIENTO DE LA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

Juan Carlos Cruz Santos[1] y Martha Leticia Santos Martínez[2]

RESUMEN

La Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) es la enfermedad más común de leucemia entre niños. La L-asparaginasa (L-ASNasa) se utiliza en el tratamiento de LLA. Esta enzima produce la depleción a nivel sistémico de L-asparagina provocando la activación de la apoptosis en los linfoblastos. Su uso se ve limitado debido a que las fórmulas comerciales son de origen bacteriano provocando hipersensibilidad severa. El genoma de *Thermoplasma acidophilum* contiene un gen que codifica para una ASNasa con porcentajes de similitud e identidad cercanos a la enzima humana. Esto sugiere que la enzima de *T. acidophilum* provocaría menor exacerbación inmunitaria. En este trabajo la proteína se sobreexpresó, purificó, se obtuvo una concentración de 0.195 mg/mL y una actividad enzimática de 4488.02 ASPU/g.

ABSTRACT

Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) is the most frequently type of leukemia among children. L-asparaginase (L-ASNase) is used for the treatment of ALL. This enzyme produces systemically the depletion of L-asparagine causing the activation of apoptosis in lymphoblasts. Its use is limited because the commercial formulas are from bacterial origin causing severe hypersensitivity. *Thermoplasma acidophilum*'s genome contains an encoding gene, ASNase, whose similarity and identity are closer to the human enzyme. This suggests that *T. acidophilim* enzyme could reduce this immune exacerbation. In this work the protein was overexpressed, purified, with a concentration of 0.195 mg/mL and enzymatic activity of 4488.02 ASPU/g.

Palabras Clave: *Thermoplasma acidophilum*, L-asparaginasa, LLA.

INTRODUCCIÓN

La Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) es la enfermedad más común de leucemia entre niños. El término "aguda" se refiere a que la enfermedad puede progresar rápidamente, pudiendo ser fatal en pocos meses si no es tratada a tiempo. Las células leucémicas, responsables de la enfermedad, son linfocitos inmaduros dañados que se desarrollan anormalmente e inhiben sus mecanismos de apoptosis por lo que sobreviven, tienden a acumularse en la médula ósea y, posteriormente, invaden el torrente sanguíneo pudiendo afectar las funciones de otras células del cuerpo (American Cancer Society, 2016).

Entre los fármacos utilizados en el tratamiento de la enfermedad se encuentran: vincristina, L-asparaginasa, citarabina, daunorrubicina y prednisona (Longo et al., 2013). La L-asparaginasa (L-ASP o ASNasa), enzima que hidroliza la L-asparagina en L-aspartato y amonio, produce la depleción a nivel sistémico de este aminoácido, inhibiendo la síntesis proteica y, provocando así, la activación de los mecanismos de apoptosis de los linfoblastos. Sin embargo, su uso se ve limitado, debido a que, las fórmulas comerciales de esta enzima tienen origen enterobacteriano (*E. coli* o *Erwinia chrysanthemi*),

[1]Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Facultad de Ciencias Químicas; Av. Manuel Nava No. 6, Zona Universitaria, C.P: 78260, San Luis Potosí, S.L.P., jcarlos.cruz94@outlook.com
[2]Instituto de Investigación Científica y Tecnológica A.C., División de Biología Molecular; Camino a La Presa de San José 2055, Lomas 4ta. sección, C.P: 78216, San Luis Potosí, S.L.P., lsantos@ipicyt.edu.mx

provocando reacciones de hipersensibilidad y formación de anticuerpos. Además, tienen una limitada distribución farmacocinética y una rápida eliminación del cuerpo (Ballón Cossío, 2014).

Las L-ASNasa se clasifican en dos tipos: bacteriano y planta. Las L-ASNasa de tipo planta poseen una alta similaridad con las aspartilglucosamidasas, que también poseen actividad de L-ASNasa, provenientes de bacterias y humanos. Estás se expresan primero como precursores inactivos, requiriendo de una posterior autoproteólisis para su activación y la formación de formas oligoméricas activas así como heterotetrámeros (dímeros de heterodímeros alfa y beta) (Guzmán-Rodríguez, Serna-Domínguez, & Santos, 2014).

Thermoplasma acidophilum (crecimiento óptimo: 55-60°C y pH 0.5-4.0), es una arquea interesante debido a sus propiedades termoacidofílicas, siendo así que, sus enzimas termoestables tienen un gran potencial biotecnológico. Durante el análisis genómico de este microorganismo (Ruepp et al., 2000), fue detectado un marco abierto de lectura (*orf* , por sus siglas en inglés), cuya secuencia de aminoácidos es similar a la L-ASNasa del humano (hASGRL1) (Cantor et al., 2009). En el estudio realizado por Guzmám Rodríguez et al., 2014, el análisis bioinformático demostró que la L-ASNasa tipo planta de *T. acidophilum* tenía un 30.03% de identidad y un 45.69% de similaridad con la enzima humana, porcentajes mayores en comparación con otras enzimas provenientes de otros organismos. Dichas comparaciones sugieren que la enzima proveniente de *T. acidophilum* podría generar una menor respuesta inmune.

En el presente trabajo se describe la sobreexpresión heteróloga, purificación, cuantificación y detección preliminar de la actividad enzimática de la L-ASNasa de *T. acidophilum*.

MÉTODOS Y MATERIALES

Análisis de restricción de las clonas de *E. coli* usando BspEI y BspEI-XhoI
En un trabajo previo se generó el vector pET-28a(+)-Ta0338 para sobreexpresar la proteína *Ta0338*. La cepa de *E. coli* BL21(DE3)pLysS fue transformada con el vector pET-28a(+)-Ta0338 mediante choque térmico. Las bacterias se crecieron en medio sólido selectivo Luria Bertani (LB). El plásmido fue extraído con QIAprep® Spin Miniprep Kit (50) (Cat. No. 27104). La presencia del plásmido e inserto fue corroborada mediante dos perfiles de restricción. La primera reacción de digestión (digestión simple) fue preparada con 10 µL de DNA plasmídico, 5 µL de enzima BspEI, 2.5 µL de buffer NEB3 (10x) y 7.5 µL de agua estéril. Para la segunda reacción (digestión doble) se mezclaron 10 µL de DNA plasmídico, 2.5 µL de enzima XhoI, 5 µL de enzima BspEI, 0.25 µL de BSA (100x), 2.5 µL de buffer NEB3 (10x) y 4.75 µL de agua estéril. Las mezclas de reacción se incubaron a 37°C en termostato durante 1 hora. Posteriormente, los productos de digestión fueron cargados en gel de agarosa al 1% para su análisis. La electroforesis se corrió a 120v durante 1 hora; empleando como marcador de peso molecular: GeneRuler 1kb DNA Ladder.

Sobreexpresión heteróloga de la proteína L-ASNasa
Se inoculó una colonia aislada de bacterias a 20 mL de medio de cultivo líquido LB que contenía ampicilina (10 mg/mL) y cloranfenicol (34 mg/mL). El cultivo se dejó a 37°C durante toda la noche. Posteriormente se transfirieron 5 mL del cultivo de la noche anterior a 100 mL de medio de cultivo líquido selectivo LB; se dejaron crecer las bacterias a 37°C hasta alcanzar una Densidad Óptica a 600 nm de 0.6. Una vez alcanzada la OD requerida, se tomó una muestra de 1mL de cultivo (marcado como 0 h) y se procedió a agregar 100 µL de IPTG (1M) para inducir la expresión. Los cultivos fueron incubados a 37°C con agitación constante durante 8 horas. Durante el tiempo transcurrido se tomaron muestras de 1 mL del cultivo a las 4 y 8 horas para posterior análisis SDS-PAGE. Finalmente se recuperaron ~90 mL de cultivo, volumen que se repartió en dos tubos (~45 mL cada uno), se centrifugaron a 4000 x g por 20 minutos. Se les retiró el sobrenadante y las pastillas obtenidas se guardaron a -20°C.

Purificación de L-ASNasa por cromatografía de afinidad por níquel
La pastilla proveniente de ~45 mL de cultivo se resuspendió en 5670 µL de buffer de lisis (50 mM NaH_2PO_4, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH 8.0). Se añadió aproximadamente 1 mg de lisozima y se incubó en hielo durante 25 min. Posteriormente se centrifugó a 12000 x g durante 25 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante. La columna Ni-NTA (marca QIAGEN Cat. No. 31314) se equilibró con 600 µL de buffer de lisis, se centrifugó por 2 min a 890 x g. Una vez equilibrada la columna, se cargaron a ésta, 600 µL del lisado celular; se centrifugó por 5 min a 270 x g. La columna fue lavada dos veces con buffer de lavado (50 mM NaH_2PO_4, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol, pH 8.0) y centrifugada, en cada lavado, a 890 x g por 5 min. Finalmente, la proteína se eluyó dos veces con 300 µL de buffer de elución (50 mM NaH_2PO_4, 300 mM NaCl, 500 mM imidazol, pH 8.0). Las centrifugaciones fueron por 2 minutos a 890 x g; se recuperaron las eluciones. Las eluciones fueron dializadas con tubo de diálisis 8kDa y con buffer Tris-HCl (10 mM).

Cuantificación de la proteína por el método de Bradford
La concentración de L-ASNasa fue determinada a partir de una curva de calibración de Albúmina de Suero Bovino (BSA). El ensayo se realizó por duplicado. El rango de concentración de las soluciones estándar de BSA fue de 0.002 mg/mL a 0.02 mg/mL. La solución problema se preparó con 10 µL de proteína dializada y 990 µL de agua. A todas las soluciones se les agregó 300 µL de reactivo de Bradford. Se les dejó reposar por 15 minutos. Finalmente se leyeron las absorbancias a 600 nm en espectrofotómetro (Eppendor biophotometer) y se generó la curva de calibración.

Determinación de la actividad enzimática de la proteína
Para la determinación de la actividad de la ASNasa se generó una curva estándar de sulfato de amonio. Se prepararon cinco soluciones mezcla de reacción. A cada una de las soluciones se les agregó 2 mL de solución sustrato (1.5 g de L-Asp en 100 mL de buffer de ácido cítrico 0.1 M), enseguida, se incubaron en baño de agua por 10 min. Tras la incubación se añadieron, a cada tubo, 100 µL de solución estándar de $(NH_4)_2SO_4$ apropiada (Estándar #1: 1.3 mg/mL, Estándar #2: 2.6 mg/mL, Estándar #3: 7.8 mg/mL, Estándar #4: 13.0 mg/mL, Estándar #5: 19.5 mg/mL).

Las soluciones se incubaron exactamente por 30 min en baño de agua. A continuación, se les agregó 0.4 mL de solución de paro TCA (1.53 M). Una vez preparadas las cinco soluciones de reacción, se tomaron de cada una 20 µL, se mezclaron con 170 µL de fenol nitroprusiato y 170 µL de solución de HClO al 0.2%; esto para el desarrollo del color. Las soluciones se incubaron en baño de agua por 10 min. La muestra problema fue preparada siguiendo el procedimiento anterior, omitiendo la solución estándar y, en su lugar, se agregó 230 µL de proteína purificada. Posterior a la incubación, las soluciones se transfirieron a cubetas de espectrofotómetro y se leyeron las absorbancias a 600 nm. Los datos obtenidos fueron utilizados para generar la curva estándar y calcular la actividad enzimática de la proteína.

RESULTADOS

Análisis del perfil de restricción de *E. coli* BL21(DE3)pLysS + pET-28a(+)-Ta0338
Determinar la presencia del plásmido pET-28a(+)-Ta0338 en las bacterias *E. coli* BL21(DE3)pLysS, permite continuar con los procesos de sobreexpresión y purificación de la proteína de interés. Para ello, se realizaron dos digestiones utilizando BspEI y XhoI-BspEI.

El posterior análisis del gel de electroforesis muestra en el carril 1 dos bandas que no se desplazaron correctamente, aun así, es el resultado que se esperaba. Por otro lado, en el carril 2 las bandas tampoco han avanzado correctamente pues se esperaban tamaños de ~156 pb, ~3274 pb, ~2778 pb, siendo en la última donde se encuentra el gen de interés. Sin embargo, se observan tres bandas por lo que se da por hecho que la cepa tenía el plásmido (Figura 1).

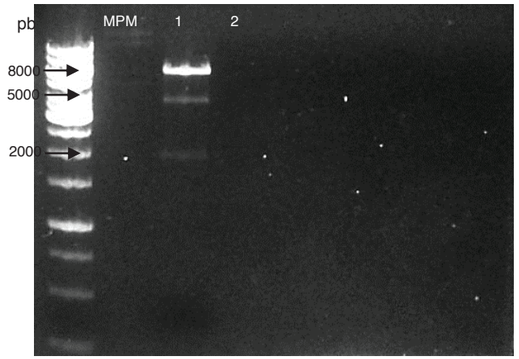


Figura 1. Perfil de restricción de E. coli BL21(DE3)pLysS + pET-28a(+)-Ta0338. MPM: *marcador de peso molecular,* ***1:*** *digestión simple,* ***2:*** *digestión doble*

Análisis SDS-PAGE de las muestras de inducción y proteína purificada

Durante la sobreexpresión de la proteína fueron tomadas tres muestras, las cuales correspondían a las 0 h (previo a la inducción), 4 h y 8 h. El análisis SDS-PAGE de estas muestras permite monitorear el proceso de la sobreexpresión. Las muestras fueron centrifugadas a 4000 x g por 20 min. Posteriormente las pastillas fueron tratadas con 1 mg de lisozima y llevadas a 95°C por 5 min en termostato. Se cargaron en el gel de poliacrilamida al 10%, 25 µL tanto de las muestras como de la proteína dializada y se corrieron a 200 v por 1 hora; utilizando BenchMark™ Protein Ladder como marcador de peso molecular. El revelado del gel muestra una serie de bandas de un tamaño de ~30 kDa que aumentan de intensidad según en el tiempo en que se tomó la muestra (mayor acumulamiento a las 8 h). Este tamaño de las bandas se asemeja a los 32 kDa de la ASNasa de *T. aquaticus,* dando así por hecho que esta es la proteína de interés. Por otro lado, en el carril 4 se puede observar una banda limpia de ~30 kDa, lo que indica que la purificación de la ASNasa fue exitosa (Figura 2).

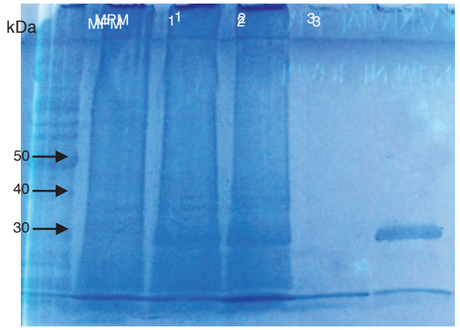


Figura 2. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% de las muestras de inducción y proteína purificada. MPM: *marcador de peso molecular,* ***1:*** *muestra 0 h,* ***2:*** *muestra 4 h,* ***3:*** *muestra 8 h,* ***4:*** *proteína pura*

Curva de calibración de BSA y cuantificación de la proteína

Para calcular la actividad enzimática de la ASNasa fue necesario determinar primero, la concentración de proteína que fue purificada, por lo que se generó una curva de calibración de BSA tal como se muestra en la Figura 3.

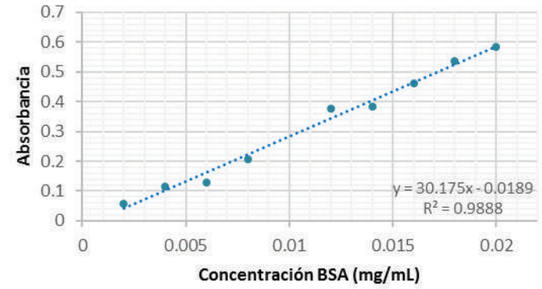


Figura 3. Curva de calibración de BSA para la cuantificación de ASNasa

Empleando la ecuación de la recta obtenida y aplicando el factor de dilución, se estableció que, la concentración de proteína purificada era de 0.1953822 mg/mL.

Actividad enzimática de la ASNasa

La actividad de la asparaginasa se expresa en unidades ASPU. Una ASPU se define como la cantidad de enzima requerida para liberar 1 µmol de amoníaco de la L-asparagina por minuto bajo condiciones de ensayo (pH=5.0; 37°C). la actividad fue calculada utilizando una curva estándar de $(NH_4)_2SO_4$ (Figura 4).

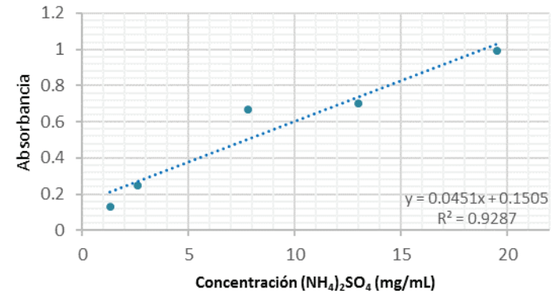


Figura 4. Curva estándar de $(NH_4)_2SO_4$ para la determinación de la actividad de la ASNasa

En base a la ecuación de la recta obtenida de la gráfica y la ecuación 1) se procedió a calcular las ASPU/g.

$$ASPU/g = \frac{A \times V \times Df \times 2 \times 10^6}{a \times M \times W \times 30 \times 10^3} \quad (1)$$

Donde: A es la absorbancia de la muestra problema (0.087), V es el volumen inicial de la muestra problema (25 mL), Df es el factor de dilución (1), 10^6 es el factor de conversión de moles a µmoles, a es la pendiente de la curva estándar (0.0451 mL/mg), M es el peso molecular del $(NH_4)_2SO_4$ (132,14 g/mol),

W es el peso de la muestra ($4.6x10^{-5}$ g), 30 es el tiempo de reacción (min), 10^3 es el factor de conversión de mg a g.
Comprobando de esta manera que la ASNasa proveniente de *T. acidophilum* tiene una actividad de 4866.17 ASPU/g.

CONCLUSIONES

La L-asparaginasa ha sido utilizada en el tratamiento de la Leucemia Linfoblástica Aguda. La ASNasa de *T. acidophilum* es candidata a sumarse en la lista de L-Asparaginasas; con la posible ventaja de provocar menos reacciones inmunes. En este trabajo la proteína recombinante se sobreexpresó satisfactoriamente de manera heteróloga en *E. coli* y posteriormente se purificó. Se realizaron ensayos para determinar la concentración y actividad enzimática; teniendo como resultado 0.195 mg/mL y 4488.02 ASPU/g, respectivamente. El siguiente paso del proyecto será sobreexpresar la proteína a una mayor escala, para así obtener suficiente cantidad, la cual será empleada en los ensayos de caracterización enzimática y actividad asparaginasa en linfocitos normales y líneas celulares de linfoblastos inmortales.

BIBLIOGRAFIA

BALLÓN COSSÍO, D. (2014). L-Asparaginasa, un arma de doble filo pero de vital importancia. *Revista de la Sociedad Boliviana de Pediatría, 53*, 24-28.

CANTOR, J. R., STONE, E. M., CHANTRANUPONG, L., & GEORGIOU, G. (2009). The Human Asparaginase-Like Protein 1 hASRGL1is an Ntn Hydrolase with β-aspartyl Peptidase Activity. *Biochemistry, 48*(46), 11026-11031. doi:10.1021/bi901397h

GUZMÁN RODRÍGUEZ, M., SERNA DOMÍNGUEZ, M. G., & SANTOS, L. (2014). Identification, heterologous expression and detection of enzymatic activity of an asparaginase from the archaeon Thermoplasma acidophilum. *Biocatalysis and Biotransformation, 32*(5-6), 295-301. doi:10.3109/10242422.2014.974572

LONGO, D. L., FAUCI, A. S., KASPER, D. L., HAUSER, S. L., JAMESON, J. L., & LOSCALZO, J. (2013). *Harrison: Manual de Medicina* Mc Graw Hill.

RUEPP, A., GRAML, W., SANTOS MARTINEZ, M.-L., KORETKE, K. K., VOLKER, C., MEWES, H. W., . . . BAUMEISTER, W. (2000). The genome sequence of the thermoacidophilic scavenger Thermoplasma acidophilum. *Nature, 407*(6803), 508-513. doi:http://www.nature.com/nature/journal/v407/n6803/suppinfo/407508a0_S1.htm

AMERICAN CANCER SOCIETY (2016). ¿Qué es la leucemia linfocítica aguda? Obtenido de http://www.cancer.org/espanol/cancer/leucemialinfociticaagudaadultos/guiadetallada/leucemia-linfocitica-aguda-adultos-what-is-what-is-a-l-l

FOTODEGRADACIÓN CATALÍTICA DE COMPUESTOS TÓXICOS

Samantha Lizeth Dávila Ortiz[1] y Claudia Martínez Gómez[2]

RESUMEN

En este trabajo se estudió la fotodegradación catalítica de 80 ppm de fenol utilizando sistemas de Pt/Al_2O_3-TiO_2 como catalizador; ya que el TiO_2 posee propiedades fotocatalíticas que lo presentan como uno de los óxidos de mayor impacto en la degradación de compuestos orgánicos, y se sabe que al doparlo con metales como Pd y Pt, aumentan la actividad fotocatalítica, debido a que actúan como trampas de electrones, y al dispersarlo en Al_2O_3 aumenta la superficie de contacto y por lo tanto aumenta su fotoactividad; A estos materiales se les hizo caracterización de áreas de superficie y difracción de rayos X; para la caracterización de fenol degradado se realizó con el espectrofotómetro UV-vis y se observó que el más activo fue Pt/AT_{15}.

ABSTRACT

In this work we studied the catalytic photodegradation of 80 ppm phenol using Pt/Al_2O_3-TiO_2 catalyst systems; Since the TiO_2 properties photocatalytic presenting it as one of the oxides of greater impact in the degradation of organic compounds, and is known to doping with metals like Pd and Pt, increasing the photocatalytic activity, since they act as traps electrons, and to disburse in Al_2O_3 increases the contact surface and therefore increases their fotoactividad; To these materials be them made characterization of areas of surface and diffraction of rays X; for the characterization of phenol gradient was carried out with the spectrophotometer UV-vis and is observed that the more active was Pt / AT_{15}.

Palabras Clave: Fotocatálisis heterogénea, degradación de fenol, Pt/ Al_2O_3-TiO_2

INTRODUCCIÓN

El agua es uno de los recursos naturales más importantes para los seres vivos, ya que es indispensable para llevar a cabo sus funciones vitales y aunque la contaminación de las aguas puede provenir de fuentes naturales, la mayor parte de la contaminación actual proviene de actividades industriales.

Debido a que las diferentes industrias utilizan enormes cantidades de agua, y que además generan una gran cantidad de residuos tóxicos desechándolos sin proporcionarles el tratamiento adecuado en ríos, lagunas y suelos, se generan focos de infección nocivos para los seres vivos.

Las aguas residuales industriales presentan una gran cantidad de contaminantes que tienen una acción muy compleja sobre el medio ambiente, afectando el desarrollo natural de los ecosistemas por el cambio de condiciones tales como la toxicidad, olor, color, entre otras.

Por lo que se hace imprescindible para la humanidad el desarrollo de investigaciones y pruebas con el objeto de disminuir o eliminar sustancias que perjudiquen al ambiente y como consecuencia a la especie humana. Muchos de los contaminantes del agua tienen características persistentes como el fenol que es

[1] Universidad Autónoma de Zacatecas,Unidad Académica de Ciencias Químicas, Químico en Alimentos ; Campus UAZ-Siglo XXI, Carretera Guadalajara Km 6, Ejido La Escondida, C.P: 98160, Zacatecas, Edo, sldo1417@gmail.com
[2] Universidad de Guanajuato, Campus Guanajuato, Departamento de Química, División de Ciencias Naturales y Exactas; Colonia Noria Alta s/n, C.P: 36050, Guanajuato, Gto., claudia.martinez@ugtomx.

un compuesto tóxico y que generalmente es considerado como uno de los contaminantes orgánicos más tóxicos en el medio ambiente ya que además de causar sabor y olor desagradable en el agua potable, es un compuesto cancerígeno para el ser humano.

En respuesta a esta creciente demanda ambiental para la descontaminación de aguas residuales, se han desarrollado en los últimos años nuevas tecnologías que son capaces de degradar este tipo de compuestos, dentro de las cuales se encuentran los Procesos de Oxidación Avanzada (POA´s), y dentro de este grupo podemos mencionar el proceso de Fotodegradación catalítica, el cual involucra la generación y uso de especies como radicales hidroxilo (•OH).
Los POA´s se basan en procesos fisicoquímicos capaces de producir cambios profundos en la estructura química de los contaminantes debido a que involucran la generación y uso de especies transitorias con un elevado poder oxidante como el radical hidroxilo (HO•). Este radical puede ser generado por varios medios y es altamente efectivo para la oxidación de materia orgánica, en especial aquella que no es biodegradable.[i]

Los Procesos de Oxidación Avanzada o (POA´s) son aplicados generalmente en pequeña o mediana escala y especialmente donde los métodos convencionales pierden eficiencia. Este es el caso de aguas con concentración de contaminantes tóxicos no biodegradables muy altas (> 1 g/l), o muy bajas (< 5 mg/l). Los POA´s generalmente pueden usarse solos o combinados entre ellos, pudiendo ser aplicados también a contaminantes de aire y suelos.[ii] Este proceso avanzado de oxidación se basa en la absorción de luz UV, en un semiconductor; el cual modifica la velocidad de la reacción química sin ser involucrado.

La fotocatálisis heterogénea consiste en la generación de pares electrón-hueco, en las partículas del semiconductor se genera cuando un fotón con energía hv que iguala o supera la energía del salto de la banda prohibida del semiconductor, Eg, incide sobre éste, y se promueve un electrón, e- , de la banda de valencia (BV) hacia la banda de conducción (BC), generándose un hueco con una carga positiva (h+), en la banda de valencia[iii]; Los electrones excitados son transferidos hacia la especie reducible, a medida que el catalizador acepta electrones de la especie oxidable que ocuparán los huecos (e- h+), (figura 1), y generando así reacciones de óxido-reducción que provocan la degradación y la mineralización de la sustancia tóxica[iv].

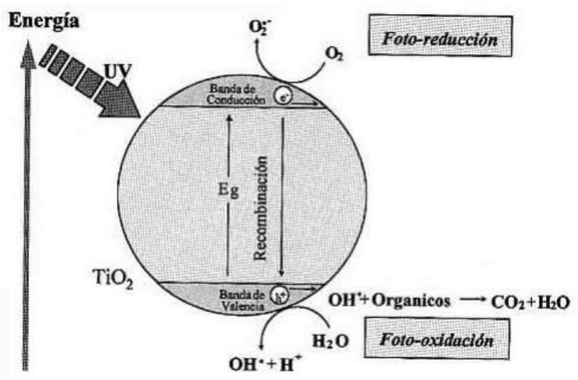


Figura 1. Proceso de Fotocatálisis Heterogénea.

Los semiconductores o fotocatalizadores más investigados son los óxidos metálicos, de entre ellos, el TiO_2 es el semiconductor que más se utiliza en experimentos de fotocatálisis heterogénea ya que es un semiconductor que cumple la función de catalizador, por lo que aumenta la velocidad de reacción sin alterar el equilibrio, además el TiO_2 se destaca por su alta foto sensibilidad, no toxicidad y disponibilidad comercial.[v] El TiO_2 además de ser un importante semiconductor y el fotocatalizador más activo y la Al_2O_3 es un aislante con alta superficie y térmica, química y resistencia mecánica, es posible dispersar el TiO_2 en la superficie de alúmina para fotodegradación de los contaminantes[vi] y disminuye la velocidad de recombinación del par electrón-hueco por lo que aumenta la actividad fotocatalítica del TiO_2[vii]

MÉTODOS Y MATERIALES

Para el desarrollo de esta investigación, se utilizó un reactor tipo Batch que constó de agitación continua, este sistema consiste en un reactor con un volumen de 250 ml, en el cual se introdujo una lámpara de luz con radiación UV, con agitación constante, esto se mantuvo a temperatura ambiente.

- Antes de iniciar la reacción, se preparó 1L de solución de fenol 80 ppm, después se tomaron alícuotas de 200ml de esta solución y se colocaron en el reactor, enseguida se le añadió 200 mg de catalizador.
- Se dejó agitando la solución por 1hr sin irradiación para llegar al equilibrio de adsorción y desorción de la molécula en el catalizador.
- Posteriormente se dejó agitando la solución con la lámpara sumergida en la solución, se tomaron muestras cada media hora durante 3 horas.
- Después se analizaron las muestras en un espectrofotómetro UV-vis.

RESULTADOS

Se obtuvieron diferentes curvas espectrales de la degradación de fenol de las diferentes muestras (Pt/ AT_5, Pt/ AT_{10}, Pt/ AT_{15} y Pt/TiO_2 como referencia) y como se puede ver en la figura 2 a partir de la primera hora después del inicio de la reacción con la lámpara, se degrado más del 60% de la molécula y a partir de la 4 hora la degradación de la molécula de fenol es constante. Se observó también que el material más activo para la degradación de fenol fue Pt/AT_{15}. Además se pudo observar que, la fotodegradación de fenol, con mayor eficacia, determina una longitud de onda de 269 nm.

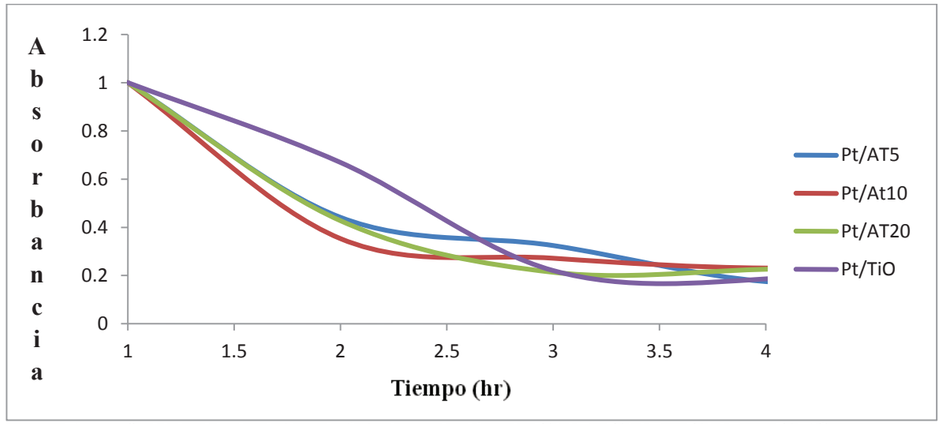


Figura 2. Velocidad relativa de fotodegradación de Pt/ AT_5, Pt/ AT_{10}, Pt/ AT_{15} y Pt/TiO_2

CONCLUSIONES

Los procesos de oxidación permiten degradar una gran variedad de compuestos tóxicos que son persistentes a la degradación natural. Estos procesos se han desarrollado en los últimos años y han probado ser efectivos en la destrucción de muchos contaminantes orgánicos. De los procesos de oxidación avanzada, la fotocatálisis heterogénea es una de las tecnologías fotooxidativas prometedoras en el tratamiento de aguas residuales, debido a que se utilizan materiales no tóxicos que además son de bajo costo y la reacción se lleva a temperatura ambiente, lo cual implica un ahorro económico.

De acuerdo a la bibliografía consultada, se comprobó que la interacción de Pt/Al_2O_3-TiO_2 disminuye la velocidad de recombinación del par electrón-hueco aumentando la actividad fotocatalítica del TiO_2, por otro lado al aumentar la superficie de contacto, aumentara su fotoactividad; Además se pudo observar que de acuerdo con la caracterización en el espectrofotometro UV-vis de la degradación de fenol con los distintos materiales (Pt/ AT_5, Pt/ AT_{10}, Pt/ AT_{15} y Pt/TiO_2 como referencia), el catalizador más activo para la degradación de fenol fue Pt/AT_{15}.

BIBLIOGRAFIA

[i] Legrini, O., Oliveros. E., and Braun, A. M., 1993. “Photochemical processes for water treatment”. Chem. Rev., 93, 671-698.
[ii] Forero J., Ortiz O. & Rios F.. (Diciembre 1, 2005). Aplicación de procesos de oxidación avanzada como tratamiento de fenol en aguas residuales industriales de refinerÍa. Julio 4, 2016, de Ciencia, Tecnología y Futuro Sitio web: http://www.redalyc.org/pdf/465/46530107.pdf
[iii] Hoffmann M., Martin S.T., Choi W. y Bahnemann D.W. 2003. Enviromental Applications of Semiconductor Photocatalysis Chemical Review Vol. 95. 451 – 459.
[iv] J. Blanco et al., “Eliminación de Contaminantes por Fotocatálisis Heterogénea,” en Diseño de Reactores para fotocatálisis, evaluación comparativa de las distintas opciones, M. Blesa, ed., pp. 243-266, Mar del Plata: Red CYTED VIII-G, 2001.
[v] Maicu M., Hidalgo M.C., Colón G. & Navío J.A.. (2011, January 25). Comparative study of the photodeposition of Pt, Au and Pd on pre-sulphated TiO_2 for the photocatalytic decomposition of phenol. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 217, 275–283.
[vi] Martínez, C., Del Angel G., Ramos E., Rangel I., Gonzalez F., Arrieta A., Vázquez A., Bonilla A & Sánchez M. . (June 7, 2016). Alumina coating with TiO2 and its effect on catalytic photodegradation of phenol and p-cresol. *J Chem Technol Biotechnol*, 91, 2211–2220.
[vii] C.M. Gómez, G. Del Angel, F. Tzompantzi, R. Gómez, L.M. Torres-Martínez. (March 24, 2012). Photocatalytic degradation of p-cresol on Pt/Al2O3–TiO2 mixed oxides: Effect of oxidizing and reducing pre-treatments. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 236, 21–25.

ESTANDARIZACIÓN DE LA CUANTIFICACIÓN POR qPCR DUPLEX DEL COCIENTE DNA MITOCONDRIAL Y DNA GENÓMICO EN EL DESARROLLO DE CEREBRO EMBRIONARIO DE RATÓN

Martina de la Rosa Hernandez[1] y Anaid Antaramian Salas[2]

RESUMEN

Existe la hipótesis de que la cantidad de mitocondrias en una célula y el número de copias de su genoma es dinámica durante el desarrollo. Es motivo de estudio el papel que tienen las mitocondrias en el metabolismo, envejecimiento y fisiopatogenia de enfermedades en los seres humanos (Rodríguez et al., 2010). En el presente trabajo se estandarizó exitosamente la cuantificación por qPCR Dúplex del cociente del mtDNA y el gDNA amplificando un fragmento del genoma mitocondrial y un intrón de un gen genómico utilizando un par de sondas con dos fluoróforos (FAM y JOEN) en la misma reacción a partir de diferentes concentraciones de DNA total de telencéfalo de ratón, en el estadio 13.5 de desarrollo embrionario.

ABSTRACT

The number of mitochondria in a cell and its genome copies are dynamic throughout development. The functional mitochondrial role in metabolism, aging and disease pathogenesis in humans is an interesting field of research (Rodríguez *et al*., 2010). In the present study, we standardized successfully the optimal conditions of Duplex qPCR using a pair of probes with two different fluorophores (FAM and JOEN) in order to determine the mtDNA/gDNA ratio using different concentrations of total DNA from mouse telencephalon at day 13.5 of embryonic development.

Palabras Clave: qPCR-Dúplex, DNA mitocondrial, sonda-FAM-JOEN, gen-PtgS2, Telencéfalo

INTRODUCCIÓN

Las células eucariontes tienen organelos llamados mitocondrias, la principal función de estas es proporcionar energía al metabolismo celular. Esta energía es sintetizada en forma de ATP a partir de la cadena transportadora de electrones durante la fosforilación oxidativa (FOS-OX) (Rodríguez y González, 2009). Sin embargo, las mitocondrias son organelos biológicos dinámicos, es decir, más que brindarnos energía celular, también pueden sufrir alteraciones que podrían heredarse (Maron, 2015) originando enfermedades neurológicas importantes. Aunque no se conoce con certeza la cantidad de genomas mitocondriales en un organismo, existe la hipótesis de que las mitocondrias en una célula, así como el número de copias de su genoma es dinámica a lo largo del desarrollo.

Una particularidad de estos organelos es que poseen un sistema genético de expresión que les permite replicar, transcribir y traducir la información genética que contienen (Solano *et al*., 2001). En el ser humano el ADNmt constituye una molécula circular de 16.569 pares de bases que contienen información para 37 genes que codifican para ARNs ribosomales (ARNr), ARNs de transferencia (ARNt), proteínas involucradas en la síntesis de proteínas y un conjunto de subunidades polipeptídicas de los complejos membranales translocadores de protones de la FOS-OX (González *et al*., 2003). El genoma mitocondrial del Ratón resulta ser homólogo en su secuencia y organización genética al ADNmt humano (Bibb *et al*., 2004), por lo que es de gran ayuda en la investigación de enfermedades hereditarias. Por lo anterior, y con el fin de poder medir el cociente de ADNmt y ADN genómico a lo largo de cualquier estadio en el

[1]Unidad Académica Multidisciplinaria Zona Huasteca, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Romualdo del campo No. 501, Fracc. Rafael Curiel, C.P. 79060, Cd. Valles, S.L.P., México; martina_delarosa@hotmail.com
[2]Instituto de Neurobiología, Unidad de Proteogenómica, Boulevard Juriquilla #3001, C.P. 76230, UNAM-Campus Juriquilla, Querétaro Qro. México; antaramian@unam.mx

desarrollo embrionario y en la vida adulta del ratón, en este trabajo se buscó estandarizar la amplificación de un fragmento de ADN mitocondrial y un fragmento de un gen unicopia genómico utilizando sondas (FAM y JOEN) para detectar un gen mitocondrial y el gen PtgS2 en una misma reacción de qPCR en Dúplex, a partir de diferentes concentraciones de DNA total obtenido de telencéfalo de un embrión de ratón en el estadio 13.5.

MÉTODOS Y MATERIALES

Obtención de la muestra

Se sacrificó un ratón hembra de 13.5 días de gestación por dislocación cervical, se extrajeron los embriones y se eligió un embrión, el cual se decapitó para la obtención del telencéfalo. Este se guardó a 4ºC para su procesamiento.

Purificación de DNA total con kit Promega™

En un tubo epppendorf estéril se colocó el telencéfalo con 600µL de solución de lisis en hielo y se homogenizó perfectamente con un homogeneizador de tejido. La muestra se incubó 15 min en un baño seco a 65ºC, posteriormente se agregaron 3µl de la enzima ARNasa, se homogenizó y se incubó a 37ºC en una incubadora por 15 minutos. Después se agregaron 200 µl de solución de precipitación de proteínas, incubándose 5 min en hielo, se mezcló por inversión y se centrifugó 10 min a 13600xg. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo con 600 µl de isopropanol y se mezcló por inversión; este se centrifugó por 1 min a 13000xg. Se descartó el sobrenadante y la pastilla se lavó con 600 µl de etanol al 70% (-4ºC). El tubo se centrifugó por 1 min a máxima velocidad en una microcentrífuga. Se eliminó el etanol y se dejó secar el tubo a 37ºC por 40 min en una incubadora. Finalmente, la pastilla se resuspendió perfectamente en 100 µl de agua libre de nucleasas y se incubó 5 min a 65ºC en un baño seco, hasta obtener la consistencia homogénea, la muestra purificada se conservó a -20ºC.

Cuantificación de DNA total

Para medir la pureza y concentración de DNA total purificado se tomaron 2 µl de la muestra y se midieron con el espectrofotómetro para ácidos nucleicos NanoDrop de *Thermo Scientific*™ utilizando un blanco de agua, con la relación 260/280 (pureza) y 230/260 (contaminación). Para la cuantificación en el lector de placas de fluorescencia Varioskan Flash de *Thermo Scientific*™ se midieron estándares de 100, 30, 3, 1, 0.3, 0.1, 0.03 y 0 ng/µl para obtener una curva de calibración. Para esto se preparó una mezcla con 7524 µl de buffer 1X y 76 µl de colorante intercalante de DNA. Se agregaron 10 µl de cada estándar y 1 µl de la muestra de interés por triplicado a 200 µl de la mezcla por separado en una placa con 96 pozos.

Digestión con enzima *Hind III*

La digestión enzimática se realizó en un microtubo, con 18 µl de agua libre de nucleasas, más 2 µl de buffer Tango, 1 µl de la muestra de DNA y 1 µl de la enzima *Hin*d III, se mezcló en vortex y se incubó a 37ºC por una hora. La integridad del DNA total purificado se evaluó mediante electroforesis, para ello se preparó un gel de agarosa al 1%, en 30ml de buffer TB 0.5X, más 1µl de reactivo Gelred™. Se cargaron 11 µl de la muestra digerida con 4 µl de amortiguador de carga, la electroforesis se corrió a 100 volts durante 40 minutos y se visualizó en un transiluminador de luz UV.

Estandarización de PCR en tiempo real-DUPLEX

Para la estandarización de la cuantificación del Genoma mitocondrial y el Genoma Nuclear en diferentes estadios del desarrollo embrionario de ratón con qPCR-Dúplex se construyó una curva utilizando diluciones a partir de 50 ng/µl de DNA purificado y un par de sondas. Se prepararon concentraciones a 100 ng/µl, 50 ng/µl y 5 ng/µl para determinar la concentración de DNA óptima de amplificación de reacción de la qPCR. Para esto se preparó una mezcla para 5 y 2 tubos por separado, fueron agregados 20 µl y 8 µl de Master Mix de Promega™, 5 y 2 µl mezcla de oligos Mitocondriales (150 nM), 1.5 y 0.6µl de oligos For y Rev de la sonda PtgS2 (300nM) y 18.5 y 5.4 µl de agua grado qPCR respectivamente. Se agregaron 9 µl de la mezcla para 5 tubos más 1µl de DNA a 50 y 5 ng/µl por duplicado, mientras que para la concentración de 100 ng/µl se tomaron 8 µl de la mezcla para 2 tubos más 2 µl de DNA a 50 ng/µl. Los tubos sin burbujas se centrifugaron 10 seg. a máxima velocidad y se colocaron en la gradilla del StepOne de Applied Biosystems ™ para realizar la corrida. Las condiciones óptimas para la reacción fueron: desnaturalización a 95ºC por 10 min., 40 ciclos amplificación a 92ºC por 15 segundos y 60ºC por 1 min. Los datos obtenidos se analizaron en el software de StepOne Real-Time PCR System.

Curva estándar en qPCR-Dúplex

Se prepararon 6 diluciones 1:3 a partir de 100 ng/µl de DNA genómico proporcionada por el laboratorio para una curva estándar bajo diferentes condiciones de concentración de oligos del set de PtgS2 y de DNA. Para esto se preparó una mezcla para 20 tubos con 20µl de agua grado qPCR, 20µl del set de PtgS2, 20µl de oligos mitocondriales y 80µl de Master Mix de Promega ™. Después 7µl de la mezcla anterior fueron agregados a cada tubo más 3µl de DNA a 40, 13.3, 4.4,1.46,.48 y.16 ng/µl por triplicado.

RESULTADOS

La calidad del DNA total obtenido a partir del telencéfalo de embrión de ratón se observa en la figura 1, en el tercer carril del gel de agarosa se muestra la integridad del DNA, un barrido bien definido por los múltiples cortes de la enzima *Hin*d III durante una hora de digestión. De acuerdo a los valores obtenidos en el NanoDrop, el DNA extraído mediante kit tiene un cociente 260/280 de 1.86, y un cociente de 230/260 de 2.08 con una concentración de 338 ng/µl. Estos datos son favorables para un DNA puro y limpio con valores aproximados a 1.8 y 2.0-2.2, valores menores a estos indican contaminantes que absorbe a 230 nm (Glassing *et al*., 2016).

Sin embargo, el NanoDrop sobreestima los valores de concentración, por lo que se determinó con el Varioskan las concentraciones reales, en la figura 2 se presenta la florescencia tanto de los estándares, como de la muestra por triplicado. La figura 3 indica la correlación entre cada uno de los estándares y la curva de calibración para determinar concentraciones. El DNA extraído tubo una concentración de 87.64 ng/µl (tabla 1).

Respecto a la estandarización, se logró amplificar el gen mitocondrial y el gen PtgS2 (prostaglandina-endoperóxido sintasa) utilizando concentraciones de 100 y 50 ng/µl de DNA total de telencéfalo de ratón en el estadio 13.5. Sin embargo, en este primer ensayo el gen PtgS2 no se detectó a 5ng/µl de DNA, esto puede ser debido a que el DNA mitocondrial es mucho más abundante que el nuclear en el desarrollo. Los CT obtenidos por la amplificación con las sondas FAM y JOEN se muestran en la tabla 2, se observa mínima variación entre duplicados, pero entre diluciones existe una diferencia menor de 1.5 ciclos, esto indica que existen errores en la técnica de pipeteo al depositar la muestra.

Todas las muestras están dentro del rango dinámico de detección de 10 a 33 ciclos aproximadamente. Por otra parte, los productos amplificados corresponden a los genes diana ya que se utilizaron oligos y sodas definidas a partir de productos de qPCR secuenciados mostrados en la tabla 3. Afortunadamente la aplificación de ambos genes pudo realizarse (DNAmt en verde) y DNAg en azul) con las concentraciones utilizadas en el ensayo (fig. 4).

La curva estándar se hizo en base a los resultados obtenidos durante la estandarización, ya que las concentraciones usadas de DNA y oligos PtgS2 no permitían una amplificación óptima para detectar el gen PtgS2; Se obtuvieron valores para el R^2 de 0.96 y 0.98, curva del mitocondrial y del PtgS2 respectivamente (figura 6). Se observó que con mayores concentraciones de oligos y DNA el PtgS2(rojo) se detecta dentro del rango dinámico en el que ocurre la reacción (figura 5).

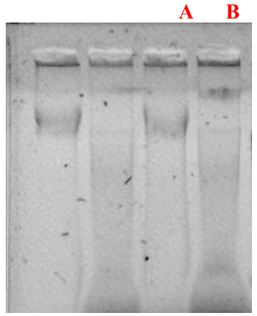


Figura 1. Digestión de DNA total con Hind III en gel de agarosa al 1%; A) DNAt sin digerir, B) DNAt digerido

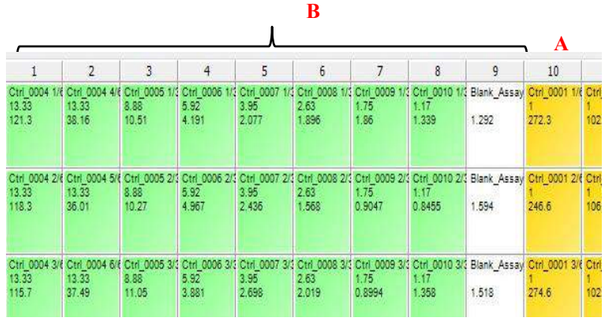


Figura 2. Valor de florescencia obtenido por el Varioskan, A) Estándares 100, 30, 3, 1, 0.3, 0.1, 0.03 y 0 ng/µl, B) Muestra Telencéfalo de E8 por triplicado

Florescencia	ng/µl	Promedio ng/µl	Desviación Estándar
102.2	86.627	87.64	2.096
106.5	90.301		
102.3	86.713		

Tabla 1. Florescencia de la muestra medida por triplicado y concentración obtenida por el Varioskan flash a partir de la ecuación de la recta

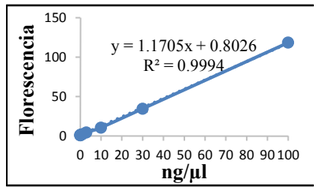


Figura 3. Curva estándar y correlación lineal: 100, 30, 3, 1, 0.3, 0.1 y 0.03 ng de DNA.

Tabla 2. Valores de CT obtenidos durante la amplificación del gen mitocondrial y PtgS2 por qPCR Duplex utilizando las sondas FAM y JOEN en el sofware del StepOne

Muestra ng	Gen	Sonda	CT
0	Mit	JOEN	FUERA DE RANGO (34.031)
0	PtgS2	FAM	INDETERMINADO
100	Mit	JOEN	13.098
100	PtgS2	FAM	25.209
100	Mit	JOEN	12.713
100	PtgS2	FAM	25.562
50	Mit	JOEN	13.11
50	PtgS2	FAM	38.031
50	Mit	JOEN	14.858
50	PtgS2	FAM	38.316
5	Mit	JOEN	15.685
5	PtgS2	FAM	INDETERMINADO
5	Mit	JOEN	16.999
5	PtgS2	FAM	INDETERMINADO

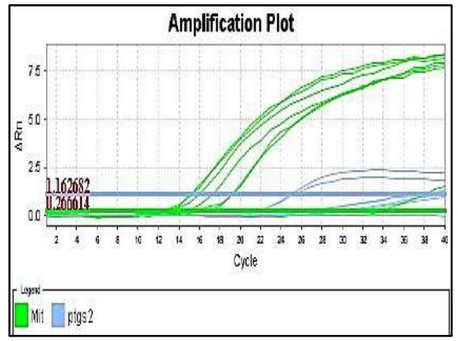


Figura 4. Curva de amplificación de DNA mitocondrial y nuclear a 100, 50 y 5 ng/µl de DNA total de telencéfalo de ratón con 13.5 días de desarrollo embrionario

Tabla 3. Secuencias de Primer y Sondas utilizadas para la estandarización de la cuantificación de genoma nuclear y mitocondrial a partir de productos de qPCR ya secuenciadas.

PRIMER/SONDA	GEN MITOCONDRIAL Secuencia 5'-3'	GEN PtgS2 Secuencia 5'-3'
Oligo fw	AACAACCAACAAACCCACTAA	TACCCATGGCTCACAGAATTG
Oligo rev	TATTTCTACACAGCATTCAACTGC	GTCTGTAGTTATTGGTGAGGGC
FAM	----------	TGGTTGACTAGGGTTTGGGTCAGA
JOEN	GCAGTTGAATGCTGTGTAGAAATA	----------

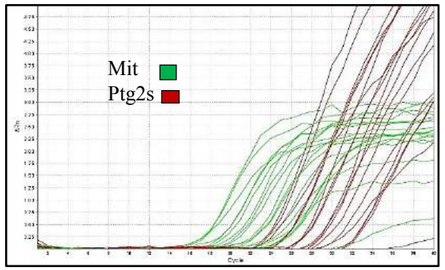


Figura 5. Curva de amplificación a 120, 39.99, 13.2, 4.38, 1.44 y 0.48 ng/ µl de DNAt con mayores concentraciones de set de oligos PtgS2 (rojo) y muestra.

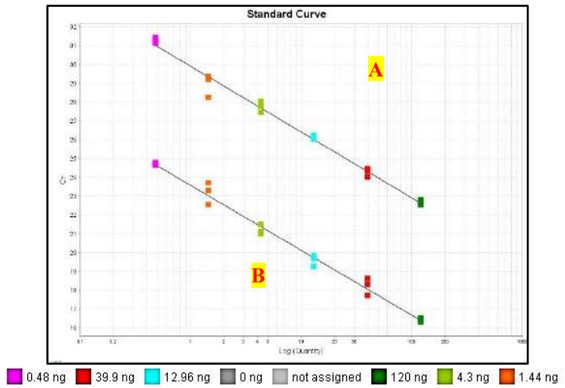


Figura 6. A) Curva estándar para el gen mitocondrial: pendiente -3.35, R^2 0.96, eficiencia 94.9%; B) Curva estándar para el PtgS2: pendiente -3.5, R^2 0.98, eficiencia 92.89%

CONCLUSIONES

Se comprobó que el DNA mitocondrial y el gen PtgS2 pueden ser amplificados en la misma reacción de qPCR dúplex con concentraciones de 50 y 100ng de DNA total de tejido cerebral de ratón utilizando un par de sondas (FAM y JOEN), mezcla de oligos mitocondriales y set de oligos para PtgS2. Lo anterior es de gran importancia ya que este trabajo demuestra que estas condiciones son óptimas para amplificar estos genes, esto permitirá determinar el cociente entre el DNA mitocondrial y DNA genómico para futuras investigaciones que deseen estudiar el dinamismo del genoma mitocondrial durante el desarrollo embrionario y/o del adulto, así como las posibles variaciones genéticas que ocurren en diferentes etapas de la vida.

Con la curva estándar se determinó que es necesario utilizar concentraciones mayores de oligos PtgS2 y DNA para obtener una buena amplificación y detectar a PtgS2, ya que posiblemente la degradación del DNA purificado tuvo un afecto negativo durante la eficiencia del ensayo debido a la manipulación, congelación y/o descongelación de esta. Se deben trabajar muestras con un alto grado de pureza, porque la degradación no permite una amplificación óptima; además, no se recomienda utilizar conservadores porque pueden interferir o inhibir la reacción de PCR en tiempo real.

BIBLIOGRAFÍA

Glassing A., Dowd S. E., Galandiuk S., Davis B. y Chiodini R. J., (2016). Inherent bacterial DNA contamination of extraction and sequencing reagents may affect interpretation of microbiota in low bacterial biomass samples; *Gut Pathogens*, 8:24, pp 1-12.

Maron F. D., (2015) Recortar el ADN mitocondrial dañado en ratones y células humanas es un paso hacia la prevención de enfermedades hereditarias graves. En Revista Scientific American en español Vol. 248, Issue 3, Consultada en http://www.scientificamerican.com/espanol/noticias/controversial-gene-editing-approach-gains-ground/(fecha de consulta 04-07-2016).

Rodríguez-Violante M., Cervantes-Arriaga A., Vargas-Cañas S. y Corona T. (2010) Papel de la función mitocondrial en las enfermedades neurodegenerativas; Una Revisión, Rev. Arch. Neurocien (Mex) Vol. 15, No. 1: 39-46, Enero-marzo, pp. 39-46.

Rodríguez-Salinas E. y González-Halphen D., (2009) *Los genomas mitocondriales: ¿Qué nos dicen sobre la evolución de las algas verdes?* Una Revisión; Revista Latinoamericana de Microbiología, Vol. 52, Nos. 1-2, Enero-marzo, pp. 44-57.

Bibb M. J., Van Etten R. A., Wright C. T., Walberg M. W. y Clayton D. A., (2004) Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA, Journal Cell, Volumen 26, Número 2, Parte 2, octubre, pp.167-180.

González-Halphen D., Pérez-Martínez X., Funes S., Reyes-Prieto A. y Santillán-Torres J. L., (2003) La migración de genes de la mitocondria al núcleo y la evolución de los genomas mitocondriales. En Mensaje bioquímico UNAM, Vol. 27, pp. 201-219.

Solano A., Playán A., López-Pérez M. J., Montoya J., (2001) Enfermedades genéticas del ADN mitocondrial humano, una revisión. Revista de Salud Pública Mex; Vol.43, No. 2, Marzo-abril, pp.151-161.

USO DE LA ESPECTROSCOPIA RAMAN PARA EL ANÁLISIS DE PIEL

Ana Cristina Delgado Chávez[1] y Francisco Javier González Contreras[2]

RESUMEN

Las biopsias ópticas se consideran técnicas no invasivas para el estudio de distintas muestras, proporcionan huellas digitales acerca de la composición molecular y química, así como los cambios químicos entre muestras de piel, pudiendo llegar a diferenciar entre una muestra de piel con cierta lesión y piel sana. En este estudio se presentan espectros Raman *in vitro* de una muestra de piel humana. Mediante el uso de mapeo automático con un espectrómetro Raman se obtuvo una imagen en 2D mostrando un mapa de Fluorescencia en su superficie respecto a un componente específico de la piel y las variaciones del componente en cada sección de la muestra, proporcionando información complementaria a histología para el diagnóstico de una enfermedad en la piel por medio de una técnica óptica no invasiva.

ABSTRACT

Optical biopsies are considered noninvasive techniques for the study of different samples, providing finger prints about molecular and chemical composition, as well as chemical changes in the skin samples, allowing us to differentiate between a skin lesion and healthy skin sample. In this study are presented *in vitro* Raman spectra of a human skin sample. By using automatic mapping with Raman spectroscopy, a 2D image was obtained showing a Fluorescence map over its surface with respect of a specific skin component and the variations of the component in each section of the sample, providing additional information for histology in the diagnosis of a skin disease by using a non-invasive technique.

Palabras clave: biopsia óptica, espectroscopia Raman, imagen por Fluorescencia

INTRODUCCIÓN

El cáncer de piel es el más común entre los diferentes tipos de cáncer que existe; el melanoma conforma el 1% de los casos de cáncer de piel y la causa de la mayoría de muertes por cáncer (American Cancer Society, 2015), en estados unidos han sido diagnosticados 3.5 millones de casos, incrementando en un 3% la tasa anual. La identificación de melanomas es generalmente realizada por dermatólogos, en la cual una evaluación para lesiones requiere de biopsias quirúrgicas, mismas que se vuelven imprácticas para individuos con gran cantidad de lesiones (Zeng, Lui, & McLean, 2011) y la precisión de su diagnóstico está entre el 49 y el 81%, con un tercio de melanomas diagnosticados erróneamente.

[1] Universidad Autónoma de Coahuila, Facultad de Ciencias Biológicas, Blvd. Torreón-Matamoros Km 7.5, Ejido el Águila, Ciudad Universitaria, C.P. 27275, Torreón, Coahuila, México; cris_del_c@hotmail.com
[2] Universidad Autónoma de San Luis Potosí, CIACYT, Centro de Ciencia y Tecnología de Terahertz, Av. Sierra Leona 550, Lomas 2ª sección, C.P. 78210, San Luis Potosí, San Luis Potosí, México; javier.gonzalez@uaslp.mx

En los últimos años ha surgido un método de biopsia óptica el cual se encuentra bajo investigación para el diagnóstico de lesiones en la piel (Lui, Zhao, McLean, & Zeng, 2012) el cual puede mejorar la especificidad de los diagnósticos reduciendo falsos positivos, debido a su habilidad para detectar cambios moleculares asociados con patologías de tejido (Zeng, Lui, & McLean, 2011). La identificación de lesiones y enfermedades se lleva a cabo a través de las características generales y los cambios específicos en cantidad y/o conformación de los ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y carbohidratos de una muestra (Choo-Smith, y otros, 2002).La espectroscopia Raman permite dicha identificación mediante variaciones estructurales de los picos del espectro, correspondientes a vibraciones de la cantidad y/o conformación de los compuestos antes mencionados, proporcionando así una huella digital del tejido(González, y otros, 2012). El objetivo de este proyecto es analizar y obtener una imagen mediante microscopía electrónica de barrido y espectroscopia Raman, a fin de demostrar la utilidad de las biopsias ópticas en el diagnóstico de enfermedades de piel.

MÉTODOS Y MATERIALES

La muestra analizada de piel procede de una biopsia realizada en el Hospital Central Dr. Ignacio Morones Prieto de la ciudad de San Luis Potosí, misma que fue cubierta de parafilm para su conservación y mejora en la manipulación.

La muestra fue estudiada morfológicamente utilizando el equipo SEM (JEOL, NeoScope JCM-5000) mediante aumentos de 44x, 10kv y bajo vacío. Los espectros Raman fueron obtenidos mediante mapeo automático en una región 51.56x51.63µm, con un espectrómetro Raman (Horiba Scientific Xplora Plus) utilizando un aumento de 10x, un láser infrarrojo de longitud de 785nm y una potencia de 100%, con un rango de longitud para medición de la muestra de 500 – 1800 cm^{-1}.

Una vez obtenidos los espectros con el mapeo, se procesaron mediante el programa Vancouver Raman Algorithm a fin de remover la fluorescencia de cada uno de ellos. Los datos de los espectros obtenidos del programa Vancouver se tabularon y se eligió la longitud de la banda en 848.195cm-¹ el cual representa un polisacárido, y la longitud de la banda en 1270.27cm-¹ y con los 100 espectros de dichas banda se realizaron matrices de 10x5 mismas que se llevaron a normalización tomando el valor máximo como 1 y el valor mínimo como 0.

Con las matrices se reconstruyó la imagen de la misma región seleccionada del SEM obteniendo una imagen 2D con un mapa de Fluorescencia sobre su superficie mediante el uso del software MATLAB.

RESULTADOS

La microscopia electrónica de barrido (fig.1A) proporcionó una imagen con mayor claridad, la cual se pudo amplificar 44x, mostrando la región específica que se llevó a cabo en el mapeo con el espectroscopio Raman (fig. 1B, 1C) y teniendo un enfoque más nítido que el que se obtiene con una imagen óptica (fig. 1D)

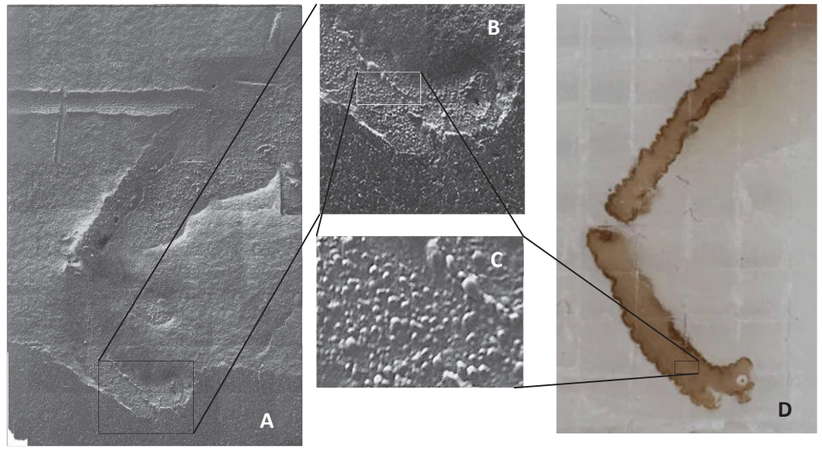


Fig. 1 Morfología de muestra de piel tomada en SEM. A imagen reconstruida de morfología completa de la muestra del SEM. B acercamiento de región del mapeo. C región de la muestra donde se realizó el mapeo. D imagen óptica de la muestra.

Mediante el uso de la microscopia Raman se pueden reconstruir imágenes tanto de espectros Raman (fig.2B, fig.3A) como espectros de Fluorescencia (fig.2C, fig.3B) y con ellas ver las diferencias de tonalidades en una escala de 0 a 1, lo cual significa una diferencia de la proporción de lo que es el polisacárido (fig.2B, 2C) y la amida III en la muestra (fig.3A, 3B).

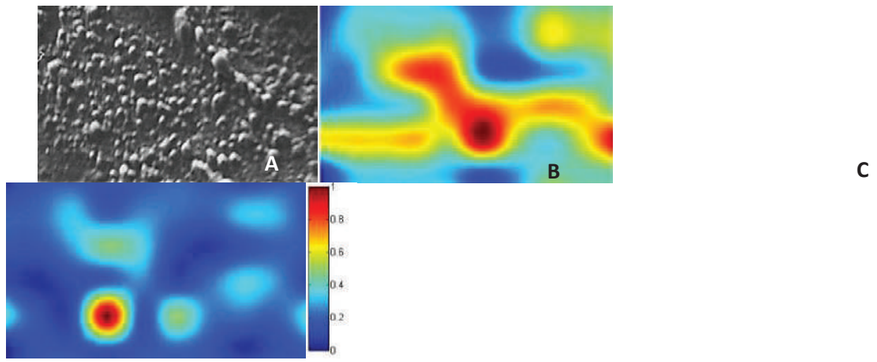


Fig. 2 Reconstrucciones de la imagen a partir del polisacárido en la banda de 848cm^{-1}. A. Región de la imagen obtenida con el SEM. B. Imagen reconstruida a partir de espectros de Fluorescencia. C. Imagen reconstruida a partir de espectros Raman.

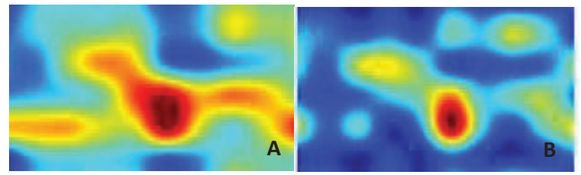


Fig. 3 Reconstrucciones de la imagen a partir del compuesto Amida III en la banda de 1270cm^{-1}. A. Imagen reconstruida a partir de espectros de Fluorescencia. B. Imagen reconstruida a partir de espectros Raman.

CONCLUSIONES

Gracias al uso de la microscopia electrónica en conjunto con espectroscopia Raman se puede obtener una imagen bidimensional la cual proporciona información complementaria al equipo de histología, debido a que se obtienen proporciones de un compuesto en una misma muestra pudiendo observar las variaciones y llegar a un diagnóstico más preciso. Perspectivas futuras se centran en la cuantificación de algunos de los componentes de la piel, así como encontrar las variaciones de más componentes en la piel que llegan a causar enfermedades en ella.

AGRADECIMIENTOS

En el presente trabajo se agradece la colaboración del Dr. José Manuel Gutiérrez Hernández por su constante cooperación y al Maestro en Ciencias Rodrigo Cabrera Alonso por su colaboración en la reconstrucción de las imágenes.

BIBLIOGRAFÍA

AMERICAN CANCER SOCIETY. (13 de Mayo de 2015). *American Cancer Society.* Recuperado el 08 de Junio de 2016, de Cáncer de piel tipo melanoma: www.cancer.org.

ZENG, H., LUI, H., & MCLEAN, D. I. (2011). "Skin cancer detection using in vivo Raman spectroscopy" en *SPIE*, 1-3.

LUI, H., ZHAO, J., MCLEAN, O., & ZENG, H. (2012). "Real-time Raman Spectroscopy for In Vivo Skin Cancer" en *American Association for Cancer Research, 72*, 2491-2500.

CHOO-SMITH, L.; EDWARDS, H.; ENDTZ, H.; KROS, J.; HEULE, F; BARR, H.; ROBINSON, J. S.; BRUINING, A. & PUPPELS, G. (2002). "Medical Applications of Raman Spectroscopy: from Proof of Principle to Clinal Implementation" en *National Research Council of Canada, 67*, 1-9.

GONZÁLEZ, J.; MARTÍNEZ , J.; MARTÍNEZ, B.; PALOMARES , P.; TORRES, L.; VARGAS, H.; GALLEGOS, L.; GONZÁLEZ , R.; JUÁREZ, H. & ESPINOZA, P. (2012). "Aplicaciones de la espectroscopia Raman de superficie amplificada en el diagnóstico del cáncer basado en el análisis de muestras de suero sanguíneo" en *Ide@s CONCYTEG*, 1091-1100.

ESTUDIO DE LA RECUPERACIÓN DEL NAPROXENO MEDIANTE LA TÉCNICA DE EXTRACCIÓN LIQUÍDO-LIQUÍDO

Edith Jessica Delgado Hernandez[1] y Teresa Alejandra Razo Lazcano[2]

RESUMEN

El objetivo de éste proyecto fue trabajar en la recuperación de Naproxeno, el cual es uno de los fármacos que se han encontrado en aguas residuales representando un problema ambiental. Primeramente, se determinó el pico de absorción más adecuado para lograr la cuantificación del fármaco, posteriormente, se estableció el intervalo de concentraciones en donde se cumplió la Ley de Beer-Lambert. Definidas estas condiciones, se realizó la técnica de extracción líquido-liquido en donde se trabajaron con distintos pH desde 4 hasta 11. Se tomó como fase acuosa soluciones a diferentes pH con el fármaco disuelto y como fase orgánica se utilizó dodecano y aceite de soya comercial. Los mejores porcentajes de extracción fueron obtenidos utilizando aceite de soya como fase orgánica.

ABSTRACT

The objective of this project was the naproxen recovery; which is one of the pharmaceuticals that they have found in waste water representing an environmental problem. First, the absorption peak most adequate was determined in order to achieve the quantification of the drug, later, the range of concentrations was established were the Beer- Lambert law was fulfilled. Defined these conditions, the technology of liquid-liquid extraction was performed where they were employed with different values of pH from 4 to 11. The naproxen dissolves at different values of pH was used as aqueous phase and dodecane and soybean oil as organic phase. The best percentages of extraction were obtained using oil of soy bean as organic phase.

Palabras clave: naproxeno, dodecano, extracción liquido-liquido, desextracción, aceite de soya.

INTRODUCCIÓN

La rápida urbanización y el aumento en las actividades industriales y agrícolas, ha dado como resultado una mayor demanda de agua y, por lo tanto, un incremento en la generación de aguas residuales. En consecuencia, diversos suministros de agua son expuestos a sufrir una contaminación generalizada por diferentes compuestos químicos. Entre los contaminantes, se encuentran aquellos referidos como "contaminantes orgánicos emergentes". Estos incluyen diferentes clases de contaminantes químicos dentro de los cuales se encuentran los compuestos farmacéuticos.

El uso de fármacos adquiridos con y sin prescripción médica es estimado en miles de toneladas métricas por año. La principal fuente de emisión de estos compuestos son las plantas de tratamiento de aguas residuales, las cuales procesan aguas residuales domésticas, los efluentes de hospitales, ganadería (excreciones urinarias y fecales provenientes de humanos y animales después de la administración de fármacos) e industrias. Las concentraciones muy bajas, en el orden $ng.L^{-1}$ y $\mu g.L^{-1}$, puede presentarse la bioacumulación de dichos compuestos e inducir efectos adversos, ya sean conocidos o no, sobre los seres humanos y el ecosistema. Los fármacos encontrados más

[1] Universidad Autónoma de Coahuila, Facultad de Ciencias Químicas, Interlomas No. 15 Col. La Herradura 2ª Secc. C.P. 00052, Saltillo, Coahuila, edithdelgadohernandez@uadec.edu.mx
[2] Universidad de Guanajuato, Facultad de Química, Departamento de Química, sede Pueblito de Rocha, cerro de la Venada, colonia Pueblito de Rocha, C.P. 36040, Guanajuato, Guanajuato, tererazo@ugto.mx

comúnmente en aguas residuales son: anti-inflamatorio, analgésicos, antibióticos, antihipertensivos, hormonas, reguladores lipídicos, β-bloqueadores, ansiolíticos, anticonvulsivos, agentes contra úlceras, diuréticos, antidiabéticos y brancodilatadores. Dentro de los anti-inflamatorios no esteroideos (NSAIDs) se encuentran los derivados del ácido propiónico, tal como lo es el naproxeno, fármacos adquiridos sin prescripción médica y comúnmente consumidos por la población. Ha sido detectado en aguas residuales reutilizadas, debido a esto, resulta importante el desarrollo de nuevas metodologías que permitan la recuperación y/o separación eficiente de compuestos farmacéuticos.
Así, se propone la técnica de Membranas Líquidas Emulsionadas (MLE) como método sencillo y útil que puede actuar como tratamiento secundario en el proceso de purificación de aguas residuales.

Para tal fin, primeramente se debe realizar un estudio de Extracción Liquido-Liquido (ELL) para determinar las soluciones que actuarán como fases acuosa y orgánica, así como, el extractante más adecuado para llevar a cabo la extracción del fármaco.

MÉTODOS Y MATERIALES

Prueba de solubilidad
Reactivos: NaOH $1x10^{-2}M$, $1x10^{-3}M$, $1x10^{-4}M$. HCl $1x10^{-2}M$, $1x10^{-3}M$, $1x10^{-4}M$.
Naproxeno sólido, agua desionizada.
Para las pruebas de solubilidad se disolvieron 10 mg de naproxeno en 5 ml de las diferentes soluciones de NaOH y HCl.

Curva de calibración.
Definidas las condiciones a las cuales el principio activo fue soluble, se procedió a la cuantificación del mismo mediante la realización de la curva de calibración usando un intervalo de concentraciones de 0 – 100 ppm.

Extracción líquido-líquido.
Se puso en contacto 10 ml de la fase acuosa (solución de 50 ppm) con 10 ml de la fase orgánica (aceite o dodecano). La fase acuosa se encontraba constituida por naproxeno (50 ppm) disuelto en HCl ($1x10^{-4}M$, $1x10^{-5}M$) ó NaOH ($1x10^{-3}M$, $1x10^{-4}M$, $1x10^{-5}M$, 0.0005M) y la fase orgánica por aceite de soya o dodecano. Posteriormente, las soluciones se pusieron en agitación a una velocidad de 140 rpm, mediante un agitador de movimiento ping-pong, durante 1 hora. Al término de la agitación se separaron las fases con de un embudo de separación y por medio de papel separador de fases. Así, a la fase acuosa se le cuantificó la concentración de naproxeno mediante la técnica de Espectroscopía UV-Vis a una longitud de onda de 272 nm. Por otro lado, se determinó el valor de pH de las fases acuosas antes y después del proceso de extracción.
La concentración del principio activo en la fase orgánica se determinó por diferencia de concentraciones al inicio y final del proceso de extracción, tal y como se indica en la siguiente ecuación (1)

$$[IBP]_{org} = [IBP]_{inicial} - [IBP]_{final} \quad (1)$$

Desextracción
En el proceso de desextracción del fármaco, a partir de la fase orgánica, se llevó a cabo el mismo procedimiento anteriormente descrito pero usando como fase acuosa NaOH a $1x10^{-3}M$ y $1x10^{-4}M$.

RESULTADOS

Con la finalidad de establecer un método de cuantificación adecuado para el principio activo, se procedió a realizar pruebas de solubilidad, el espectro de absorción, así como, la obtención de la curva de calibración que cumpliera con la ley de Beer-Lambert. Las pruebas de solubilidad se

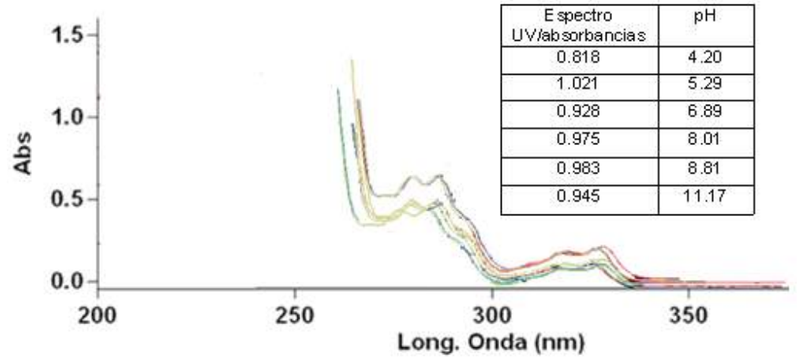
llevaron a cabo utilizando HCl e NaOH a diferentes concentraciones. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 1.

Tabla. 1. Prueba de solubilidad

Ajustando con	pH	Solubilidad (si/no)
1x10^{-2} M HCl	1.90	No
1x10^{-3} M HCl	2.92	No
1x10^{-4} M HCl	3.95	Si
1x10 $^{-4}$ M NaOH	9.96	Si
1x10 $^{-3}$ M NaOH	11.20	Si
1x10^{-2} M NaOH	12.23	Si

Como es posible observar el fármaco fue soluble a utilizando como disolvente HCl 1 x 10^{-4} M y NaOH a 1 x 10^{-2} – 1 x 10^{-4} M. Es decir, el naproxeno es soluble a valores de pH cercanos o mayores al valor de su pKa (4.82).

Posteriormente, se obtuvo el espectro UV-Vis del naproxeno a diferentes valores de pH (de acuerdo a la concentración de HCl o NaOH) (ver Figura 1).



Espectro UV/absorbancias	pH
0.818	4.20
1.021	5.29
0.928	6.89
0.975	8.01
0.983	8.81
0.945	11.17

Figura. 1. Espectros UV-Vis del naproxeno a diferentes valores de pH.

En la figura 1, como se puede observar, todos los espectros tienen un pico en común localizado a 272nm, esto debido a que el pico más significativo del naproxeno se da a ésta longitud de onda y la cual corresponde a una transición del tipo $\pi \rightarrow \pi^*$. Las absorbancias variaban según aumentaba el valor de pH, lo cual habla de un efecto hipsocrómico.

Establecida la señal analítica a la cual se obtiene el mayor pico de absorbancia, se procedió a la determinación del intervalo de concentraciones en donde se obedezca la Ley de Beer-Lambert. Las concentraciones probadas fueron de 10 ppm a 50 ppm. Las Figuras 2 - 7 muestras las curvas de calibración obtenidas para cada uno de los valores de pH trabajados.

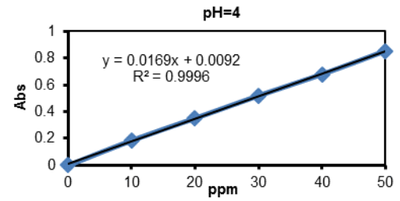


Figura. 2. Curva de calibración extracción con 1x10^{-4} M HCl

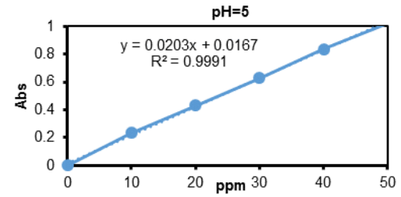


Figura. 3. Curva de calibración de la extracción con 1x10^{-5} M NaOH

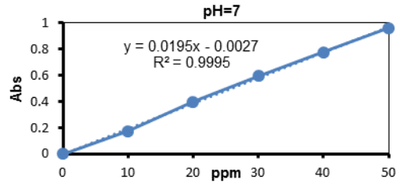


Figura. 4. Curva de calibración de la extracción con 1x10^{-4}M NaOH

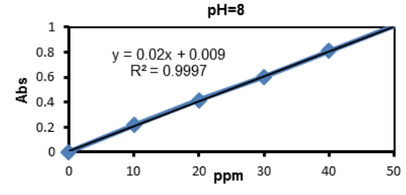


Figura. 5. Curva de calibración de la extracción con 1x10^{-3}M NaOH

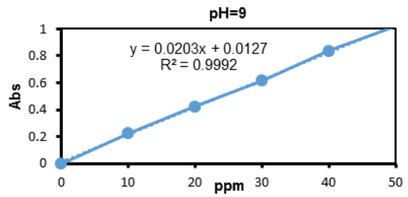


Figura. 6. Curva de calibración de la extracción con 0.0005M NaOH

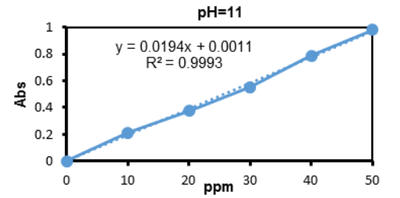


Figura. 7. Curva de calibración de la desextracción con 1x10^{-3}M NaOH

Para cada curva de calibración se puede observar que la absorbancia varía directamente proporcional con la concentración de naproxeno, cumpliéndose de esta manera la Ley de Beer-Lambert. Se obtuvo la ecuación de la recta en cada curva y el coeficiente de relación varió solo de 0.9991-0.9997, lo cual nos hable de un buen ajuste lineal.

Así, se continuó con la realización de los estudios de extracción líquido-líquido. Las figuras 8 y 9 muestran los resultados obtenidos tanto para dodecano como para el aceite de soya.

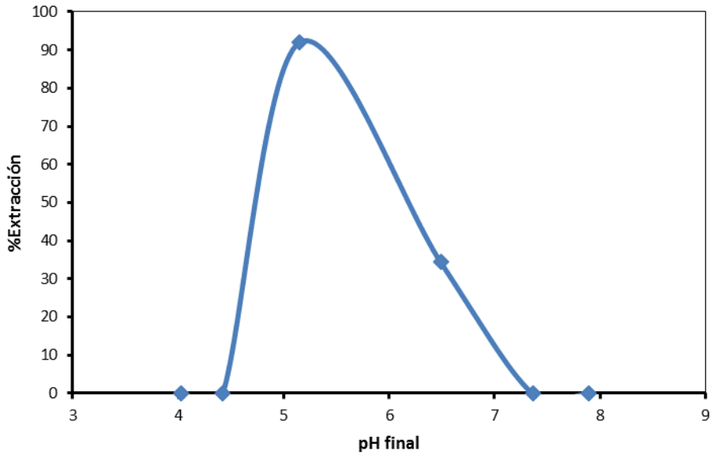


Figura. 8. Gráfica del porcentaje de extracción con dodecano.

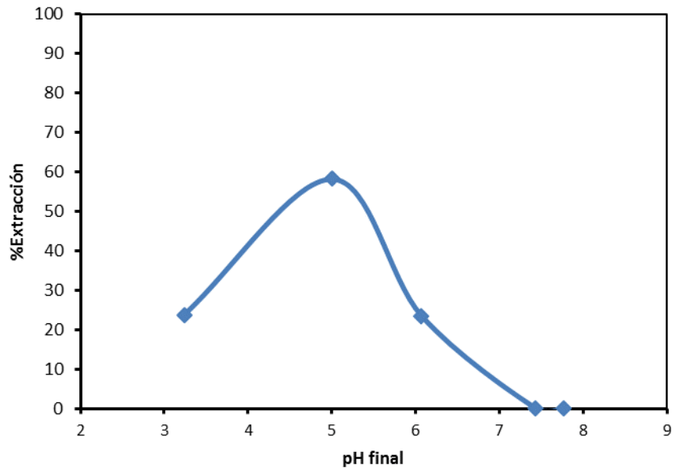


Figura. 9. Gráfico del porcentaje de extracción con aceite de soya.

Los resultados muestran que los porcentajes de extracción más altos con valores del 92% y 58% para dodecano y aceite de soya, respectivamente, fueron obtenidos a valores de pH 5. Mientras que los mayores porcentajes de desextracción (aproximadamente del 58%) se obtuvieron utilizando como fase de despojo NaOH 1 x 10^{-3} M.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos de este proyecto muestran que el naproxeno fue soluble en soluciones acuosas a valores de pH 4 – 12. Se logró determinar la longitud de onda (nm) óptima para la cuantificación del fármaco, siendo ésta de 272 nm, así como, establecer el intervalo de concentraciones adecuado en donde se cumplió la Ley de Beer-Lambert. Con lo anterior, fue posible establecer el método analítico adecuado para una correcta cuantificación del principio activo mediante la técnica de Espectroscopía UV-Vis.

Por otro lado, resultados preliminares muestran que a valores de pH 5 los mayores porcentajes de extracción (92% y 58%) fueron obtenidos, tanto para dodecano como para aceite de soya, respectivamente. Sin embargo, resulta importante continuar con este estudio con la finalidad de aumentar la eficiencia del proceso de extracción. Lo anterior, variando la composición de la fase orgánica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Pal A, Gin KY-H, Lin AY-C, Reinhard M. Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: Review of recent occurrences, sources, fate and effects. Sci Total Environ. 2010;408:6062-9.
2. Stuart M, Lapworth D, Crane E, Hart A. Review of risk from potential emerging contaminants in UK groundwater. Sci Total Environ. 2012;416:1-21.
3. Meffe R, Bustamante Id. Emerging organic contaminants in surface water and groundwater: a first overview of the situation in Italy. Sci Total Environ. 2014;481:280 - 95.
4. Li WC. Occurence, sources, and fate fo pharmaceuticals in aquatic environment and soil. Environ Pollut. 2014;187:193 - 201.
5. Sires I, Brillas E. Remediation of water pollution caused by pharmaceutical residues based on electrochemical separation and degradation technologies: a review. *Environ Int*. 2012;40:212-29.
6. Owa FD. Water pollution: sources, effects, control and management. Mediterr J Soc Sci. 2013;4(8):65-8.
7. Comeau F, Surette C, Brun GL, Losier R. The occurrence of acidic drugs and caffeine in sewage effluents and receiving waters from three coastal watersheds in Atlantic Canada. *Sci Total Environ*. 2008;396:132-46

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Guanajuato, el departamento de Química por darme la oportunidad de hacer mi estancia de verano en su laboratorio, a la Dra. Razo por aceptarme en éste proyecto y permitirme aprender más sobre su trabajo. A la Universidad Autónoma de Coahuila y al Verano Regional por el apoyo económico sin el cual no habría podido hacer mi estancia.

RESCATE DE CONSUMO DE FLOR DE PALMA (*Yucca filifera Chabaud*) Y GENERACIÓN DE VALOR AGREGADO

Delgado-Reyes, José David[1] y Feregrino-Pérez, Ana Angélica[2]

RESUMEN

En México, la flor de palma es consumida comúnmente en los platillos tradicionales, sin embargo no existen reportes sobre sus características como alimento funcional. En esta investigación se estudió el contenido de compuestos fenólicos, obteniendo valores de 189.347 ± 5.7169 (mg AG/g); de azucares totales: rafinosa, glucosa, sacarosa y fructosa (30.6013 ± 0.72679, 28.6721 ± 0.68832, 26.7648 ± 0.67245 y 26.4411± 0.66301 mg/g), respectivamente. El contenido de fibra dietaría total (soluble e insoluble), de 0.877400 ± 0.00190 g. Se obtuvo el porcentaje de actividad inhibitoria de las enzimas alfa amilasa 40.79% y alfa glucosidasa 176.87%. Con base en estos resultados, se puede recomendar el consumo de flores de *Yucca filifera Chabaud* como un alimento funcional.

ABSTRACT

In Mexico, the flower palm is commonly consumed in traditional dishes, however there are no reports on its characteristics as a functional food. In this research the content of phenolic compounds was studied, obtained values 189.347 ± 5.7169 (mg AG/g); of total sugars: raffinose, glucose, sucrose and fructose was 30.6013 ± 0.72679, 28.6721 ± 0.68832, 26.7648 ± 0.67245 y 26.4411± 0.66301 (mg/g), respectively. The total dietary fiber (soluble and insoluble) was 0.877400 ± 0.00190 g. The percentage of inhibitory activity of the enzymes was obtained: alpha-amylase 40.79% and alpha-glucosidase 176.87%. The consumption of *Yucca filifera Chabaud* flowers is recommended as a functional food, based on the results.

Palabras clave: *Yucca filifera Chabaud* Izote α-amilasa α-glucosidasa

INTRODUCCIÓN

De la familia Agavácea se han estudiado las especies en busca de sustancias de naturaleza esteroidal. En todas las especies se encontraron rendimientos variables de saponinas pero las del genero *Yucca* son las que tienen mayores concentraciones. Con antecedentes de gran interés científico y económico se han realizado estudios detallados del contenido esteroidal de *Yucca filifera Chabaud*, por contener una mezcla de saponinas denominadas filiferina A y B en la que la principal es la filiferina B, que por hidrolisis proporciona sarsasapogenina, galactosa y xilosa. (Romo de vivar, A. *et al* 2006). Otras investigaciones reportan un tamizaje fitoquímico del género *Yucca*, la parte utilizada de la planta es la inflorescencia y dentro de los componentes que presentan son flavonoides y antocianinas CCF. (Cáceres-Estrada, A. 2009). La finalidad de la presente investigación es aportar información acerca de la flor de palma y sus componentes, y ayudar a promover el retorno a la diversidad de patrones dietéticos de alimentos tradicionales en la población, esto debido a que la flor de palma es una planta que abunda en nuestro país, atribuyéndole algunos efectos buenos en la salud. La realización de pruebas para determinar el contenido de azucares totales es importante para reportar un alimento como idóneo para el consumo de calidad a personas con ciertas enfermedades, llevar un control para evitar factores de riesgo por exceso,

[1] Universidad Autónoma de Zacatecas, Campus Universitario U.A.Z. Siglo XXI, Unidad Académica de Ciencias Químicas; Km 6 carretera Zacatecas-Guadalajara S/N, Ejido la Escondida, C.P. 98160, Zacatecas, Zac. jd2r.delgadoreyes@hotmail.com.
[2] Universidad Autónoma de Querétaro, Campus Aeropuerto. Facultad de Ingeniería; Carretera a Chichemequillas, Ejido Bolaños, C.P. 76140, Querétaro, Qro. feregrino.angge@hotmail.com.

además de su importancia en la tecnología de alimentos (Steiner, G. *et al* 1998). Los fenoles nos presentan una amplia ubicuidad de la relación entre el hombre y el buen funcionamiento de la planta, son utilizados para tratar desordenes cardiovasculares y algunos canceres por que ejercen actividad antioxidante (Gracia-Nava, M.A. 2007). Mientras que el interés de la fibra dietética (FD) radica en estudios epidemiológicos que enuncian la hipótesis de que la deficiencia de FD se asocia a la existencia de una serie de enfermedades como constipación, diabetes, cáncer de colon, obesidad y enfermedades cardiovasculares (Burkitt, D.P. *et al* 1974).

Por otra parte la actividad inhibitoria de α-amilasa y α-glucosidasa tienen un papel importante en la diabetes tipo 2 que se caracteriza por aumentar rápidamente los niveles de glucosa en la sangre esto asociado a la hidrolisis del almidón por α-amilasa pancreática y la absorción de glucosa en el intestino delgado por la α-glucosidasa. (Worthington, V. 1993). Estas últimas enzimas pueden ser controladas mediante su inhibición en la digestión de carbohidratos. Por lo tanto el objetivo es determinar actividad inhibitoria de la flor de *Yucca* para estas enzimas y proporcionar información de los constituyentes de esta para tratar de incorporarla dentro de la dieta de la población.

MARCO TEORICO

Yucca filifera Chabaud, también conocida como palma, izote, palma china es una planta arborescente perteneciente a la familia de las agaváceas, mide de 3 a 10 cm de alto con cerca de 100 hojas, lanceoladas o falcadas, rígidas, coriáceas, lisas de color verde oscuro; márgenes rectos, filíferos, grises; ápice agudo; espina terminal deltoide, cilíndrica dorsalmente y plana ventralmente, de color gris o café rojizo. Inflorescencia paniculada, densa, de 0.7 a 1.5 m, péndula; brácteas de la inflorescencia lanceoladas, de cartáceas a papiráceas, quebradizas, de color blanquecino o beige.

Flores de 3 a 4 cm de largo, de blancas a color crema, pendiceladas: tépalos elípticos, los externos más angostos que los internos, curveados hacia adentro. Los frutos son una bayas oblongas de 65 a 6 cm de largo y de 1 a 3 cm de ancho, en color verde o café. Semillas semicirculares u ovoides, engrosadas, rugosas, de color negro opaco. Las flores son usadas para consumo humano, guisadas, los frutos son comestibles como “dátiles” además de servir de ornamento urbano. La floración se inicia a mediados de abril y termina a finales del mes de junio, pudiéndose presentar floraciones tardías en julio y agosto dependiendo de las precipitaciones y heladas y fructifica de Junio a Septiembre.

En la industria alimentaria la *Yucca* es utilizada por su capacidad para hacer espuma en la fabricación de cerveza. (Martínez y Díaz de Salas, M. 2015). *Y. filifera* es una especie que crece abundantemente distribuida en las zonas semiáridas del centro y norte de México en forma silvestre. Se distribuye en un área de 840,000 ha. potencialmente explotables que abarcan los estados de Coahuila, Nuevo León, Zacatecas, San Luis Potosí, Tamaulipas, Guanajuato, Querétaro, Hidalgo, Michoacán y México con una densidad media de 100 plantas por hectárea. Las *Yuccas* tienen la capacidad de reproducirse sexualmente, por semillas y vegetativamente por brotes en el mismo árbol. (Piña, LI. 1974).

Culturas como la mexica, maya, mixteca y zapoteca: sin importar cuales fueron sus orígenes y tradiciones se caracterizaban por tener en común el gusto por consumir flores, dentro de sus favoritas se encuentra la flor de palma, teniendo un papel muy importante en el complemento dentro de su dieta diaria, además de tener uso medicinal desde la época prehispánica. Debemos fomentar el rescate, conservación y difusión del gran patrimonio gastronómico de nuestro país, estudiando las propiedades de las plantas consumidas en la antigüedad logrando recuperar las tradiciones alimenticias de las diferentes culturas, contribuyendo a la mejora de la apariencia estética de los alimentos, pero lo más importante relacionarlas con sustancias biológicamente activas para mejorar el aporte nutrimental (Lara-Cortés, E. *et al* 2013).

METODOS Y MATERIALES

Muestra *Yucca filifera Chabaud*
La parte utilizada de la planta fue la flor de la palma, el área de recolección se realizó en el Centro Universitario U.A.Q. (20°35'33.8"N 100°24'45.4"W), fue congelada con nitrógeno líquido y posteriormente liofilizada.

Extracción de compuestos Fenólicos (Cardador-Martinez *et al.*, 2002)
Pesar 200 mg de muestra seca o 1 g congelada, adicionar 10 ml de metanol y dejar en agitación durante 24 hrs. protegiéndolo de la luz. Después centrifugar a 5000 rmp, 10 min a 4°C. Decantar o si es necesario filtrar.

Determinación de Fenoles totales (Waterhouse, A. L. 2002)
Se preparó una curva de calibración de 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 y 160 µl de ácido gálico a una concentración de 0.1 mg/ml, así como agua destilada 500, 480, 460,440, 420, 400, 380, 360 y 340 µl respectivamente, se adicionaron 250 µl de folin al 80% y 1250 µl de Na_2CO_3 al 20%. Para las muestras se utilizó 40 µl del extracto metanólico con 460 µl de agua destilada, 250 µl de folin, 1250 µl de Na_2CO_3 al 20%, agitar en vortex, reposar 2 horas en la obscuridad, transcurrido el tiempo colocar 200 µl en cada poso de una placa por triplicado y leer a 760 nm en un espectrofotómetro (MULTISKAN GO Thermo scientific AccesoLab).

Fibra total (Pak, N., 1997)
La obtención de fibra se realizó por la técnica enzimática utilizando 1 g de muestra, adicionando las enzimas que asemejan el proceso digestivo de manera in vitro, 0.1 ml de α-amilasa en 50 ml de buffer de fosfatos 0.008 M pH 6 a baño maría 30 min. Con agitación cada 5 min. Ajustar a pH 7.5, agregar 0.1 ml de proteasa, colocar a baño maría 30 min. a 60 ° C con agitación. Ajustar a pH 4 – 4.6, agregar 0.3 aminoglucosidasa, colocar a baño maría 30 min. a 60 °C con agitación. Centrifugar a 9500 g 20 min. Obteniendo así la fibra insoluble, el sobrenadante agregar etanol 78% 1-4 volumen para obtener la fibra soluble.

Extracto Inhibición α-amilasa (Worthington, V. 1993)
Pesar 5 g de muestra congelada, adicionamos 5 ml de buffer de fosfato de sodio 20 Mm con cloruro de sodio 6.7 mM a pH 6.9 a 20° C. Agitar por 30 min y centrifugar a 8000 rpm, 10 min a 4°C.

Inhibición α-amilasa (Worthington, V. 1993)
Se realizó una curva de calibración utilizando estándar de maltosa 0.2% en cantidades de 0.05, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 y 2.0 ml con agua destilada 1.95, 1.80, 1.6, 1.4, 1.2, 1.0 ml respectivamente. Se adiciona 1 ml de agente de color. El blanco utilizado fue 2.0 ml de agua destilada y 1 ml de agente de color. Se colocó en un baño a ebullición 15 min. y posteriormente en baño de hielo realizando las lecturas a 540 nm con celdas de cuarzo. Posteriormente realizar una dilución 2 ml de agua destilada y 1 ml de cada concentración de la curva y leer a 540 nm. Para la muestra se utilizó un blanco, control 1, control 2 y muestra. Adicionándole α-amilasa 0, 1, 0 y 1 ml; y 1.5, 0.5, 1.0 y 0 ml. de buffer de fosfato sódico 20 mM pH 6.9 Por último del extracto preparado se le agrego al control 2 y a la muestra 0.5 ml. Se incubo a 25 °C 15 min. Adicionando 0.5 ml de almidón 1% a todos los tubos, incubando a 37 °C, 10 min. Se adiciona agente de color y se calienta en agua hirviendo durante 15 min. Posteriormente enfriamos en hielo y agregamos 9 ml de agua destilada, mezclar y leer a 540 nm. Hacer la dilución 1:2 y leer nuevamente a la misma longitud de onda, utilizado celdas de cuarzo. La actividad inhibitoria se calculó con la siguiente fórmula:

$$((a-(c-b))/a)*100 \quad (1)$$

Dónde: a= Actividad amniolítica desinhibida (a) Control 1
b= Actividad amniolítica endógena (b) Control 2
c= Actividad Amniolítica inhibida (c) Muestra

Extracto Inhibición α-glucosidasa (Ranilla, LG *et al.*, 2010)
Pesar 5 g de muestra seca con 100 ml de agua destilada y se calentar a reflujo a 95 °C 30 min. Enfriar, filtrar con papel filtro Whatman No. 2 y aforar a 100 ml con agua destilada. Se ajustó el pH a 6-8 y se centrifugo a 9300 g 30 min. Antes de cada ensayo se tomó una alícuota del sobrenadante y se centrifugo a 3000 rpm 10 min.

Inhibición α-glucosidasa (Ranilla, LG *et al.*, 2010)
Una versión modificada del ensayo descrito en Worthington Enzyme Manual (Worthington Biochemical Corp., 1993; McCue et al., 2005). Un volumen de 50 µl de extracto de la muestra, diluido con 50 µl de buffer de fosfato de potasio 0.1 M pH 6.9, y 100 µl de una solución de buffer de fosfato de potasio que contiene α-glucosidasa (1.0 U/ml). Se incubo en una placa de 96 pocillos a 25 °C, 10 min. Después de la pre incubación se añadió 50 µl de solución de p-nitrofenil-α-D-glucopiranósido 5 mM en el mismo buffer, a cada pocillo. Incubar a 25 °C, 5 min. antes y después de la incubación registrar lecturas de A a 405 nm en el MULTISKAN GO Thermo scientific AccesoLab. El control contenía 50 µl de buffer de fosfatos de potasio. La actividad de α-glucosidasa se expresó como:

$$\%\ de\ inhibicion = \left(\frac{\Delta\ A405\ muestra - \Delta\ A405\ control}{\Delta\ A405\ control}\right) * 100 \quad (2)$$

Azucares Totales (Miller G.L., 1959)
La curva de estándares de azúcar se preparó con una serie de soluciones de fructuosa, sacarosa, glucosa y rafinosa a concentraciones de 0.1, 0.5, 0.025 y 0.0125, adicionando 25 µl de fenol al 80% y 2.5 ml de H_2SO_4 concentrado agitar, dejar reposar 10 min. Poner a baño maría 15 min a 25-30 °C. Para las muestras se pesó 0.010 g de muestra para extraer con 10 ml de Etanol al 80%, agitar 5 min y centrifugar 5 min a 5000 rpm. Para su determinación al sobrenadante (2ml) se le adicionaron los reactivos previamente descrito. Se leyeron en espectro a 490 nm con celdas de cuarzo, frente a un blanco de etanol al 80%, adicionando fenol y el ácido 25 µl y 2.5 ml respectivamente. Se comparó contra curva estándar de calibración.

RESULTADOS

Los resultados de la Tabla 1, muestran el contenido de fenoles totales en el extracto metanólico de flor de *Yucca* liofilizada 189.34797.631 ± 5.71699.8634 mg equivalentes de Acido gálico/g de muestra seca, conteniendo compuestos fenólicos en cantidades significativas, por lo tanto la concentración de compuestos fenólicos puede estar asociada a la actividad antioxidante. El análisis de azucares totales en la tabla 1, indica que la flor de palma contiene una mayor proporción de rafinosa seguido de la glucosa, sacarosa y fructosa (30.6013 ± 0.72679, 28.6721 ± 0.68832, 26.7648 ± 0.67245 y 26.4411± 0.66301, respectivamente. Aunado a lo anterior, los productos o alimentos que contienen fibra son una buena opción para diversas patologías. Este estudio además señala como una buena fuente de fibra dietética a la flor de palma, reportando 0.877400 ± 0.00190 g de fibra total/g de muestra. Los valores del análisis de componentes de fibra dietética (fibra soluble e insoluble) se reportan en la tabla 2. Como se ha mencionado anteriormente la α-amilasa y la α-glucosidasa son enzimas que sufren modificaciones en el proceso de diabetes. La tabla 3 indica los porcentajes de la actividad inhibitoria generada por la flor de palma.

Tabla 1. Cuantificación de compuestos fenólicos totales y Azúcares totales en términos de masa de flor seca de Yucca

Muestra	Compuestos fenólicos (mg/g)	Azucares Totales (mg/g)			
		Fructuosa	Sacarosa	Glucosa	Rafinosa
Yucca filifera Chabaud	189.347 ± 5.7169	26.4411± 0.66301	26.7648 ± 0.67245	28.6721 ± 0.68832	30.6013 ± 0.72679

Tabla 2. Contenido de fibra dietética

Muestra	Fibra soluble (g)	Fibra insoluble (g)	Fibra total (g)
Yucca filifera Chabaud	0.068600 ± 0.00790	0.808800 ± 0.00980	0.877400 ± 0.00190

Tabla 3. Porcentaje de actividad inhibitoria de enzimas relacionadas con el proceso de diabetes

Muestra	α-amilasa	α-glucosidasa
Yucca filifera Chabaud	40.79% 176.87%	176.87%

DISCUSIÓN

Los compuestos fenólicos son considerados un sostén en uso medicinal y farmacológico de diferentes plantas. La flor de palma presenta mayor cantidad de compuestos fenólicos totales que los reportados para otras flores comestibles como los pétalos de flor de colorín 133.65 ± 1.51, mg Eq. AG/g muestra (Bata García, L.L., 2015), en flores de dalia color purpura 127.5 mg AG·g-1 (Lara-Cortes, E. *et al.,* 2014), considerando así una importante fuente sobre otras de compuestos fenólicos y estas sustancias están relacionadas con propiedades que evitan la oxidación. En la actualidad existen medicamentos como la acarbosa, utilizado para el tratamiento de Diabetes Mellitus tipo II y tiene como mecanismo de acción inhibir enzimas, como α-glucosidasa principalmente a nivel intestinal y la α-amilasa, enzima salival o pancreática que tiene un papel importante en la ruptura temprana de carbohidratos complejos a moléculas simples, al inhibir estas enzimas se retarda la digestión de carbohidratos y reducir la velocidad de absorción de glucosa, y consecuentemente disminuir los niveles de glucosa postprandial en sangre, fenómeno responsable de las complicaciones de la Diabetes Mellitus tipo II. La flor de palma (*Yucca filifera Chabaud)* mostró un porcentaje de actividad inhibitoria de α-amilasa del 40.79%, un porcentaje inferior al reportado para la acarbosa (82%) y 176.87% de actividad inhibitoria para α-glucosidasa. Existen otras especies que reportan actividad inhibitoria sobre la α-amilasa y α-glucosidasa como, la canela (Cinnamomum zeylanicum), comino (Cuminumc y minum), orégano (Origanum vulgare), pimienta negra (Piper nigrum) y clavo (Eugenia caryophyllus) especies ya estudiadas y que poseen un porcentaje de inhibición hacia la actividad de la α-amilasa que oscila de 0-50%. Es posible por tanto, que esta flor pueda ser estudiada más en profundidad porque tiene un potencial como aditivo alimenticio.

CONCLUSIONES

Este estudio muestra que la flor de palma *(Yucca filifera Chabaud),* reporta un alto contenido de compuestos fenólicos y actividad inhibitoria de enzimas relacionadas directamente con la Diabetes Mellitus tipo II consumida tradicionalmente en platillos de la cocina mexicana. La ADA (American Diabetes Association) y diversos estudios, resaltan la importancia de un tratamiento integral, para lograr con éxito un control adecuado de la enfermedad. Éste tratamiento deberá incluir además de fármacos, terapia nutricional médica (revisar ingesta de carbohidratos y alimentos benéficos), cambios en el estilo de vida (pérdida de peso, actividad física) y asistencia psicosocial.

BIBLIOGRAFÍA

ROMO DE VIVAR-ROMO, A. (2006). *Química de la flora mexicana. Investigaciones en el Instituto de Química UNAM*, México: UNAM.

CÁCERES-ESTRADA, A. (2009). "Actividad antioxidante de diez especies nativas, como posibles preservantes de alimentos y fuente para el desarrollo de nutriceuticos" en *Foro Nacional de Ciencia y Tecnología* consultada en http://glifos.concyt.gob.gt/digital/fodecyt/fodecyt%202007.28.pdf (fecha de consulta 28-06-2016).

STEINER, G. *et al*. (1998). Análisis de los Alimentos. Fundamentos Métodos y Aplicaciones, Paris: Ed. Lavoisier.

GRACIA-NAVA, M.A. (2007) "Cuantificación de fenoles y flavonoides totales en extractos naturales" en *Noveno Verano de la Ciencia de la Región Centro 2007 U.A.Q.* No. 58, pp 1-4. Consultada en http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-2007/ (fecha de consulta 28-06-2016).

BURKITT, D.P.; WALKER, A.R.P. AND PAINTER, J.N.S. (1974). "Dietary fiber and disease" en Bulletin of the New York Academy of Medicine, Num. 58, Vol. 3. April, [pp. 230-241].

MARTÍNEZ Y DÍAZ DE SALAS, M. (2015). *Plantas nativas y naturalizadas en Querétaro*, Querétaro: Editorial Universitaria.

PIÑA, LI. (1974). *Aspectos sobre las plantas del género Yucca*, México: CIQA, CONAZA Y CONACYT.

LARA-CORTÉS, E. *et al*. (2013). "Contenido nutricional, propiedades funcionales y conservación de flores comestibles" en *Archivos Latinoamericanos De Nutrición*, Num. 3, Vol. 63, [pp. 197-208].

CARDADOR-MARTÍNEZ, A., Loarca-Piña, G., & Oomah, B. D. (2002). "Antioxidant Activity in Common Beans (Phaseolus vulgaris L.)" en *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(24), [6975-6980].

Waterhouse, A. L. (2002). "Determination of total phenolics". Current protocols in food analytical chemistry.

PAK, N. (1997). Análisis de fibra dietética en *Moron C*. Producción y manejo de datos de composición química de alimentos en nutrición (pp. 177-188) Santiago de Chile: FAO. Dirección de Alimentación y Nutrición.

WORTHINGTON, V. (1993). *Worthington Enzyme Manual: Enzymes and Related Biochemicals*, New Jersey: Worthington Biochemical Corporation Editorial.

RANILLA, LG. *et al* (2010). "Phenolic compounds, antioxidant activity and in vitro inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America" en *Bioresource Technology* Num. 101, Vol. 12, Junio, [4676-4689].

MILLER G.L. (1959). "Use of dinitrosalicylic reagent for determination of reducing sugar" en *Analytic Chemistry,* Num. 31, Vol. 3, Marzo, [pp. 426-428].

LARA-CORTES, E. *et al.* (2014). "Actividad antioxidante, composición nutrimental y funcional de flores comestibles de dalia" en *Rev. Chapingo Ser.Hortic,* Num. 1, Vol. 20, Enero – Abril, [pp. 101-116].

BATA GARCÍA, L.L. (2015) Efecto de la actividad antimicrobiana de los extractos de flor de colorín (*Erythrina americana Miller*) sobre cepas de *Escherichia coli, Salmonella typhimurium, Streptococcus mutans y Staphylococcus aureus*. (Tesis de grado) Universidad Autónoma de Querétaro, Santiago de Querétaro, Qro.

SEVILLA-ASENCIO, O.A. *et al*. (2013) "Actividad inhibitoria sobre α-Glucosidasa y α-amilasa de extractos acuosos de algunas especies utilizadas en la cocina mexicana" en *CienciaUAT*. 26(2): Jul-Dic, [pp.42-47].

LISTADO PROSPECTIVO DE LA AVIFAUNA EN LA COMUNIDAD EL GARBANZO IRAPUATO, GUANAJUATO, MÉXICO

Carlos Díaz Quintero[1] y Efrén Martín Hernández Navarro[2]

RESUMEN

Se presenta un listado de las aves que de localizan en el Garbanzo perteneciente a la zona noreste del Municipio de Irapuato, Guanajuato. Se obtuvieron datos de 32 aves mediante observación y capturas distribuidas en 8 órdenes y 13 familias. Se muestra además un análisis de las especies registradas para conocer su estatus de conservación según Normas Oficiales Mexicanas CI, así como su distribución, con la finalidad de aportar información para posteriores investigaciones de la zona estudiada.

ABSTRACT

A list of birds that can be located in el Garbanzo, which is located in the northeastern part of the municipality of Irapuato, Guanajuato, is presented. data of 32 birds were obtained by observation and catches in 9 orders and 20 families. an analysis of the recorded species to meet their conservation status as Official Mexican Standards is shown, as well as their distribution, in order to provide information for further research in the study area.

Palabras clave: Aves, noreste Irapuato, observación, captura.

INTRODUCCIÓN

Con el catorceavo lugar a nivel mundial en extensión territorial (Espinosa et al 2008), México posee un total aproximado de 5667 especies de animales superiores de los cuales: entre 1123 y 1150 corresponde a las aves (Navarro-Singüenza et al. 2014). Esta cifra aunada al número total de especies superiores en plantas y animales posiciona al país según datos de la CONABIO en el quinto lugar de los países megadiversos.

En México se presentan casi todos los climas del planeta, lo que aunado a su accidentada topografía y compleja geología permite que se desarrollen prácticamente todos los ecosistemas terrestres presentes en el mundo, concentrados en poco menos de dos millones de kilómetros cuadrados. (Sarukhán J. et al 2009).

La presencia de las especies de aves está estrechamente relacionada con la condición de sus hábitats, pues muchas son sensibles a cambios mínimos en ellos, por lo cual se les considera como buenos indicadores de perturbación (Navarro Sigüenza et al, 2014). El 77% de las especies de aves se reproducen en México y la mayor parte son especies residentes permanentes, seguidas en número por las visitantes de invierno y las migratorias de paso. Un total de entre 194 y 212 especies se encuentran en alguna categoría de endemismo en México, lo que representa aproximadamente entre el 18 y 20% del total de especies registrado en el país y entre 298 y 388 especies (26-33%) de la avifauna mexicana se encuentra en alguna categoría de amenaza de acuerdo a autoridades nacionales o internacionales. (Navarro – Sigüenza et al, 2014).

[1] Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. División de Agronomía, Departamento de Botánica, Calzada Antonio Narro 1923. Ex hacienda de Buenavista, 25084, Saltillo, Coahuila de Zaragoza. carlos-slpaz@hotmail.com
[2] Instituto Tecnológico Superior de Irapuato. Licenciatura en Biología. Estación Biológica. Carretera Irapuato-Silao Km. 12.5, 36821. Irapuato, Guanajuato. efrenbiologia@gmail.com

El estado de Guanajuato presenta en el total de 38 peces, 25 anfibios, 81 reptiles, 366 aves y 87 mamíferos (CONABIO, 2012) distribuidos en sus 30 mil 607 km2 por lo que es considerado un estado con diversidad de vertebrados intermedia comparada con otros estados del país. (Escobedo et al 2015). La biodiversidad del Estado de manera general ha sido poco estudiada (Escobedo et al 2015), sin embargo, se conocen algunos datos gracias a los esfuerzos que actualmente se realizan, para el caso de las aves a la entidad posee 366 especies, las cuales representan el 34.04% de la diversidad nacional, dentro de 20 órdenes y 61 familias, de esas últimas las que se agrupan en mayor número son Tyrannidea, (33), Parulidae (34) y Emberizidae (29), donde el 65% de estas aves se encuentran permanentemente en el Estado mientras que el resto es decir el 35% son migratorias de invierno principalmente (CONABIO, 2012). En el estudio de Estado que actualmente se encuentra disponible se considera como el número de especies residentes de 240 (57%) y 126 migratorias (30%). No hay especies endémicas exclusivas para la entidad, pero dentro de su territorio y comparado con otros estados vecinos presenta 48 especies

En Guanajuato se ha obtenido poca información de naturaleza particularmente parcial (informes sin mucho detalle) y temporal (no son continuos en tiempo), además de una variedad de datos no ha sido publicada o reportada adecuadamente, lo que hace difícil su accesibilidad (CONABIO 2012). Es por ello que se busca conocer aspectos fundamentales de las mismas, especialmente en las zonas que han sido mayormente impactadas con actividades antropogénicas para poder tomar acciones y concientizar a la población de la importancia de las aves en su hábitat; pues resulta muy importante comprender la relación entre los ecosistemas que se presentan en las regiones más deterioradas y los grupos de aves, para este caso, y conocer también cómo, aún a pesar de lo reducido del hábitat, estas mismas siguen viviendo y migrando a través de estas zonas comprendidas entre dos grandes regiones de las que forma parte el municipio de Irapuato, Guanajuato.

MÉTODOS Y MATERIALES

La comunidad El Garbanzo, se localiza en el municipio de Irapuato, Guanajuato; con un total de 121 habitantes (INEGI, 2010) es una zona rural que limita con el municipio de Salamanca, los datos de localización del sitio levantados para el muestreo lo ubican en las coordenadas N 20° 48’ 16.9’’ y W 101° 10’ 10.0’’ con una elevación de 2098 msnm. Se localiza en la franja que divide la región fisiográfica 44 y 51 según la CONABIO en sus mapas de regionalización fisiográfica. Se analizaron datos del sitio presentándose las siguientes características en general para la zona de las regiones que comprende el noreste del municipio; Planicies de 1000 a 2000m, predominan el suelo Feozem livuco, el clima es de tipo (A)C(wo): templado, subhúmedo, temperatura media anual templada para la región 44 y semicálida para la Región 51, entre los -3°C y 18°C, la temperada del mes más caliente bajo 22°C; Precipitación media anual es de 600 a 800 mm. Predomina la vegetación secundaria arbustiva, bosque de encino a partir de los 2000msnm y selva baja subcaducifolia debajo de este rango; así como los pastizales inducidos y las tierras de agricultura de temporal (INEGI, 2010).

Se obtuvieron algunos datos de las especies vegetales presentes en el sitio denominado La Laguna perteneciente al poblado el Garbanzo, teniendo un registro de 11 familias siendo la más abundante la familia Cactaceae con 5 especies, se localizaron especies correspondientes a la literatura previamente consultada con las familias Fabaceae, Fagaceae, Burseraceae y Convolvulaceae, Siendo todas ellas de gran importancia al proveer refugio y alimento a las aves que ahí habitan. Estas corresponden a primera instancia a reductos y zonas muy aledañas del bosque de Encino, que se presenta en áreas superiores de los 1500 msnm (Rzedowski J. 2006) y por otro lado la Selva baja caducifolia presenta fragmentación severa, sin embargo, se encuentran especies de transición entre los tipos de vegetación que son el hogar de las especies encontradas. El registro de aves se llevó a cabo del 14 al 17 de junio del año 2016 comenzando los registros durante el trayecto de camino al Garbanzo, dentro de la comunidad y en La Laguna, Para el caso de las aves de llevó a cabo observación directa mediante binoculares y colocación de cuatro redes de niebla estas fueron puestas y monitoreadas el día 16 de junio con un horario de 10:30 am a 2:30 pm en los sitios más aptos para ello, entre los encinos y en lugares semiabiertos.

Se enlistan los resultados obtenidos (Figura 1) que presenta de manera sintetizada un análisis de cada especie observada o capturada, se consideran los aspectos como nombre científico y común, si es que se encuentran registros de presencia en el Estado de Guanajuato además del estatus de conservación en la NOM-059-SEMARNAT-2010, se considera también el grado de endemismo que presenta. Se enlista por categoría taxonómica de Orden con sus géneros y especies respectivos.

RESULTADOS

Se presenta el listado de aves del garbanzo, municipio de Irapuato, Guanajuato. (Figura 1)

Especie	Nombre común	Registrada para Guanajuato	Categoría en la NOM-059	Distribución
Orden Anseriformes				
Anatidae				
Anas diazii	Pato mexicano	Sí	Amenazado	Endémico
Orden Accipitriformes				
Cathartidae				
Cathartes aura	Zopilote aura	Sí	-	No endémico
Orden Columbiformes				
Columbidae				
Zenaida asiática	Paloma alas blancas	Sí	-	No endémico
Zenaid macroura	Paloma huilota	Sí	-	No endémico
Columbia inca	Tórtola cola larga	Sí	-	No endémico
Columbina passerina	Tórtola coquita	Sí	-	No endémico
Orden Coculifomes				
Cuculidae				
Geococcyx californianus	Correcaminos norteño	Sí	-	No endémico
Orden Strigiformes				
Strigidae				
Bubo virginianus	Búho cornudo	Sí	-	No endémico
Orden Apodiforme				
Trochilidae				
Cynanthus latirostris	Colibrí pico ancho	Sí	-	No endémico
Hylocharis leucotis	Zafiro orejas blancas	Sí	-	Semiendémico
Orden Piciformes				
Picidea				
Picoides scalaris	Carpintero mexicano	Sí	-	No endémico
Orden Falconifomes				
Accipitridae				
Accipiter cooperii	Gavilán de Cooper	Sí	Protección especial	No endémico
Buteo jamaincensis	Aguililla cola roja	Sí	-	No endémico
Orden Passeriformes				
Tyrannidae				
Pyrocephalus rubinus	Mosquero cardenal	Sí	-	No endémico
Corvidae				
Aphelocoma wollweberi	Chara pecho gris	Sí	-	No endémico
Corvus corax	Cuervo común	Sí	-	No endémico
Hirundinidae				
Hirundo rustica	Golondrian tijereta	Sí	-	No endémico
Aegithalidae				
Psaltiparus mimimus	Sastrecillo	Sí	-	No endémico
Trogodytidae				
Troglodytes aedon	Chivirín saltapared	Sí	-	No endémico
Thryomanes bewickii	Chivirín cola oscura	Sí	-	No endémico
Campylorhynchus brunneicapillus	Matraca del desierto	Sí	-	No endémico
Mimidae				
Toxostoma curvirostre	Cuitlacoche pico curvo	Sí	-	No endémico
Mimus polyglottos	Cenzontle norteño	Sí	-	No endémico
Ptilogonatidae				
Phainopepla nitens	Capulinero negro	Sí	-	No endémico
Thraupidae				
Piranga flava	Tángara encinera	Sí	-	No endémico
Emberizidae				
Melozone fusca	Toquí pardo	Sí	-	No endémico
Emberizidae				
Spizella atrogularis	Gorrión barba negra	Sí	-	No endémico
Cardinalidae				
Pheucticus melanocephalus	Pocogordo triguillo	Sí	-	No endémico
Passerina caerulea	Picogordo azul	Sí	-	No endémico
Icteridae				
Icterus wagleri	Bolsero de Wagler	Sí	-	No endémico
Fringillidae				
Carpodacus mexicano	Pinzón mexicano	Sí	-	No endémico
Spinus psaltria	Jilguero dominico	Sí	-	No endémico

Figura 1. El listado de las aves que fueron identificadas en el Garbanzo, Irapuato. Guanajuato.

Se logró identificar mediante uso de guías, así como identificación por medio de binoculares un total de 32 especies, divididos en 9 órdenes, y estos a su vez en 20 familias. Las observaciones se hicieron durante el día en un horario de 12:00 a 4:00 pm haciendo visitas por red cada media hora, se aprecia que el mayor número de especies perteneces al orden Passeriformes, por su parte la familia con más representantes es la Columbidae.

CONCLUSION

El conocimiento de la riqueza de la biota de un lugar es fundamental para comenzar a unir esfuerzos en pro de su conservación y manejo sustentable. Se concluye por tanto que la participación en los estudios de inventarios de vertebrados aporta información necesaria para el correcto manejo y sobre todo la conservación de los recursos de esta zona, sin embargo, el tiempo y las condiciones de trabajo imperantes en la realización de este pequeño listado aporta solo un poco de información necesaria para estudios posteriores de los vertebrados que habitan en la parte noreste del municipio de Irapuato.

BIBLIOGRAFÍA

ADW. Animal Diversity Web. Museo de Zoología. Universidad de Michigan. Disponible en animaldiversity.org/about/ Consultado el 28 – 06 - 2016.

COAPU. Club de Observadores de Aves Potosinos Universitarios. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Disponible en la web. http://evirtual.uaslp.mx/Agronomia/clubdeaves/Paginas/default.aspx Consultado el 30 - 06 – 2016.

Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad de México. Avesmx.net. La red de conocimiento sobre las aves de México. Disponible en avesmx.conabio.gob.mx Consultado el 27 – 06 - 2016.

Del Olmo L. G., 2014. Las aves del Parque Ecológico Jaguaroundi. SOLAR Ediciones. Primera edición. México. Pp. 77

Escobedo M. L., Hernández N. E., Leyte M. A. 2015. Inventario de vertebrados terrestres del Área Natural Protegida Cerro de Arandas, Irapuato, Guanajuato. ITESI e IMPLAN. México.

Espinosa O. D., Ocegueda C. S. 2008. El conocimiento biogeográfico de las especies y su regionalización natural, en Capital natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. CONABIO, México.

Espinosa-Pérez H. 2014. Biodiversidad de peces en México. Revista Mexicana de Biodiversidad. Vol. 85, Suplemento Biodiversidad de México. UNAM. México.

Flores-Villela O., García-Vázquez U. O. 2014. Biodiversidad de reptiles en México. Revista Mexicana de Biodiversidad. Vol. 85, Suplemento Biodiversidad de México. UNAM. México.

Instituto Nacional de Ecología, 1996. Guía de aves cantoras y de ornato. Conabio. México. Pp. 5.

Kaufmna K. traducción de: Patricia Manzano Fischer. 2005. Guía de campo a las aves de Norteamérica. Hillstar Editións. E. U. A. pp. 7

Labarthe H. V., 2004. Las aves de la Sierra de Santa Rosa Guanajuato. Un manual para niños. Ulyses Editor. Primera Edición. Pp. 114, 123, 131, 148, 149, 159, 160.

MacGregor-Fors Ian, 2010. Guía de Aves del Bosque de los Colomos. Un acercamiento a las aves de la Zona Metropolitana de Guadalajara. CONABIO. México. Pp. 44, 87,

Mercado R. M, 2012. Tesis: Ecología y Genética de la conservación del pato triguero Anas platyrhynchus diazi en el Altiplano Zacatecano. UANL. Universidad Autónoma de Nuevo León. México. Pp. 2.

Navarro-Singüenza A., Rebón-Gallardo Ma. F., Gordillo-Martínez, Townsend P. A., Berlanga-García H., Sánchez-Gonzáles L. A. 2014. Biodiversidad de aves en México. Revista Mexicana de Biodiversidad. Vol. 85, Suplemento Biodiversidad de México. UNAM. México.

Noruega F., Vega R. J., García A. A., Quesada A. M. 2002. Historia Natural de Chamela. UNAM. Primera Edición. México. Pp. 337 – 338.

Parra-Olea G., Flores-Villele O., Mendoza-Almeralla C. 2014. Biodiversidad de anfibios en México. Revista Mexicana de Biodiversidad. Vol. 85, Suplemento Biodiversidad de México. UNAM. México

Salas-Araiza M., Guzmán-Mendoza R., Martínez-Jaime O. A., Gonzáles-Márquez M. A. López F. A. 2015. Species richness of noctuid moths (Lepidoptera:Noctuidae) from the state of Guanajuato, Mexico. Florida Entomologist. Volumen 98. No. 4. Diciembre 2015.

Sánchez-Cordero V, Botello F., Flores-Martínez J. J., Gómez-Rodríguez R. A., Guevara L., Gutiérrez-Granados G. Rodríguez-Moreno Á. 2014. Biodiversidad de Chordata (Mammalia) en México. Revista Mexicana de Biodiversidad. Vol. 85, Suplemento Biodiversidad de México. UNAM. México.

Sarukhán, J., el al. 2009. Capital natural de México. Síntesis: conocimiento actual, evaluación y perspectiva de sustentabilidad. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México. pp 9

Villaseñor J. L., Ortiz E. 2014. Biodiversidad de las plantas con flores (División Magnoliophyta) en México. Revista Mexicana de Biodiversidad. Vol. 85, Suplemento Biodiversidad de México. UNAM. México.

ENRIQUECIMIENTO DE RNAs PEQUEÑOS EN LINEA CELULAR CasKi

José Alejandro Fierro Villegas[1] y Jesús Adrián López[2]

RESUMEN

Los microRNAs (miRNAs) son pequeñas moléculas de RNAs endógenos de aproximadamente 22 pares de bases. Juegan un papel importante en la regulación génica de organismos multicelulares. El estudio de los miRNAs proporciona cada vez más información sobre su implicación en diversas funciones celulares y en el desarrollo de enfermedades como el cáncer, proyectándolos así como herramienta diagnóstica y posibles biomarcadores.

Actualmente existen diferentes métodos de extracción de RNAs pequeños, sin embargo, la concentración es variable. El análisis de la expresión génica para transcritos con poca expresión resulta de suma importancia, por tal motivo es necesario estandarizar metodologías que enriquezcan esta fracción de los RNAs.

En este trabajo se evaluaron distintas concentraciones de solventes para enriquecer los RNAs pequeños.

ABSTRACT

MiRNAs are small endogenous RNA molecules of 22 base pairs approximately. They play an important roll in genetic regulation in multicelular organisms. The study of miRNAs provides more and more information about their involvement in different cellular functions and the development of diseases such as cáncer, wich projects them increasingly more as a diagnostic tool and potential biomarkers.

Nowadays there are different methods for small RNAs extraction, however, the recovered concentration is variable.The analysis of gene expression for transcripts with low expression is extremely important, for this reason it is necessary to standardize methodologies that will enrich this fraction of RNAs.

In this work different concentrations of solvents were evaluated to enrich small RNAs.

Palabras Clave: miRNAs, siRNAs, extracción de ácidos nucleicos, biomarcadores.

INTRODUCCIÓN

En 1993 un grupo de investigadores de la Universidad de Harvard se encontraba estudiando la regulación del desarrollo larvario en el nemátodo *Caenorhabditis elegans*. El gen de interés en la investigación era lin-4, el cual es esencial para el desarrollo post-embrionario del nemátodo. Lo único que sabían en ese tiempo era que en la etapa larvaria 1, lin-4 regula negativamente los niveles de una proteína llamada LIN-14. Después de 4 meses, el grupo dirigido por Victor Ambros encontró que lin-4 no es un gen que codifica para una proteína, sino que da origen a dos RNAs: uno de 22 nucleótidos (nt) y otro de aproximadamente

[1]Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Química, Ingeniería en Biotecnologia, Cerro de las Campanas s/n, Col. Las Campanas, C.P: 76010, Querétaro, Querétaro, alejandro.fierrovillegas@gmail.com
[2]Universidad Autónoma de Zacatecas, Unidad Académica de Ciencias Biológicas, Laboratorio de microRNAs; Avenida Preparatoria s/n, Col. Agronómica, C.P: 98066, Zacatecas, Zacatecas, jalopez@uaz.edu.mx

60 nucleótidos que podría ser el precursor del RNA más corto (Ambros, 1993). Tiempo después, se descubrió que la manera en la que el RNA lin-4 de 22 nt regula la expresión de la proteína LIN-14 es mediante su unión al RNA mensajero de lin-14 por complementariedad de bases, evitando así su traducción. Estas fueron las primeras observaciones descritas en las que un RNA pequeño se unía directamente a un mRNA alterando su expresión.

Sin embargo, fue hasta el año 2001, cuando se encontraron decenas de RNAs de tamaños cercanos a 21 nt en el mismo nemátodo (*C. elegans*), en plantas (*A. thaliana*) en moscas (*D. melanogaster*) y en vertebrados (*Homo sapiens*). A estos RNAs pequeños recién descubiertos se les nombró microRNAs (miRNAs) (Lagos-Quintana M, 2001).

Se estima que 1-5 % del genoma humano corresponde a los miRNAs, los cuales pueden regular al menos 30 % de los genes que codifican proteínas. Cada miRNA puede interactuar con cientos de mRNA ya sea directa o indirectamente. De la misma manera, la expresión de un simple mRNA puede ser modulada cooperativamente por múltiples miRNAs (Bartel, 2004).

Actualmente se ha demostrado que los miRNAs participan en un sinnúmero de funciones celulares, por ejemplo: la diferenciación de células madre, apoptosis, el desarrollo de tejidos y la progresión de diferentes enfermedades.

Pese a que la identificación de estas pequeñas moléculas de ácidos nucleicos ha tomado mucha importancia en la última década, aún no se comprende completamente la activación y señalización de los miRNAs, representando un campo de investigación emergente con muchas cuestiones que resolver.

Biogénesis: Transcripción de miRNAs
La biogénesis de los miRNAs comienza en el núcleo, con la transcripción de los genes de miRNAs por la RNA polimerasa II, su acción genera fragmentos de aprox. 650 pares de bases y son conocidos como transcritos primarios o pri-miRNAs aunque estos no han sido definidos completamente.

Los pri-miRNA contienen una capucha 7-metil guanosina (m7G) en el extremo 5’ y una cola poli A en el extremo 3’, estos fragmentos son reconocidos en el núcleo por la enzima Drosha la cual genera una estructura de horquilla llamada pre-miRNAs que será reconocida y llevada al citoplasma por una proteína transmembrana nuclear, la exportina 5 dependiente de Ran-GTP (Rui Yi, 2003).

Una vez en el citoplasma, los pre-miRNA serán reducidos por segunda vez por la acción de la enzima Dicer, dando lugar a los miRNAs maduros, un RNA de doble cadena y pequeño tamaño (19-25 pares de bases por cadena) que contiene dos miRNAs. Los miRNAs maduros son incorporados en el complejo RISC (*RNA-induced silencing complex*). El complejo RISC-miRNA se dirige a mRNAs específicos para modular negativamente la expresión genética (Bartel, 2004).

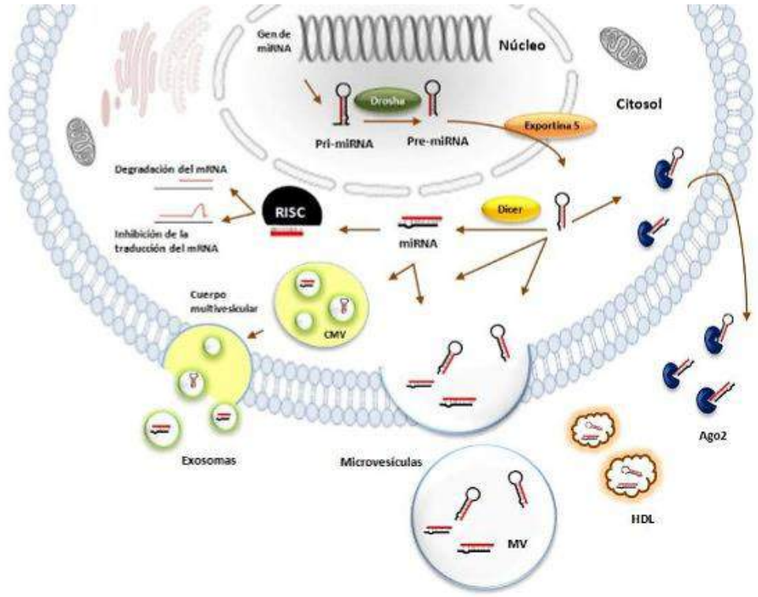


FIGURA 1. Biogénesis, función y transporte de miRNAs
MicroRNAs circulantes; posibles biomarcadores, REVISTA EUBACTERIA (NOVIEMBRE 2013) NO32 / ISSN-1697-0071

Extracción de miRNAs
Existen varios protocolos para la extracción de ácidos nucleicos (DNA y RNA), la mayoría incluyen al reactivo TRIzol que mantiene la estabilidad el RNA y ayuda a lisar la célula y eliminar los componentes celulares, la adición de cloroformo y un buen proceso de centrifugación separa la muestra en 3 fases: fase acuosa, orgánica e interface. El RNA se concentrará en la fase acuosa al ser más soluble en agua que el DNA, debido a la polaridad de la fase acuosa esta retiene los grupos OH^- no polares de la ribosa y de las bases expuestas de las moléculas de RNA. Los RNAs totales presentes en la fase acuosa son recuperados por precipitación con alcohol isopropílico. La corrida y revelado de un gel de agarosa ofrece 3 bandas, correspondientes al RNA ribosomal 28s, RNA ribosomal 18s y a los RNAs pequeños.

La extracción de miRNAs extracelulares no es una tarea fácil, ya que se encuentran en cantidades muy bajas en los fluidos corporales y la falta de normalizadores endógenos fiables dificulta su cuantificación precisa. Actualmente no existen protocolos bien definidos para la obtención, preparación, cuantificación y normalización de los resultados con muestras de miRNAs.

Por lo tanto, es necesaria la estandarización de protocolos para el desarrollo de miRNAs circulantes como nuevos biomarcadores. (Michaela Kress, 2013) (Alton Etheridge, 2011)

En base a los solventes utilizados comúnmente para la extracción de ácidos nucleicos, en este experimento se prepararon 5 distintas muestras con volúmenes de alcohol etílico e isopropílico, comprando la concentración de RNAs pequeños obtenida en éstas contra la concentración de la muestra control utilizando el protocolo tradicional de TRIzol para la extracción de RNA con un volumen de alcohol isopropílico.

METODOS Y MATERIALES

Muestras de pacientes con cáncer cervical
Las muestras de pacientes con cáncer cervical fueron proporcionadas por el ISSSTE del Estado de Zacatecas, obtenidas mediante resección quirúrgica por el ginecólogo especialista del hospital.

Línea celular CasKi
A partir de las muestras, se realizaron pasajes 1 a 10 en cajas Petri con $5x10^6$ células de la línea celular tumorigénica CasKi de cérvix. Los cultivos celulares de las cajas se crecieron con DEMEM en una incubadora a 37°C y 5% de CO_2 durante 2 días.

Extracción de RNA método TRIzol
Para la extracción de RNA total a partir de la línea celular CasKi con el reactivo TRIzol se realizaron los siguientes pasos por triplicado:

1. Adicionar 600 µL de TRIzol y raspar la superficie de las cajas Petri con la ayuda de un gendarmes esteriles
2. En un tubo eppendorf de 1.5 mL recuperar el volumen total del reactivo y adicionar 200 µL de cloroformo.
3. Vortex durante 15 segundos e incubar durante 4 minutos a temperatura ambiente.
4. Centrifugar a 13,000 rpm durante 15 minutos a 4°C, recuperar la fase acuosa en otro tubo y precipitar con alcohol isopropílico durante 12 horas a -20°C.
   El tubo 1 fue preparado de esta manera para tener un control de la concentración de RNAs pequeños que se obtendrá en la extracción; los siguientes tubos se prepararon con los siguientes volúmenes propuestos: para el tubo 2, relación 1:1 de volúmenes de alcohol isopropílico y etílico; para el tubo 3 relación 2:1 de volúmenes de alcohol isopropílico y etílico; para el tubo 4 relación 3:1 de volúmenes de alcohol isopropílico y etílico; para el tubo 5, relación 1:2 de volúmenes de alcohol isopropílico y etílico y finalmente el tubo 6 con una relación 1:3 de volúmenes de alcohol isopropílico y etílico.
   El volumen recuperado de la fase acuosa fue de 1800 µL, el cual se dividió en 6 tubos (250 µL c/u) y fueron preparados de la siguiente manera:

Tabla 1: Preparación de los tubos con los solventes y el volumen de muestra

Tubo	Volumen de isopropanol (µL)	Volumen de etanol (µL)	Volumen final (µL)
1	250	-	500
2	250	250	750
3	500	250	1000
4	750	250	1250
5	250	500	1000
6	250	750	1250

5. Incubar los tubos 12 horas a -20°C para la precipitación de los ácidos nucleicos y centrifugar a 13,000 rpm durante 7 minutos a 8°C. Descartar sobrenadante y conservar pellet.
6. Precipitar nuevamente con 500 µL de etanol al 75% y centrifugar nuevamente a las condiciones del paso 5.
7. Decantar sobrenadante y dejar secar en una sanita estéril con cuidado de no secar por completo la muestra. Resuspender el pellet agregando 80 µL de agua libre de RNAsas.
8. Para limpiar las contaminaciones por DNA se realizó un tratamiento con la enzima DNAsa I preparando una solución de 48 µL de la enzima a 1 U/ µL, agregando 6 µL a cada tubo e incubando las muestras 2 horas a 37°C. Se adicionaron 50 µL de fenol y 50 µL de cloroformo-alcohol isoamílico y tras un vortex de 15 segundos se recuperó la fase acuosa en otro tubo eppendorf para cada muestra.
9. Se agregaron 8 µL de acetato de sodio 3M + 300 µL de alcohol etílico al 100%. Incubar nuevamente 2 horas a -70°C, descongelar y centrifugar nuevamente a las condiciones del paso 5,

10. Decantar sobrenadante y añadir 100 µL de alcohol etílico al 75%, centrifugando nuevamente con las condiciones previas, secar y suspender el pellet en 80 µL de agua libre de RNAsas.

Electroforesis RNA en gel de agarosa al 1x
Para el corrimiento de las muestras se preparó el tampón TAE 1x agregando 20 mL de solución TAE 50x en un frasco estéril y se aforó a 500 mL. Para la preparación del gel de agarosa 1x, se disolvió con calor 1 gramo de agarosa en 100 mL de la solución TAE 1x. Se cargaron volúmenes de 9 µL: 7 µL de muestra + 2 µL del buffer de carga, azul de bromofenol. Las condiciones a las que se corrió la electroforesis fueron de 100 Volts a 400 mA por 15 minutos, después se cambió el gel a bromuro de etidio durante 10 minutos y finalmente se corrió de nuevo a las condiciones ya mencionadas.

Transcripción reversa y cuantificación por PCR punto final de RNAs pequeños
El objetivo de la RT PCR fue sintetizar el DNA complementario (cDNA) a partir de RNA total usando los primers específicos para U6 de la línea celular CasKi. Se preparó la enzima polimerasa II, $MgCl_2$, dNTPs, el mix y las soluciones amortiguadoras de PCR. Se utilizó el mirVana™ qRT-PCR miRNA Detection Kit con las condiciones en primera etapa de 37°C por 30 minutos y la segunda a 95°C por 10 minutos; las condiciones para la PCR punto final fueron en la primera etapa 95°C por 3 minutos, 95°C por 15 segundos, para la segunda etapa 40 ciclos a 60°C por 30 segundos y finalmente 4°C ∞. El propósito de la PRC punto final es cuantificar los productos amplificados y relacionar la cuantificación de las bandas con las de los productos de PCR.

RESULTADOS

Extracción de RNA y electroforesis
En la *figura 2* se muestra el corrimiento de los RNAs totales a través de un gel de agarosa, con el número de posillo, número de muestra y su preparación correspondiente. Se puede observar que la muestra número 5 obtuvo mayor concentración de la tercera banda de arriba hacia abajo, correspondiente a los RNAs pequeños en donde se encuentran los miRNAs.

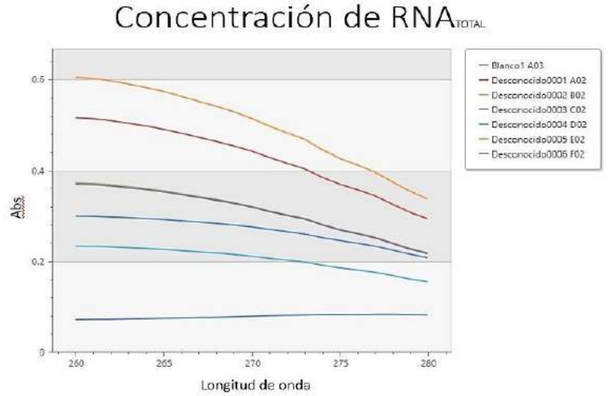


FIGURA 3. Absorbancia de las diferentes muestras a 260 y 280 nm

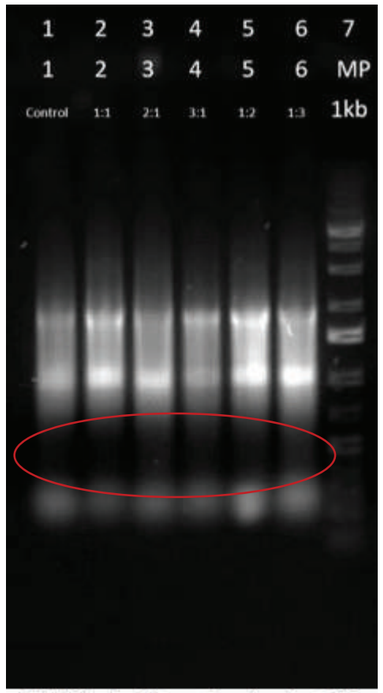


FIGURA 2. Electroforesis de RNAs totales en gel de agarosa al 1%

La *figura 3* muestra un gráfico que compara la absorbancia de cada muestra contra el intervalo de longitud de onda entre 260 y 280 nanómetros, las lecturas fueron realizadas con ayuda del plato µDrop para cuantificación de ácidos nucleicos en el espectrofotómetro Multiskan Go y en el Nanodrop 2000 de Thermo Scientific. La cuantificación de las bandas del gel se obtuvo con la aplicación ImageLab del fotodocumentador ChemiDoc de Bio-Rad. Los datos de la concentración se muestran en la *tabla II*. Comparando las concentraciones de las bandas correspondientes a los RNAs pequeños de las muestras, se identificó que la muestra 5 era la de mayor concentración en la tercera banda de arriba hacia abajo. Al graficar y comparar los datos, la muestra 5 obtuvo mayor concentración de RNAs pequeños que la muestra 1 (control) con un solo volumen de isopropanol de acuerdo con el protocolo convencional.

Tabla II. Cuantificación de muestras de RNA total

Tubo	Concentración (ng/ µL)	A260	A280	A260/A280	Cuantificación de la 3ra banda (udo)	Cuantificación bandas PCR (udo)
1	300.4	7.585	3.849	1.96	7,913,060	19,348,264
2	204.4	5.110	2.044	1.96	3,903,614	16,339,347
3	277.6	5.635	2.606	1.94	7,513,929	17,940,617
4	224.4	6.220	3.440	1.95	5,338,500	-
5	378.4	8.445	4.557	2.06	10,084,950	24,068,758
6	239.2	5.118	2.824	1.85	5,514,376	19,383,904

Transcripción reversa y PCR punto final
En la *figura 4* se muestra la amplificación confirmatoria de los productos de PCR en un gel de agarosa al 1%.
Después de la transcripción reversa para generar el cDNA, se realizó la PCR punto final con el objetivo de amplificar los primers de U6 presentes en las muestras de cáncer cervical.
Se verificó la amplificación al cuantificar las bandas en Image Lab y comparando los valores con la cuantificación de la 3ra banda, encontrando una mayor concentración en la muestra 5 en ambos casos.

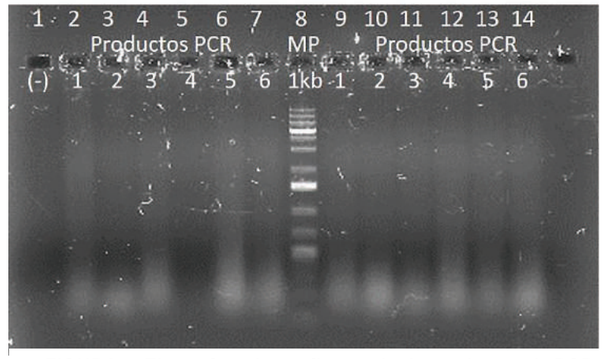


FIGURA 4. Electroforesis confirmatoria de productos de PCR

CONCLUSIONES

El análisis de transcritos de baja expresión en los RNAs pequeños es un área de investigación emergente y con muchas cuestiones que resolver. El enriquecimiento de esta fracción de RNAs durante la extracción de RNA total resulta más efectivo que al término de la extracción.

El etanol y el isopropanol son solventes que favorecen la precipitación de las cadenas pequeñas de ácidos nucleicos. El rendimiento final de los RNAs pequeños obtenido con la muestra 5 en este trabajo supera el establecido por el protocolo de extracción para RNAs pequeños ZYMO RESEARCH ™.

BIBLIOGRAFIA

- Alton Etheridge, I. L. (2011). Extracellular microRNA: A new source of biomarkers. *ELSEVIER*, 6.
- Ambros, V. (3 de Diciembre de 1993). The C. elegans Heterochronic Gene lin-4 Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to & Iin-14. *Cell Press*, 12.
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism and function. . *Cell* , 116:281.
- Lagos-Quintana M, R. R. (2001). Identification of novel genes coding for small. *Science*, 8.
- Michaela Kress, A. H. (2013). microRNAs in nociceptive circuits as predictors of future clinical applications. *Frontiers Molecular Neuroscience*, 11.
- Rui Yi, Y. Q. (7 de Octubre de 2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpins RNA. *RESEARCH COMMUNICATION*, 6.

OBSERVACIÓN DE LA REGULACIÓN DEL PROMOTOR T5 EN CULTIVOS JÓVENES Y VIEJOS UTILIZANDO LA PROTEÍNA GFP COMO REPORTERO

Karla Guadalupe Figueroa Pérez[1] y Braulio Gutiérrez Medina[2]

RESÚMEN

La bacteria E*scherichia coli* es capaz de metabolizar la lactosa por medio del operón Lac, el cual cuenta con un operador que es una región de ADN, al cual se une la proteína represora Lac I en la síntesis del RNAm, la unión del represor Lac I evita la transcripción de los genes codificados en el operón, y solo la ausencia de glucosa y la presencia de lactosa o IPTG, que es una análogo de la lactosa no hidrolizable, activan la transcripción. El promotor T5 es una fusión del promotor del bacteriófago T5 con la región del operador del operón Lac y es utilizado para controlar la expresión de proteínas recombinantes en cultivos celulares jóvenes por medio de la adicción de IPTG. Tanto el operón Lac como el promotor T5 comparten el mismo principio de activación en presencia de lactosa. Para entender la regulación del promotor T5estudiamos su regulación bajo diferentes condiciones de glucosa y edades del cultivo celular, utilizando a la proteína GFP como reportera de la actividad del promotor. Se encontró que el promotor T5 se induce, sin necesidad de añadir IPTG, una vez que el cultivo entra a su fase estacionaria y ha consumido la glucosa del medio. También se encontró que la fluorescencia de GFP en cultivos celulares viejos no decrece, por el contrario aumenta linealmente aun cuando la cinética del cultivo muestra un decremento en su absorción a 600 nm, dejando pendiente investigar el motivo por el cual esta fluorescencia se ve incrementada con el paso del tiempo.

ABSTRACT

E. coli bacteria is capable of metabolizing lactose through operon Lac, which counts with an operator that the RNA polymerase binds to the start of the protein synthesis, this only in the absence of glucose and presence of lactose or in IPTG effect that is an analog of the non-hydrolyzable lactose. Herein is studied the promoter regulation T5 to different conditions and ages of the crop, the T5 promoter is a fusion of the promoter of bacteriophage T5 with the operator region of the lac operon, is useful to control the expression of recombinant proteins in young cell crops through addiction of IPTG, thus being induced the lac operon and the T5 promoter by lactose. It is of interest to study the dependence of these, and how controlling a process, as used today, occurs and important as is the synthesis of recombinant proteins under different nutrients and for old cell crops. The activity of T5 promoter was analyzed through a reporter gene, which codifies for the fluorescent protein GFP using the measure of fluorescence signal, and to obtain cell growth kinetics the absorbance of the culture at 600 nm was measured. It was found that the T5 promoter is induced, without adding IPTG, once the culture enters the stationary phase and has consumed the glucose in the environment. It was also found that GFP fluorescence in old cell crops does not decrease, on the contrary increases even linearly when the crops kinetics shows a decrease in absorption at 600 nm, leaving pending investigate why this fluorescence is increased over time.

Palabras clave: *Escherichia coli*, proteína verde fluorescente, promotor T5, cinética bacteriana, operón LAC.

[1] Instituto Tecnológico Superior de Irapuato, coordinación de ingeniería bioquímica, Carretera Irapuato - Silao km 12.5 Colonia El Copal, C.P:35821, Irapuato, Guanajuato, Karla-Figueroa@outlook.es.
[2] Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica

INTRODUCCIÓN

Las bacterias cuentan con múltiples mecanismos para controlar la expresión de su gran cantidad de genes, con lo cual logran que el producto de un gen determinado, solo se sintetice cuando es necesario y, en lo posible en la cantidad óptima, (*Bentacor et al, 2008*)). Esto les provee capacidad de respuesta y adaptación al medio en que habitan, haciendo usos de los sustratos solo cuando los necesitan. La bacteria *Escherichia coli* es una de las más empleadas en bilogía molecular para la síntesis de proteínas debido a su corto tiempo de duplicación. Como todo microorganismo cumple con sus fases de crecimiento compuestas por una etapa de adaptación, una etapa exponencial, la meseta o fase estacionaria y por último la fase de muerte, (*Miranda et al*,1992). Las bacterias ligan la síntesis de los genes estructurales necesarios para responder a un estímulo, a un solo promotor que los active, para evitar prender uno por uno y realizar este proceso de una manera más eficiente. El operón lac se encuentra dentro de la bacteria *E. coli y* se considera inducible debido a su activación por medio de lactosa y ausencia de glucosa, este mecanismo ayuda a la bacteria a degradar lactosa. El operador del operón lac, es el sitio al cual se une la proteína represora en caso de ausencia de lactosa. La unión del represor impide que la RNA polimerasa se adhiera al promotor y comience la síntesis de los genes. Cuando en el medio se detecta lactosa, esta se une a la proteína represora modificando su conformación y haciendo que la proteína represora se disocie del operador, dando paso a la polimerasa y permitiendo la transcripción de los genes del operón Lac. Esta característica del promotor para poderse inducir en presencia de lactosa ha sido aprovechada para, en conjunto con el operador del bacteriófago T5, crear al promotor T5, el cual es empleado para controlar la producción de proteínas recombinantes. En el laboratorio se cuenta con la cepa de *E.coli* BL21(DE3) transformada con el plásmido que codifica para la proteína GFP y la cepa TOP 10 ambas bajo el control del promotor T5, la primera sobre expresa la proteína GFP conocida así por sus siglas en ingles Green Fluorescent Protein, producida por la medusa Aequorea victoria que emite bioluminiscencia en la zona verde del espectro visible(*Millán et al, 2009)*) Esta proteína es de gran importancia en el campo de la biología molecular, ha ganado popularidad en los últimos años pues se utiliza habitualmente como marcador, permitiendo observar con mayor detalle sistemas biológicos, se eligió esta proteína como reportero de la actividad del promotor T5.Por medio de la medición de fluorescencia se identificó la presencia de la proteína y por ende la activación del promotor T5.Se trabajó también con la cepa TOP 10 la cual no ha sido modificado para la producción de alguna proteína y no emite fluorescencia, su fin es ser el blanco y poder así comparar el crecimiento y el tiempo de duplicación con y sin síntesis de proteínas, así como restar en la medición de fluorescencia aquella señal que es emitida naturalmente por la bacteria y no por la proteína GFP.

METODOLOGÍA

Para realizar este experimento se usó como reportero la proteína GFP sobre expresada por la cepa de *E.coli* modificada con un plásmido que se encuentra bajo control de promotor T5 (cpGFP) y como control la cepa Top10.Ambas cepas presentan resistencia al antibiótico kanamicina (kan) y se crecieron en medio Laura Bertani mejor conocido como LB (5 g/l NaCl, 10 g/l Triptona, 5 g/l Extracto de levadura)) + el antibiótico kanamicina (kan). Se pusieron inóculos a 37°C con agitación constante por 16hrs, posteriormente los cultivos se resembraron en medio fresco (LB+ kan) y se crecieron a 37° con agitación constante.

Medición de absorbancia en cubeta en el espectro Cary 5000 UV-Vis-NIR.

Cada 30 minutos se midió la absorbancia a 600 nm para los cultivos de cpGFP y TOP10. La medición se realizó por un lapso de 9 horas continuas y el experimento se realizó por triplicado para cada cepa, para cada medición se tomó 1 ml de un cultivo de 20 ml. El cultivo principal de 20 ml se mantuvo durante todo el tiempo que duró el experimento en condiciones de agitación constante a 37°C.

Imágenes presentadas

Se tomaron imágenes de ambas cepas con el microscopio en campo claro y fluorescencia para asegurar que la cepa blanco no emitía fluorescencia como la cepa GFP más que fluorescencia basal.

En un tubo falcon de 50 ml se colocó 5 ml de LB, 5 µl de kan y 50 µl de inoculo se incubó por 2 horas a 37 grados centígrados y agitación contante. Se hizo este procedimiento para ambas cepas y se le agregó IPTG como inductor a ambos tubos y se incubó por 2 y media horas a 28 ˚C y agitación constante. Al paso de este tiempo se tomaron 10 µl de cada cepa y se clocaron en tubos eppendorf previamente llenos con 90 µl de LB y se agitaron para homogeneizar, se analizaron en porta objetos recubiertos de poli-l-lisina.

Medición de cinética de crecimiento y fluorescencia en equipo EPOCHSynergy HTX Multi-Mode Reader

Se empleó una placa de 96 pozos en las cuales se colocaron 200 µl de cada muestra por triplicado y un pozo más de control (LB +kan), el experimento sucedió a 37 ˚C con agitación alta y continua, el equipo realizó medición de fluorescencia y absorbancia cada 10 minutos, en el caso de absorbancia se mantuvo la medición a 600 nm, para la fluorescencia se empleó el filtro de excitación 485±20 nm y de emisión 528+-20nm y con una ganancia de 50.

Se probó con las siguientes condiciones:

a) Experimento 1. Cultivo sin IPTG y sin Glucosa adicionada. Se colocaron 4 ml de medio LB+ antibiótico y se resembraron las células de cada cepa en una proporción 1:4000
b) Experimento2. Cultivo con IPTG y sin Glucosa adicionada. Se colocaron 4ml de medio LB+ antibiótico, se resembraron las células en una proporción 1:4000 y se añadió IPTG a una concentración final de 0.1 mM.
c) Experimento 3. Cultivo con IPTG y glucosa adicionada a 0.075 g/l,4 ml de LB+ antibiótico , se resembraron las células en una proporción 1:4000 y se añadió IPTG a una concentración final de 0.1 mM
d) Experimento 4: cultivo sin IPTG y con glucosa adicionada 0.075 g/l, 4 ml de LB+ antibiótico, se resembraron las células en una proporción 1:4000.
e) experimento 5: cultivo sin IPTG y con glucosa adicionada a 0.0015 g/l. Se colocaron 4ml de medio LB+ antibiótico, se resembraron las células en una proporción 1:4000

Esta placa fue cubierta por un plástico especial para evitar que las bacterias se propagaran dentro del equipo, la evaporación de las muestras y evitar contaminaciones del propio pozo.

Los experimentos 1,2 y 5, descritos anteriormente, se analizaron dentro del equipo durante tres lapsos de tiempo el primero consto de 0-63 horas, el segundo de la hora 136-145 y el tercero de la hora 263-270. En el lapso de tiempo intermedio entre cada análisis es decir de la hora 63-36 y de la hora 145-263 la placa se mantuvo en una caja de cartón a obscuras a temperatura ambiente.

Análisis de datos

Se analizaron los datos obtenidos en el programa Igor ajustando los datos a una sigmoide para obtener los tiempos de duplicación de los cultivos , ya que de entre la comparación realizada con otros método resulto ser el más eficiente, también se empleó este mismo programa para realizar las gráficas de las cinéticas de crecimiento y fluorescencia.

RESULTADOS

Los tiempos de duplicación arrojados en los análisis tanto en cubeta como en el equipo EPOCH son comparables, ambos oscilan en 45 minutos para GFP y 59 minutos para Top 10 esto en el caso del experimento 1 donde no se realizó inducción por IPTG, ya que es el único en que se pudo mantener las mismas condiciones, para su análisis en ambos equipos, el resto de cinéticas de crecimiento se midieron solo en el equipo EPOCH los cuales se pueden observar en la figura 1.

El mejor método para analizar los tiempos es el de sigmoide ya que ajusta automáticamente a la fase exponencial del cultivo, evitando así introducir error humano al ajustar manualmente.

Para corroborar que la cepa cpGFP presentara fluorescencia al ser inducida con IPTG se tomaron imágenes de microscopía de fluorescencia para un cultivo inducido y como control se observó la fluorescencia basal de la cepa TOP10. En la figura 2 y 3se puede observar que efectivamente la cepa GFP emite fluorescencia al ser inducida con IPTG, en el caso de la cepa TOP 10 (figura 4 y 5) vemos un nivel de fluorescencia menor y que determinamos como fluorescencia basal. Con estas imágenes corroboramos que podemos utilizar a la cepa cpGFP como reportero de la actividad del promotor T5 y a la cepa TOP 10 como control.

En el equipo EPOCH se realizó la cinética de fluorescencia para probar la expresión de la proteína y con ello comprobar si el promotor T5 ha sido activado y como se modifica este encendido del promotor T5 con la modificaciones aplicadas.

En el experimento 1 se puede observar que aún en ausencia de inductor la proteína se expresó, esto debido a la existencia de una pequeña porción de lactosa en el medio.

En el experimento 2 se observó cómo al terminarse la glucosa que se encuentra naturalmente en el medio, la proteína comenzó a expresarse con una señal de fluorescencia mayor que en el experimento 1 esto debido a la inducción por IPTG.

En el experimento 3 se comprobó que aun induciendo la expresión de la proteína con IPTG, mientras exista glucosa, la proteína no se expresará y de esta manera se dedujo que a través de la adición de glucosa extra al medio se puede controlar el momento de síntesis de proteínas recombinantes, también se observó que la inducción con IPTG si origina un aumento en la señal de fluorescencia registrada, lo cual se puede traducir a mayor cantidad de proteínas expresadas.

En el experimento 4 se observó que tomo más tiempo la expresión de la proteína GFP en comparación con el experimento uno, con eso se comprobó que el consumo total de la glucosa si determina el momento en el que se enciende el operón lac y con este el promotor T5.

En el experimento 5 fue posible observar el momento en el que se consume la glucosa natural del medio al igual que la adicionada y la fluorescencia se hace presente después de aproximadamente 40 horas.

Adicionar 0.075 g/ml de glucosa es suficiente para inhibir la activación del promotor T5 aun con la presencia de IPTG (Figura7).En el caso del experimento 5 se logra observar el momento en el que se agota la glucosa y se activa el operón lac de la bacteria y sucesivamente el operador T5 dando comienzo a la síntesis de proteína GFP.

Al paso de270 horas del análisis de los experimentos 1,2 y 5 se puede observar el aumento de la fluorescencia a pesar de la culminación del crecimiento exponencial del cultivo (figuras 6,7,8,9,10 y 11), lo cual es interesante ya que la proteína tiene una estabilidad notable ante la degradación, se observó también que mientras la placa con los pozos en experimento no estaba en análisis y se encontraba a temperatura ambiente el aumento en la fluorescencia aumentaba de una manera más lenta, por el contrario

cuando la placa se encontraba en análisis a 37 grados centígrados y agitación contante el aumento de la fluorescencia era mayor y más rápido.

El aumento en general de la fluorescencia en cultivos viejos pude deberse a que las células están produciendo más proteínas aunque su número ya no aumente, o que las proteínas presentes están floreciendo con mayor intensidad al paso del tiempo lo cual deja como incógnita cuál de estas opciones es la razón real a este suceso.

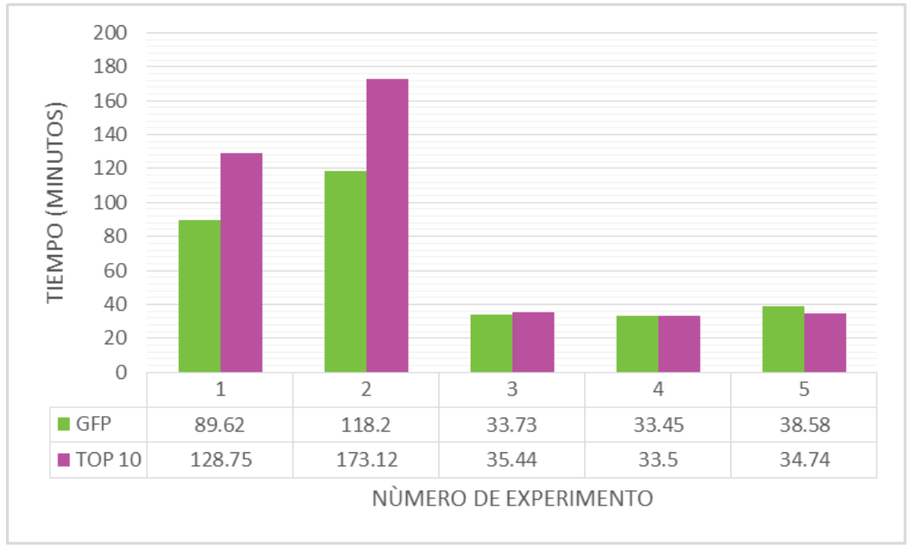


Figura 1. Gráfica comparativa de los tiempo promedio de duplicación para la cepa GFP y TOP 10, en los 5 experimentos realizados en el equipo EPOCH.

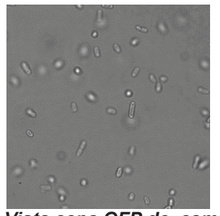


Figura 2.Vista cepa GFP de campo claro después de 2 horas y media de inducción con IPTG.

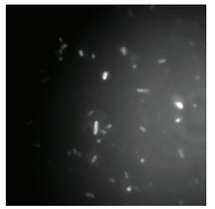


Figura 3. Vista cepa GFP de fluorescencia después de 2 horas y media de inducción con IPTG.

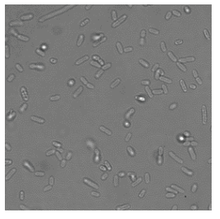


Figura4. Vista cepa TOP 10 de campo claro después de 2 horas y media de inducción con IPTG.

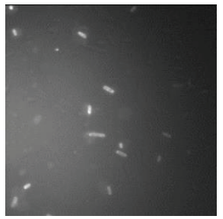


Figura 5.Vista cepa TOP 10 de fluorescencia después de 2 horas y media de inducción con IPTG.

Resultados de los análisis en el equipo EPOCH graficados en Igor de los experimentos 1,2 y 5

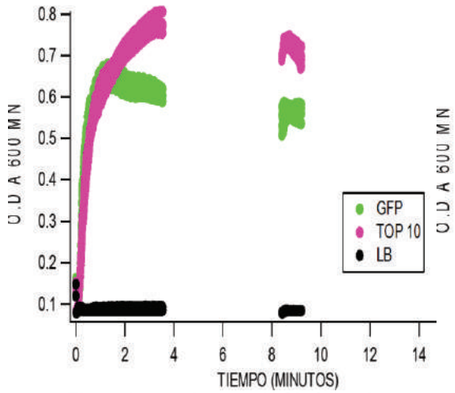


Figura6.experimento 1: Cinética de crecimiento bacteriano sin inducción por IPTG después de 270 horas.

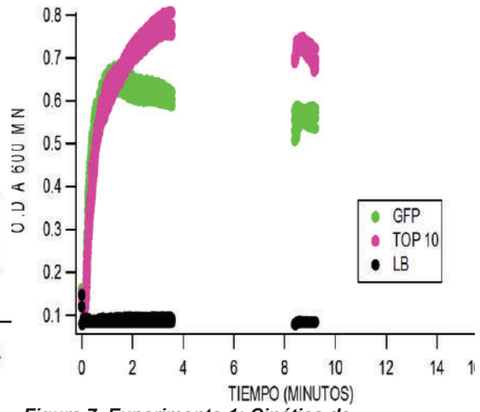


Figura 7. Experimento 1: Cinética de fluorescencia sin inducción por IPTG después de 270 horas.

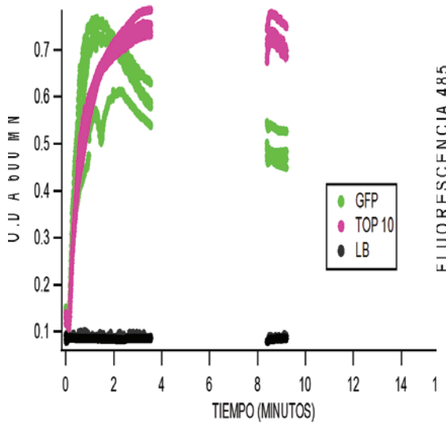


Figura 8. Experimento 2: Cinética de crecimiento bacteriano con inducción por IPTG después de 270 horas.

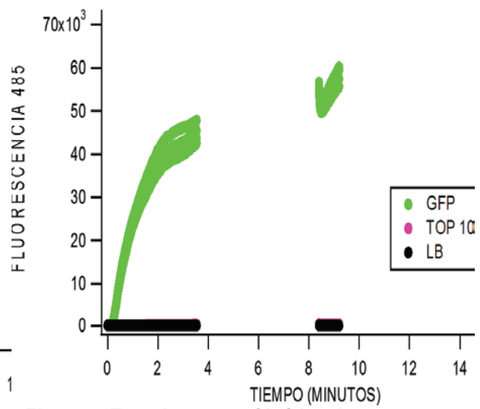


Figura 9. Experimento 2: Cinética de fluorescencia con inducción por IPTG después de 270 horas.

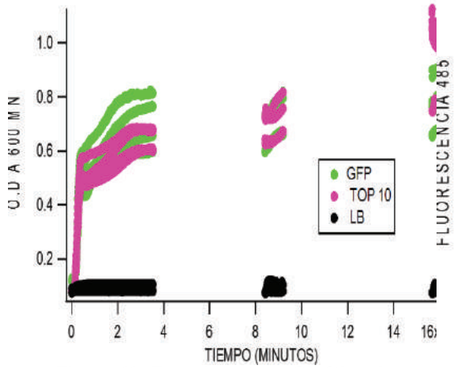


Figura 10. Experimento 5: Cinética de crecimiento bacteriano adicionado con 0.0015 g/l de glucosa después de 270 horas.

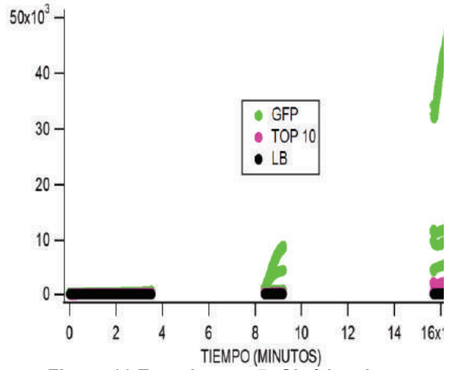


Figura 11.Experimento 5: Cinética de fluorescencia adicionado con 0.0015 g/l de glucosa después de 270 horas.

CONCLUSIONES

Con el presente trabajo se puede observar la regulación efectiva del promotor T5 con la presencia de lactosa y ausencia de glucosa al igual que el control que se puede tener sobre la síntesis de proteínas al adicionar diferentes concentraciones de glucosa. Es clara la dependencia directa del promotor T5 con el operón lac, puesto que al no activarse éste último, las permeasas no se crearían y la lactosa no sería introducida a la bacteria, sin la lactosa dentro de la célula no sería la unión de la ARN polimerasa al operador en el promotor T5 y de esta manera no sería posible la transcripción de la proteína GFP.

La proteína GFP sintetizada durante los experimentos presentó gran estabilidad ante la degradación al paso del tiempo ya que la señal de fluorescencia que emitía aumentó aun cuando termino en crecimiento exponencial del cultivo , es necesario realizar un estudio afondo para determinar cuál es la razón real de este suceso en cultivos viejos ,esta observación sugiere que la transcripción del gen GFP sigue activa o bien que las proteínas de GFP ya presentes en el medio se activan aumentando la señal de fluorescencia.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al programa verano de la ciencia región centro y al Instituto Tecnológico Superior de Irapuato por brindarme la oportunidad de realizar una estancia de investigación así como al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica por hacerme participe en uno de sus proyectos bajo la guía de la Dra. Carmen Noemí Hernández Candia y el Dr. Braulio Gutiérrez Medina, por su completo apoyo para participar en el 18vo verano de la ciencia

BIBLIOGRAFIA

-Betancor, L., Gadea, M. P., Flores, K., & Instituto de Higiene^ Facultad de Medicina. (2008). Genética bacteriana. *Instituto de Higiene, Facultad de Medicina (UDELAR). Temas de Bacteriología y Virología Médica. 3ra Ed. Montevideo: Oficina del Libro FEFMUR*, 65-90.

Miranda, J. K., &Sahuquillo, R. M. (1997). Crecimiento bacteriano en las redes de distribución de agua potable: una revisión bibliográfica. Ingeniería del agua, 4(2).

Millán, M. I., &Becú-Villalobos, D. (2009). La proteína verde fluorescente ilumina la biociencia. Medicina (Buenos Aires), 69.

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLADOS BACTERIANOS DE GUANAJUATO

David Aarón Fraire García[1] y Juan Gualberto Colli Mull[2]

RESUMEN

Con el objetivo de identificar la biodiversidad microbiana de la reserva ecológica de Sierra de Lobos, Guanajuato, México y conocer cómo influyen los microorganismos en este suelo se caracterizaron molecularmente 149 aislados bacterianos provenientes de estos suelos. Se empleó la técnica de PCR para cada uno de los aislados, 142 amplificaron exitosamente y posteriormente se les realizo un análisis de restricción (ARDRA) por medio de este se pueden identificar los grupos bacterianos y diferenciarlos unos de otros conforme al patrón de restriccion. Basados en los resultados obtenidos se obtuvo un dendrograma identificando cada grupo. Concluyendo exitosamente con esto el objetivo de este proyecto.

ABSTRACT

Trying to know the microorganism biodiversity in a reserve of Sierra de Lobos, biosphere of Guanajuato, Mexico were performed some techniques making a molecular characterization to identify each one of the isolates. The molecular characterization was performed of 149 bacterial isolates from this soils and it was done by PCR technique for all the isolates samples, 142 amplified successfully and it was subsequently submitted to a restriction analysis (ARDRA) through this could identify the bacterial groups and we could found the differences of isolates according their restriction pattern. Based on this analysis we could obtain an dendrogram to identify each group. With this we obtained the expected results of this project.

Palabras clave: Caracterización molecular, aislados bacterianos, PCR, ARDRA.

INTRODUCCION

Se sabe que los microorganismos son los seres vivos que se presentan en mayor abundancia sobre la tierra, estos mismos han colonizado cada nicho ecológico posible. Su presencia y actividad son esenciales para la salud y funcionamiento adecuado de todos los ecosistemas. Existen microorganismos que degradan la materia orgánica haciéndola nuevamente disponible para las plantas. La capacidad de los microorganismos para desarrollar tal variedad de funciones se debe a su gran versatilidad bioquímica, basada en la posibilidad de llevar a cabo una enorme cantidad de tipos de reacciones: oxidaciones, reducciones y precipitaciones, sobre los elementos componentes de la vida, y que de manera directa o indirecta gobiernan todos los procesos en la tierra. Las bacterias son los organismos más numerosos en el suelo (entre 106 y 107 bacterias g/l de suelo), mientras que los hongos dado su mayor tamaño aunque menor abundancia tienen la biomasa más significativa (Portugal y Gómez, 1998). El punto en donde se llevan a cabo las interacciones más importantes, es la rizósfera, la zona de influencia de la raíz. La

[1] Universidad Autónoma de Coahuila, Facultad de Ciencias Biológicas. Carretera Torreón – Matamoros, kilómetro 7.5. Ejido el Águila, C.P: 27276. Torreón, Coahuila, david8_95@hotmail.com
[2] Instituto Tecnológico Superior de Irapuato. Departamento de Biología. Laboratorio de “Ecología molecular y Bioprospeccion”. Carretera Irapuato-Silao Km. 12.5. Col. El Copal, C.P: 36821. Irapuato, Guanajuato. jcolli@itesi.edu.mx

rizósfera concentra una gran actividad metabólica con intercambio de nutrientes entre la atmósfera y el suelo, la cual es mediada por la acción e interacción de plantas y microorganismos del suelo. De modo que la sostenibilidad depende de mantener buenas condiciones físicas, químicas y biológicas en el suelo (Pedraza et al., 2010). Los microorganismos de la rizósfera contribuyen al crecimiento vegetal aumentando la disponibilidad de nutrientes limitantes como el fósforo y el nitrógeno, degradación de celulosa, control biológico y a su vez, la composición y actividad de la comunidad bacteriana, está fuertemente influenciada por el tipo de vegetación presente en el suelo (Thomson et al., 2010). Un ejemplo de un microorganismo de importancia en el suelo por su actividad son las micorrizas ya que contribuyen a la nutrición, particularmente en la absorción de fósforo por las plantas, tanto en ecosistemas agrícolas como naturales. Esta relación simbiótica también mejora la captación de agua y otros nutrientes, además de la transferencia de nitrógeno a partir de distintas fuentes. La simbiosis micorrícica no sólo influye en el ciclado de nutrientes en el sistema suelo-planta, sino que también mejora la sanidad vegetal a través de una protección incrementada contra el estrés, ya sean biótico (por ejemplo, el ataque de patógenos), o abiótico (por jemplo, sequía, salinidad, metales pesados, contaminantes orgánicos, etc.), y mejoran la estructura del suelo a través de la formación de microagregados, necesarios para un buen estado nutricional e hídrico del suelo (Barea et al., 2005).

Dicho lo anterior los microorganismos pueden ser utilizados en el control de fitopatógenos y, por lo tanto, reducir el uso de pesticidas. Los mecanismos que utilizan estos organismos para antagonizar a los fitopatógenos pueden ser la producción de antibióticos, competencia por nutrimentos, competencia por sitios de infección, parasitismo y producción de substancias tóxicas. Por lo general un microorganismo de este tipo presenta un solo tipo de mecanismo o a lo sumo dos de ellos (Krupa y Dommergues, 1979).

Dado a esto es importante conocer la diversidad microbiana en el suelo y su impacto sobre las plantas, siendo estos el objetivo de mayor interés de esta investigación.

METODOLOGIA

Para obtener la caracterización molecular de los aislados fue necesario seguir una serie de técnicas las cuales fueron:

Extracción de ADN
Los procedimientos de extracción de ADN pueden implicar la extracción de células o la lisis directa, depende si las células microbianas se aíslan de su matriz. Un protocolo de extracción generalmente comprende tres pasos: la lisis de células que pueden ser química, mecánica y enzimática, la eliminación de fragmentos de células, la precipitación de ácidos nucleicos y la purificación (Roose-Amsaleg et al., 2001).

El primer paso de este es la siembra que consiste en tomar 100 µL de la cepa e inocularlo en caldo LB, este se dejó crecer por 48 horas a 37°C con una agitación de 200 rev/min.

El cultivo es centrifugado a 11000 rpm para obtener una pastilla, para la lisis se añaden 300 µL de una solución de lisis (EDTA-buffer 10 mM y buffer-Tris (HCl) de pH 8, 0.1M) se mezcló en el homogenizador hasta que se resuspendieran de nuevo las células. Se le agrego SDS al 1% y de nuevo se homogenizaron en tubos con perlas de vidrio.

Para la digestión del RNA se añadieron 1 µL de la solución RNAsa al lisado celular, se mezcló y se incubo a 37°C por 15 min. Después se puso en homogenizo por un minuto.

Para la precipitación de proteínas se añadieron 100 µL de la solución de precipitación de proteínas (acetato de sodio o potasio con pH 5.3 3M) al lisado celular previamente tratado con RNAsa, se mezcló y se incubo a temperatura ambiente por 2 min. Se centrifugo a 11000 rpm durante 5 min y se recuperó el sobrenadante a otro tubo. Se le agrego fenol-cloroformo-isomilico (fenol 25 ml/ cloroformo 24 ml/ isomilico 1 ml) 1 volumen y se homogenizo por 1 minuto. Se centrifugo a 11000 rpm por 5 minutos, se colecto la parte acuosa sin tocar la parte organica y se colocó en un nuevo tuvo. A la muestra recuperada se le agregan 2 volúmenes de Etanol al 100% o absoluto y se mezcló suavemente, se centrifugo nuevamente a 11000 rpm durante 20 min. Se elimina el sobrenadante por decantación y con cuidado, se añade 1 ml de Etanol al 70%. Se limpia el precipitado de ADN y se vuelve a centrifugar 11000 rpm por 5 minutos. Se decanta el etanol con cuidado de que no se mezcle con el precipitado. Se escurre y se deja secar a temperatura ambiente de 10-15 minutos (este puede variar dependiendo de la humedad).

Por último la Hidratación del DNA el cual consistió en añadir 35 µL de agua milli-Q y resuspender el precipitado suavemente. Este se almacena a -20°C hasta su uso.

PCR
La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) transformó radicalmente la ciencia biológica desde el momento en que se descubrió. PCR es una técnica muy sensible que permite la rápida amplificación de un segmento específico de ADN, que permite la detección y la identificación de secuencias de genes utilizando técnicas visuales basadas en el tamaño y la carga. Los ensayos de este requieren la presencia de ADN, los cebadores, nucleótidos, y la DNA polimerasa (Garibyan y Avashia, 2013).

Se tomaron 149 muestras que se sometieron a PCR. Se hizo una mezcla de 25 µL de volumen por cada tubo eppendorf de 1 mL de capacidad. Para la reacción se agregaron 12.5 µL de Supermix, 1 µL de Oligo F_{27}, 1 µL de Oligo R_{147} 1 µL de extracción de ADN y 9.5 µL de agua milli-Q. Después de esto se colocaron los tubos en un termociclador. El sistema consistió en 105°C para calentar la tapa, 35 ciclos con sus respectivos ciclos de acción que se repiten una y otra vez, 94°C, 53°C, 72°C y dos pasos que se programan antes y después de cada ciclo, uno de 94°C para la desnaturalización inicial y un paso ultimo de extensión final a 72°C para permitir que la *Taq* termine de sintetizar todos los fragmentos que pueden haber quedado incompletos. Este proceso tiene una duración aproximadamente de 3 horas y 30 minutos.

Electroforesis en gel de agarosa
El método más ampliamente utilizado para el análisis del producto de PCR es la electroforesis en gel de agarosa, que separa los productos de ADN sobre la base de tamaño y carga. Permite la determinación de la presencia y el tamaño del producto de PCR. Un conjunto predeterminado de productos de ADN con tamaños conocidos se ejecuta simultáneamente en el gel como marcadores moleculares para ayudar a determinar el tamaño del producto estandarizado (Garibyan y Avashia, 2013).

Para la electroforesis en gel de agarosa el gel se preparó al 1%, el cual se pesó dependiendo de las muestras que serían analizadas, agregándolo a una solución de TAE 1X (base tris, ácido acético y EDTA). Este se puso a ebullir y posteriormente sobre la cámara de electroforesis para que gelificara. Una vez que gelifico se cargaron los posos con las muestras, a estas se les agrego 1 µL buffer de carga para DNA y 3 µL de muestra de ADN. Al inicio cada carril se le inserto un marcador de peso molecular (5 µL). Esto se realizó con micropipeta de 0-10 µL. Los productos del PCR fueron separados a 100 Voltios por un tiempo determinado dependiendo del tamaño de la cámara.

ARDRA (amplified ribosomal DNA restriction analysis)
El análisis de restricción (ARDRA) es útil para distinguir géneros o especies filogenéticamente. Este consiste en amplificar el gen ribosomal 16s y aislar las diferentes copias mediante una digestión

enzimática. Con esto se pueden observar los perfiles de bandas después de una electroforesis, para detectar los patrones de restricción establecidos y diferenciar los aislados ya que se agrupan de acuerdo a las similitudes en sus patrones ARDRA combinados (Heyndrickx et al., 1996).

La digestión de las muestras se basaron en una mezcla de 0.5 µL de la enzima Hind III, 0.5 µL de la enzima RSA I, 2 µL de buffer tango, 10 µL de ADN (PCR) y 7 µL de agua milli-Q. Las muestras se incubaron a 37°C por 3 horas y media para el proceso de digestión. Los productos de la restricción fueron separados en un gel de agarosa al 2% en amortiguador TAE durante 3h a 100 voltios.

RESULTADOS Y DISCUSION

De los 149 aislados bacterianos a caracterizar, se obtuvieron 142 amplificados de PCR, los mismos que se sometieron a un Análisis de Restricción (ARDRA). Los geles de agarosa de la electroforesis se observaron en un transluminador de luz UV, donde se tomaron las fotos para el análisis final.

Por ultimo las fotografías capturadas se introdujeron en el programa llamado CLIQS , el cual detecta con precisión carriles y bandas con solo seguir algunos pasos, el resultado es un dendrograma muy claro que nos proporciona las partes agrupadas filogenéticamente, donde los aislados con fragmentos que tienen las mismas bandas tienen relación de parentesco entre especies o taxones en general.

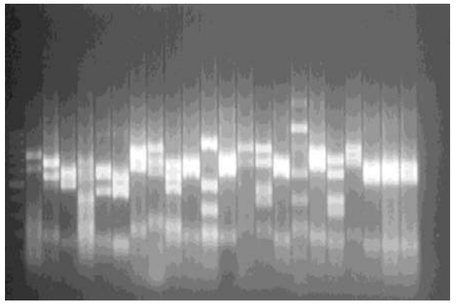


Figura 1. Análisis de restricción en gel de agarosa al 2% Como se puede observar aquí todas las muestras lograron separarse sus bandas y ser visibles para su análisis.

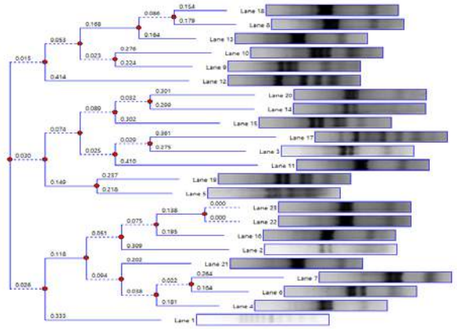


Figura 2. Análisis de restricción mostrados en un dendrograma.

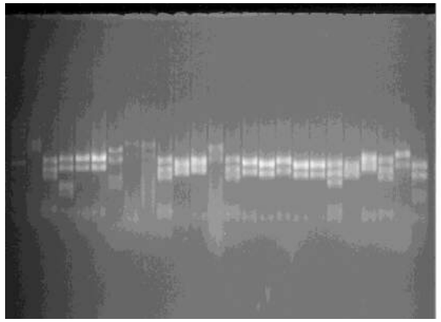


Figura 3. Análisis de restricción en gel de agarosa al 2% mostrándonos las diferencias de tamaños y las bandas de cada muestra, observando también que ciertas en ciertas muestras sus bandas son menos visibles ya que no fueron correctamente digeridas.

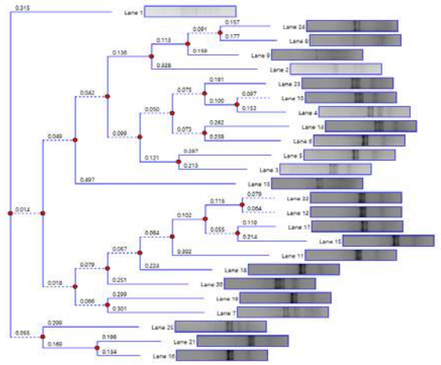


Figura 4. Análisis de restricción de la figura 3 mostrado en un dendrograma observando con claridad el tamaño de cada muestra.

CONCLUSIONES

Las técnicas moleculares como el PCR y el ARDRA las cuales fueron utilizadas en esta investigación son de gran importancia e indispensables para la caracterización molecular de los aislados bacterianos de Guanajuato, ya que son rápidos, específicos y de fácil manejo. La caracterización molecular realizó con éxito y con un porcentaje muy alto de efectividad ya que de las 149 muestras solo 7 fallaron al momento de la lectura y análisis.

Con estos grupos se mandara a secuenciar 1 muestra de cada uno las cuales fueron producto del PCR. En base al Análisis de Restricción se generaran grupos taxonómicamente distintos, con la finalidad de hacer mayores contribuciones de este estudio identificando las diferentes actividades de cada grupo de bacterias, asi como los metabolitos que producen, como ayudan a las plantas, los nutrientes que les aportan y como se relacionan entre si los grupos bacterianos estando en el suelo.

BIBLOGRAFIA

Portugal, V. O., & Gómez, L. A. (1998). Microorganismos y biodiversidad. Terra, 16(3).

Pedraza, R. O., Teixeira, K. R., Scavino, A. F., de Salamone, I. G., Baca, B. E., Azcón, R., ... & Bonilla, R. (2010). Microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos. Revisión. Corpoica. Ciencia y Tecnología Agropecuaria, 11(2), 155-164.

Thomson, B. C., Ostle, N., McNamara, N., Bailey, M. J., Whiteley, A. S., & Griffiths, R. I. (2010). Vegetation affects the relative abundances of dominant soil bacterial taxa and soil respiration rates in an upland grassland soil. Microbial ecology, 59(2), 335-343.

Barea, J. M., Azcón, R., & Azcón-Aguilar, C. (2005). Interactions between mycorrhizal fungi and bacteria to improve plant nutrient cycling and soil structure. In Microorganisms in soils: roles in genesis and functions (pp. 195-212). Springer Berlin Heidelberg.

Krupa, S.V. e Dommergues. Y.R. (1979). Ecology of root pathogens. Elsevier Scientific Publ. Co., Amsterdam, The Netherlands.

Roose-Amsaleg, C. L., Garnier-Sillam, E., & Harry, M. (2001). Extraction and purification of microbial DNA from soil and sediment samples. Applied Soil Ecology, 18(1), 47-60.

Garibyan, L., & Avashia, N. (2013). Polymerase chain reaction. *Journal of Investigative Dermatology*, *133*(3), e6.

Garibyan, L., & Avashia, N. (2013). Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). The Journal of investigative dermatology, 133(3), e6.

Heyndrickx, M., Vauterin, L., Vandamme, P., Kersters, K., & De Vos, P. (1996). Applicability of combined amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) patterns in bacterial phylogeny and taxonomy. Journal of Microbiological Methods, 26(3), 247-259.

AGRADECIMIENTOS

Doctor Juan Gualberto Colli Mull
Comité organizador del verano regional

HONGOS PATÓGENOS OPORTUNISTAS ¿CÓMO IDENTIFICARLOS RÁPIDAMENTE EN INFECCIONES HOSPITALARIAS?

Estrella Alejandra García Araujo[1] y Irene Beatriz Castaño Navarro[2]

RESUMEN

Las candidiasis son una infección cosmopolita, que presentan una alta incidencia y mortalidad, estas son causadas por varias especies del género *Candida* , donde solamente cuatro especies son responsables de aproximadamente el 95% de todas las candidiasis, por lo que una identificación oportuna de la especie es de suma importancia para iniciar la terapia antimicótica apropiada. En el proyecto se trabajo con 31 aislados clínicos provenientes del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, se empleo la técnica de PCR y fue así como se alcanzaron los resultados deseados, ya que del total de muestras, 25 pudieron ser correctamente identificados.

ABSTRACT

Candidiasis is a cosmopolitan infection, which have a high incidence and mortality, these are caused by various Candidas species, where only four species are responsible for about 95 % of all candidiasis, so an early identification of the species it is critical to initiate the appropriate antifungal therapy. In the project I was working with 31 clinical isolates from the National Institute of Medical Sciences and Nutrition Salvador Zubiran, was employed PCR technique and was as desired, since the total samples, 25 could be correctly identified results were achieved.

Palabras clave: Candidiasis, infección, PCR, candida.

INTRODUCCIÓN

Las micosis oportunistas son de gran importancia, ya que en los últimos años se han incrementado, algunos de los géneros que pertenecen a este grupo son: *Candida, Aspergillus, Cryptococcus.*

En este caso el enfoque de estudio es *Candida*, la cual en condiciones normales no afecta al organismo, pero ante determinadas oportunidades que le ofrece el hospedero puede colonizar, infectar y producir enfermedad, además de que puede encontrarse en cualquier lugar del mundo y logra soportar toda clase de condición climática, es comensal del humano y forma biopelículas, que son organizaciones compuestas por microorganismos las cuales se adhieren fácilmente a superficies (Guzmán *et al,* 2011).

Entre las especies más importantes de *Candida* se encuentran *C. glabrata, C. albicans, C. parapsilosis y C. tropicalis*. En un consenso realizado en Latinamérica *C. albicans* fué la más frecuente, seguido de *C. parapsilosis* (Nucci *et al*, CID, 2010) mientras que en un estudio realizado en México en el 2014, *C. tropicalis* resultó ser la segunda más frecuente (Corzo-León *et al*, PLOS ONE, 2014).

Algunas de las características de las especies *Candida* antes mencionadas son las siguientes:

- *C. glabrata* experimenta una alta tasa de crecimiento y es resistente a fluconazol.

[1]Universidad Autónoma de Zacatecas, Unidad Académica de Ciencias Biológicas, Calzada Solidaridad esq. Paseo la Bufa S/N, C.P: 98060, Zacatecas, Zac. estreaga3@hotmail.com
[2]Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, IPICYT, Departamento de Biología Molecular. Camino a la presa San José #2055, Col. Lomas 4ª, C.P: 78216, San Luis Potosí, SLP, icuevas@ipicyt.ed.mx

- *C. albicans* para su supervivencia necesita humedad, así que sus zonas preferidas para habitar son las mucosas, uñas, piel y vagina. Suele ser de fácil contagio, ya que es transmitible por contacto sexual, a través de las manos y diversos objetos.
- *C. parapsilosis* es más común en recién nacidos y adultos jóvenes, además es resistente a equinocandinas.
- *C. tropicalis* muestra una mayor capacidad invasiva, pues de los pacientes que son colonizados, en el 50%- 60% se disemina la candidiasis (Rello, J. 2007).

La frecuencia relativa de estas especies varía según la zona geográfica de donde se aislan y el periodo de tiempo en el que se colectan, pero generalmente *C. albicans* es la más frecuente, seguida de *C. glabrata* o *C. parapsilopsis* y finalmente *C. tropicalis*. El tratamiento de estas infecciones depende de la especie causante y la resistecia de la misma a ciertos antifúngicos, por lo que una idetificación oportuna de la especie es de suma importancia para iniciar el tratamiento apropiado [Pappas, 2006; Pfaller y Diekema, 2010; Morrel *et al,* 2005].

Los métodos convencionales para el diagnóstico de las especies de *Candida* en los hospitales son lentos y poco precisos, mientras que los métodos moleculares presentan una identificación más rápida y sensible. Por esta razón el desarrollo e implementación de este tipo de métodos contribuye a un diagnóstico certero y oportuno para las micosis. Misma razón por la que utilizamos esta técnica en el laboratorio.

MÉTODOS Y MATERIALES

Purificación de las muestras

Consiste en realizar un aislamiento por el método de 5 estrías, después tomar una colonia pura y hacer pastos. Con ello se realizan Freezer stock y se procede a los siguientes pasos.

Extracción DNAg

La extracción de ADN consta de una etapa de lisis, que consiste en romper las estructuras que confinan el citoplasma y liberar al medio su contenido y otra etapa de purificación, que implica retirar de la solución final la mayoría de elementos que pueden interferir en la PCR (Rådström, P. et al. 2004).

PCR

La utilización de la Reacción en Cadena Polimerasa (PCR) por sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction para amplificar cantidades muy pequeñas de DNA ha revolucionado las posibilidades de detectar y analizar especies de DNA (Devlin, 2004). Fue diseñada por Kary Mullis en 1985 y la idea básica de la técnica es sintetizar muchas veces un fragmento de ADN utilizando una polimerasa que puede trabajar a temperaturas muy elevadas, ya que proviene de la bacteria *Thermus aquaticus (Taq)* que vive a altas temperaturas (79 °C a 85 °C) (Eguiarte et al., 2007).

Electroforesis en gel de agarosa

Técnica que usa un gel como tamiz molecular para separar los ácidos nucleicos o las proteínas en función de su tamaño, su carga eléctrica y otras propiedades físicas. Como las moléculas de ácidos nucleicos poseen cargas negativas en sus grupos fosfato, en un campo eléctrico viajan hacia el electrodo positivo. Por tanto la electroforesis separa una mezcla de moléculas de DNA lineal en bandas, cada una formada por moléculas de DNA de la misma longitud (Campbell y Reece, 2007).

RESULTADOS

Los resultados fueron muy buenos ya que de las 31 muestras procesadas solo 6 no pudieron ser identificadas y esto debido a que pertenecen a la especie *C. kruseii* para la cual no tenemos los oligos

diseñados. Sin embargo hubo dos muestras que el hospital no pudo identificar y nosotros por el método molecular si lo logramos, siendo la cepa AN496 que resulto positiva a *C. parapsilosis* y la cepa AN510 que fue positiva a *C. glabrata.*

Muestra	Dx. VITEK	Dx. Molecular
AN480	*C. kruseii*	No detectado
AN481	*C. kruseii*	No detectado
AN482	*C. parapsilosis*	Cp1
AN483	*C. glabrata*	Cg1-Cg2
AN484	*C. glabrata*	Cg1-Cg2
AN485	*C. kruseii*	No detectado
AN486	*C. glabrata*	Cg1-Cg2
AN487	*C. tropicalis*	Ct1-Ct3
AN488	*C. tropicalis*	Ct1-Ct3
AN489	*C. kruseii*	No detectado
AN490	*C. albicans*	Ca2-Ca5
AN491	*C. albicans*	Ca2-Ca5
AN492	*C. albicans*	Ca2-Ca5
AN493	*C. kruseii*	No detectado
AN494	*C. albicans*	Ca2-Ca5

Tabla 1. Muestras analizadas procedentes del Hospital de Nutrición Salvador Zubirán analizadas

Muestra	Dx. VITEK	Dx. Molecular
AN495	*C. parapsilosis*	Cp1
AN496	Desconocido	Cp1
AN497	*C. albicans*	Ca2-Ca5
AN498	*C. albicans*	Ca2-Ca5
AN499	*Candida spp.*	No detectado
AN500	*C. parapsilosis*	Cp1
AN501	*C.tropicalis*	Ct1-Ct3
AN502	*C. tropicalis*	Ct1-Ct3
AN503	*C. tropicalis*	Ct1-Ct3
AN504	*C. glabrata*	Cg1-Cg2
AN505	*C. glabrata*	Cg1-Cg2
AN506	*C. glabrata*	Cg1-Cg2
AN507	*C. glabrata*	Cg1-Cg2
AN508	*C. glabrata*	Cg1-Cg2
AN509	*C. glabrata*	Cg1-Cg2
AN510	Desconocido	Cg1-Cg2

Tabla 2. Segunda parte de las muestras

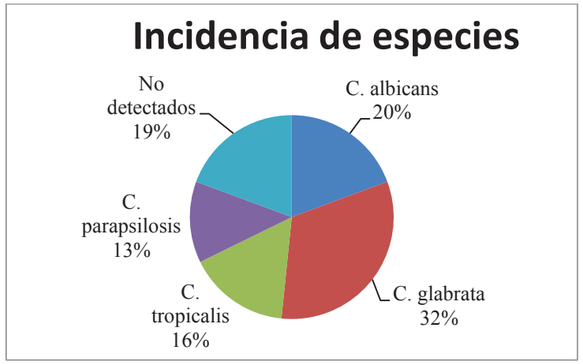


Figura 1. Incidencia de especies conforme a las muestras procesadas

CONCLUSIONES

Como se esperaba, el método molecular para el diagnóstico de *Candida*, si resultó ser rápido y específico, además cabe mencionar que las técnicas moleculares cada vez son más utilizadas en la investigación y tienen un gran potencial pues demuestran ser herramientas útiles, e incluso dan la facilidad de aprender a utilizarce rápidamente en el laboratorio.

La cantidad de muestras que se procesaron mediante PCR se consideró óptima, ya que de 31 muestras analizadas, 25 de ellas pudieron tener un diagnóstico certero.

Finalmente se llego a la conclusión que es importante diseñar oligos específicos para la identificación de *C. krusei,* esto debido a que conforme a nuestro análisis de datos e incidencia de especies resultó ser de las más frecuentes.

BIBLIOGRAFIA

CALDERONE, R. A., & CLANCY, C. J. (Eds.). (2011). *Candida and candidiasis*. American Society for Microbiology Press.

CAMPBELL, N. A., & REECE, J. B. (2007). *Biología.* Ed. Médica Panamericana.

EGUIARTE, L. E., SOUZA, V., & AGUIRRE, X. (2007). *Ecología molecular*. Instituto Nacional de Ecología. Universidad Nacional Autónoma de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad (CONABIO).

GUZMÁN, A., GUZMÁN, R. A., MACCARI, M. F., PIACENZA, V., VÁZQUEZ, A. M., BERTOLDO, P., ... & LEVIN, L. (2011). *Micología médica ilustrada* (No. 616.992). Mc Graw Hill,.

NUCCI, M., QUEIROZ-TELLES, F., TOBÓN, A. M., RESTREPO, A., & COLOMBO, A. L. (2010). Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America.*Clinical Infectious Diseases*, *51*(5), 561-570.

RÅDSTRÖM, P. et al. (2004) Pre-PCR processing: Strategies to generate PCR-compatible samples. Mol. Biotechnol. 26, 133– 46.

RELLO, J. (2007). *Infectious diseases in critical care*. M. KOLLEF, E. DÍAZ, & A. RODRÍGUEZ (EDS.). SPRINGER-VERLAG BERLIN HEIDELBERG.

PFALLER, M. A., & DIEKEMA, D. J. (2010). Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Critical reviews in microbiology*, *36*(1), 1-53.

TAPIA, C., & CORREA, N. (2015). Candida parapsilosis complex. *Revista chilena de infectología*, *32*(5), 569-570.

EVALUACION DE LA PRODUCCION DE ÁCIDO SALICÍLICO POR PSEUDOMONAS SPP

Sergio García Ibarra[1] y Yesica Nataly Mora Cura[2]

RESUMEN

El presente trabajo se planteó evaluar dos medios de cultivo con una pequeña variación en su composición, esto para comparar el crecimiento y producción de ácido salicílico por dos cepas de *Pseudomonas spp*. Con nombre clave de AP3 y PP3 procedentes de la colección de microorganismos de Biorganix Mexicana. Se determinó la concentración de biomasa y extracción de ADN mediante electroforesis en gel agarosa y la técnica de PCR. Se llevó a cabo una cinética de fermentación de AS a nivel laboratorio, después se realizó la cuantificación del metabolito, y posteriormente se procedió a caracterizar bioquímica y molecular la cepa que tuvo una mayor cantidad de AS.

Palabras Clave: Ácido Salicílico, PGBR, Rizósfera, RSA.

ABSTRACT

This work was proposed to evaluate two culture media with a small variation in his composition, this to compare the growth and production of salicylic acid by two strains of *Pseudomonas spp*. Which their codenames are: AP3 and PP3 from the collection of Biorganix Mexicana microorganisms. Biomass concentration and extraction of DNA was determined by agarose gel electrophoresis and the PCR technique. As well, the fermentation kinetics of AS at laboratory, after the quantification of metabolite was performed, and then proceeded to characterize biochemistry and molecular strain that had a greater amount of AS

Key Words: Salicylic Acid, PGBR, Rhizosphere, RSA.

INTRODUCCIÓN

Actualmente una de las tareas principales de la agricultura es la obtención de cultivos más sanos, lo que hace necesaria la protección de estos de plagas y enfermedades. Con este fin se ha llevado a cabo la aplicación de diferentes técnicas agrícolas que disminuyen el uso de plaguicidas químicos, como el control biológico, y se incrementan cada vez más las investigaciones relacionadas con la producción de productos biológicos bajo procesos biotecnológicos novedosos para combatir las plagas y enfermedades en diversos cultivos (Pérez, 2004). Las fitohormonas se caracterizan por participar en variadas respuestas morfogenéticas y de crecimiento de manera pleotrópica, esto quiere decir, que una misma hormona participa en diferentes procesos y además, que dependiendo de su concentración, la misma hormona puede ser estimulatoria o inhibitoria de una misma respuesta. Por otra parte varias hormonas pueden afectar una misma respuesta, lo cual indica que hay una aparente redundancia en el control de un mismo efecto. Cada respuesta ocurre en un tiempo determinado en el desarrollo de la planta y se presenta solamente en un tejido específico u órgano (Srivastava, 2002). La producción agrícola actual con problemas en el consumo de agua, fertilizantes y pesticidas, requiere de estrategias en donde estos insumos se reduzcan, para asegurar el rendimiento vegetal a un costo relativamente bajo, sin deterioro de la fertilidad del suelo.

[1]Universidad Autónoma de Coahuila, Facultad de Ciencias Biológicas, Carretera Torreón-Matamoros Km7.5 Ejido el Águila, Ciudad Universitaria, C.P. 27275, Torreón, Coahuila, Sergio_jons@hotmail.com
[2]Biorganix Mexicana S.A de C.V. Departamento de Microbiología y Biología molecular. Aiera 240 Parque Industrial Ramos Arizpe 25903. Ramos Arizpe Coahuila., México. yesica.mora@biorganix.com.mx

Existe una alternativa que considera al usó de rizomicroorganismos, aquellos que asociados a las raíces de las plantas: mejoran, estimulan y facilitan, el sano desarrollo de la planta a dosis inferiores de fertilizante nitrogenado, fosforado u otros necesarios para un rendimiento rentable (Bashan, 1998; Dashti *et al*., 1998; García *et al*., 1995).

Las bacterias asociadas con la rizósfera de las plantas son capaces de generar varios mecanismos por los cuales afectan positivamente su crecimiento y desarrollo de esta capacidad no está estudiada completamente, particularmente en la agricultura con uso intensivo de agroquímicos. De acuerdo con varios autores (Ahmad *et al*., 2006). Se conocen mecanismos directos e indirectos para la promoción del crecimiento vegetal. Los mecanismos directos se relacionan con la producción de fitohormonas de tipo auxinas y giberelinas o la regulación de hormonas por parte de la planta. Así mismo pueden afectar la disponibilidad de nutrientes por la intervención directa en los ciclos biogeoquímicos. Es el caso de la fijación biológica del nitrógeno y la solubilización de nutrientes tan importantes como el fósforo. Indirectamente las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR sigla en inglés) pueden contribuir mediante la inducción de la resistencia sistémica a fitopatógenos, el control biológico de enfermedades, la producción de antibióticos y de sideróforos (Voinnet, 2005; Rao *et al*., 2000).

El hierro es un elemento esencial para el crecimiento de los organismos, las plantas lo obtienen del suelo y cuando lo la disposición del nutriente es limitado los habitantes de la rizósfera entran en competencia por adquirirlo (De Weger, 1998). Las PGPR producen compuestos de bajo peso molecular llamados sideróforos para obtener completamente este mineral del suelo (Whipps, 2001). Los sideróforos son compuestos que desempeñan la función de solubilizar específicamente el hierro e incorporarlo al metabolismo celular, químicamente, se consideran compuestos ligantes a hierro que funcionan de forma general uniéndose covalentemente a hierro sin generar cambios en el estado de oxidación.

Un compuesto de gran interés dentro de los reguladores del crecimiento vegetal es el ácido salicílico, su síntesis es dependiente de hierro, actúa como sideróforo en condiciones limitantes del metal y es precursor o intermediario en la síntesis de otros sideróforos (Mercado & Blanco, 2001). Una de las respuestas de defensa activas más efectivas es la resistencia sistémica adquirida (RSA). La RSA implica la producción por la planta de una o varias señales móviles que están involucradas en la activación de los mecanismos de resistencia en partes no infectadas. Así, la infección predispone a la planta a resistir efectivamente ataques adicionales (Vlot et al., 2008; Mauch-Mani y Metraux, 1998).

El ácido salicílico forma parte de un amplio grupo de compuestos sintetizados en plantas denominadas fenólicos, los cuales poseen en su estructura química un grupo hidroxilo unido a un anillo aromático. Los compuestos fenólicos participan en muchas funciones metabólicas en plantas, como son la síntesis de lignina, actividad aleopática, y en algunos casos en la biosíntesis de compuestos relacionados a la defensa como las fitoalexinas. El AS participa en procesos como la germinación de semillas, crecimiento celular, respiración, cierre de estomas, expresión de genes asociados a senescencia, respuesta a estrés abiótico y de forma esencial en la termogénesis, así como la resistencia a enfermedades (Raskin, 1992; Métraux y Raskin, 1993; Humphreys y Chapple, 2002; Vlot *et al.,* 2009). Adicionalmente, se ha descrito que en algunos casos el efecto del AS dentro del metabolismo de las plantas puede ser de forma indirecta ya que altera la síntesis y/o señalización de otras hormonas que incluyen la vía del ácido jasmónico (AJ), etileno (ET), y auxinas (Lorenzo y Solano 2005; Broekaert *et al*., 2006; Loake y Grant 2007; Balbi y Devoto 2008).

MÉTODOS Y MATERIALES

1. Preevaluación (screening) de cepas productoras de bioestimulantes
La producción de bioestimulantes se realizó mediante cultivo sumergido durante 48 h a 30 ± 2 a 150 rpm en medio triptona, en matraces Erlenmeyer con 100 mL de capacidad con un volumen de trabajo de 50 mL según el procedimiento establecido por Villa *et al*, 2002. Los extractos de la fermentación fueron evaluados en HPLC para cuantificar la cantidad y tipo de biostimulantes producidos.

2. Identificación bioquímica
Se procedió a identificar bioquímicamente las cepas AP3 y PP3, realizando la prueba de crecimiento en presencia de NaCl al 3%, 5% y 7%, se sometió a una temperatura de 42 °C, además se realizó la prueba API 20NE y ID 32GN.

3. Identificación molecular
Para la obtención y extracción de ADN. Las cepas evaluadas fueron reactivadas en tubos con caldo nutritivo y se dejaron crecer a 30 ± 2 °C por 24 horas. Se transfirió 1.5 mL de caldo microtubos de 2 mL y se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 minutos para obtener biomasa según el procedimiento establecido en Biorganix Mexicana S. A. de C. V. La pastilla resultante de la extracción de ADN se re-suspendió en agua DDE. Se evalúo la calidad e integridad del ADN en electroforesis de geles de agarosa al 1% teñido con SYBR GOLD.

4. Amplificación por PCR
Una vez obtenido el ADN de buena integridad, se procedió a realizar la PCR amplificando el gen que codifica para la unidad ribosomal 16S desarrollando el método establecido en Biorganix S. A. de C. V. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 95 °C por 5 min, 35 ciclos de 94°C 1 min+ 55 °C 1 min + 72 °C min; y una elongación a 72 °C por 5 minutos. Una vez concluida la PCR se procedió a verificar la amplificación mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5%. Cuando los amplificados presentan bandas inespecíficas o residuos de reactivos se procedió a una purificación del amplificado. Los amplificados se envían a secuenciar a Macrogen USA Maryland.

5. Evaluación en la producción de metabolitos (ácido salicílico)
La producción de ácido salicílico se realizó mediante cultivo sumergido durante 48 h, en matraces Erlenmeyer con 100 mL de capacidad con un volumen de trabajo de 50 mL según el procedimiento establecido por Villa *et al,* 2002. Con modificación en el medio de cultivo para evaluar 2 medios de cultivo diferentes T1 y T2 (Tabla 1) por 2 cepas de *Pseudomonas spp.* (AP3 y PP3). El cultivo se centrifugó para separar la biomasa 8,000 rpm durante 15 min en una centrifuga HERMLE Z300. Se hicieron extracciones tomando una alícuota de al menos 5 mL por muestra, así como el solvente adecuado (Acetato de etilo) según la metodología desarrollada por Castillo G., 2004. El solvente utilizado en la fase móvil fue metanol-agua; ácido acético 0.5% (60:40:). Se realizó la determinación de ácido salicílico por HPLC.

Tabla 1. Medios de cultivo evaluados

gL-1	Medio T1	Medio T2
Ácido Glutámico ($C_5H_9NO_4$)	1	-
Glutamato monosódico ($C_5H_8NO_4Na$)	-	1
Sulfato de amonio ($(NH_4)_2SO_4$)	1	1
Sulfato de Magnesio ($MgSO_4$)	0.25	0.25
Fosfato dipotásico (K_2HPO_4)	1	1

RESULTADOS

Preevaluación (screening) de cepas productoras de bioestimulantes

En la pre-evaluación de las cepas se encontró que ambas producen fitohormonas como ácido giberélico, ácido indolacético y citoquininas como kinetina y 6-bencialaminopurina (Tabla 2). Además se encontró que la cepa AP3 también produce ácido salicílico.

Tabla 2. Bioestimulantes producidos por las cepas evaluadas

Reactivo	Ácido Giberélico ppm	Ácido indolacético ppm	Kinetina ppm	6-BAP ppm	Ácido salicílico ppm
AP3	1991.50	2.40	2.99	4.94	353.73
PP3	7313.08	1.28	1.24	-	-

La caracterización por biología molecular nos indica que ambas cepas pertenecen al género de *Pseudomonas*, sin embargo, no se logró diferencias a nivel de especie. En las Tablas 3, 4 y 5 se presenta la caracterización bioquímica de las cepas AP3 y PP3.

Tabla 3. Resultados de pruebas bioquímicas

Tratamiento	AP3	PP3
42 °C	+	+
Medio con NaCl 3%	+	+
Medio con NaCl 5%	+	+
Medio con NaCl 7%	-	-

Tabla 4. Resultados de API 20NE

API 20NE	AP3		PP3	
	24	48	24	48
NO3	-	-	-	-
TRP	+	+	-	-
GLU	-	-	-	-
ADH	-	-	-	-
URE	-	-	-	-
ESC	-	-	-	-
GEL	+	+	-	-
PNPG	-	-	-	-
GLU	+	+	+	+
ARA	-	-	-	+
MNE	-	-	+	+
MAN	+	+	-	-
NAG	-	+	-	-
MAL	-	-	-	-
GNT	+	+	+	+
CAP	+	+	+	+
ADI	-	+	-	-
MLT	+	+	+	+
CIT	+	+	+	+
PAC	-	-	+	+
OX	+	+	+	+

Tabla 5. Resultados de ID 32 GN

		AP3		PP3	
		24 h	48 h	24 h	48 h
RHA	L-Rhamnosa	-	-	+	-
NAG	N-acetil-glucosamina	-	+	-	-
RIB	D-ribosa	-	-	-	+
INO	Inositol	-	-	-	-
SAC	D-sacarosa	-	-	-	-
MAL	D-maltosa	-	-	-	-
ITA	Ácido itacónico	+	+	-	-

SUB	Ácido subérico	-	-	-	-
MNT	Malonato sódico	+	+	+	+
ACE	Acetato sódico	+	+	+	+
LAT	Ácido láctico	+	+	+	+
ALA	L-alanina	+	+	+	+
5KG	5-cetogluconato potásico	-	-	-	-
GLYG	Glicógeno	-	-	-	-
mOBE	Ácido 3-hodroxibenzóico	-	-	-	-
SER	D-serina	-	-	+	+
MAN	D-manitol	+	+	-	-
GLU	D-Glucosa	+	+	+	+
SAL	Salicina	-	-	-	-
MEL	D-melobiosa	-	-	-	-
FUC	L-fucasa	-	-	-	-
SOR	D-sorbitol	-	-	-	-
ARA	Arabinosa	-	-	-	+
PROP	Ácido propiónico	+	+	+	+
CAP	Ácido cáprico	+	+	+	+
VALT	Ácido valérico	+	+	+	+
CIT	Citrato trisódico	+	+	+	+
HIS	L-histidina	+	+	+	+
2KG	2-cetogluconato potásico	+	+	+	+
30OBU	Ácido 3-hidroxibutírico	+	+	+	+
pOBE	Ácido 4-hidroxibenzóico	+	+	+	+
PRO	L-prolina	+	+	+	+

Evaluación en la producción de metabolitos (ácido salicílico)

Se logró hacer la cinética de fermentación y los extractos purificados de la fermentación se enviaron cuantificar mediante HPLC; sin embargo, se está en espera de los resultados.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados de la API 20NE, se compararon en una base de datos de Biomérieux encontrando que la cepa AP3 tienen una referencia como *Pseudomonas aeruginosa* con un 99.00% se similitud y PP3 con *Pseudomonas putida* con un 98.60% de similitud en el sistema APIweb.

En la pre-evaluación las cepas evaluadas producen diversos bioestimulantes, se obtuvieron mayores niveles de producción en la cepa *Pseudomonas aeruginosa* (AP3) en el medio triptona; mientras que la otra cepa de *Pseudomonas putida* (PP3) tiene una producción intermedia o baja. Siendo la *pseudomona aeruginosa* (AP3) la que mostró mayor nivel de producción de ácido salicílico.

BIBLIOGRAFIA

Ahmad F, Ahmad I, Khan MS. 2006. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research*. 2008. 36:1-9.

Bashan, Y. 1998. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotech. Advances* 16:729-770.

Castillo G., Desarrollo de Métodos cromatográficos para la Determinación de Giberelinas y Auxinas para estudio de su Biosíntesis. Tesis de Maestría. Facultad de Química, Universidad de la Habana, 2004.

Dashti, N., Zang, F., Hynes R., 1998. And increase nitrogen fixation activity by field grown soybean (Glycine max L) Merr. Under short season conditions. *Plant and Soil.* 200:205-213

De Weger L. A., Van Arendonk J., Recourt K., Van Der Hofstad G., Weissbeek P., Lugtemberg B. 1998. Siderophore-mediated uptake of Fe3+ by the plant growth-stimulating *Pseudomonas putida* Strain WCS358 and by other rhizosphere microorganisms. *J. Bacteriology* 170(10):4693-4698.
García, G. M. M., Moreno,.P., Peña-Cabriales, J.J y Sánchez-Yáñez, J.M. 1995. Respuesta del maíz (Zea mays L) a la inoculación con bacterias fijadoras de N2. *TERRA* 13: 71-79.
Humphreys, J.M. y C. *Chapple. (2002). Rewriting the lignin roadmap. Current Opinion in Plant Biology.* 5: 224-229.
Mauch-Mani, B. y J.P. Metraux. (1998). *Salicylic acid and systemic acquired resistance to pathogen attack. Annals of Botany.* 82: 535-540.
Mercado J, Koem M, Van Der Drift M, Olsson P, Thomas J, Van Loon L, Bakker P. 2001. Analysis of the *pmsCEAB* gene cluster Involved in biosynthesis of salicylic acid and the siderophore pseudomonine in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* WCS374. *J Bacteriology* 183(6):1909-1920.
Métraux, J.P. y I. Raskin. (1993). *Role of phenolics in plant disease resistance. In Biotechnology in Plant Disease Control*, ed. I Chet, 11:191–209. New York: JohnWiley & Sons.
Pérez. C N: Control biológico de Patógenos Vegetales. Manejo ecológico de Plagas 2004, P 231- 354 Ed CEDAR, ISBN: 959-246-083-3.
Rao M, Lee H, Creelman R, Mullet J, Davirs K. 2000. Jasmonic acid signaling modulates ozone-induced hypersensitive cell death. *Plant Cell* 12:1633-1646.
Raskin I. (1992). Role of salicylic acid in plants. *Annual Review of Plant Physiology*. 43: 439-463.
Srivastava, L. M. (2000). *Plant growth and development. Hormones and the environment* (Edition 1st) Academic Press, San Diego California, ISBN: 978-0-12-660570-9.
Villa P., M. Díaz de Villegas M.E., Stefanova M., Rodríguez J., Michelena G., Gutiérrez I., Frías S. A., Procedimiento de obtención de metabolitos antifúngicos de *Pseudomonas Aeruginosa* PSS por vía biotecnológica Patente Certificado No. 22805, Resolución No.1079/2002.
Vlot, A.C. Dempsey, D.A. y *D.F. Klessig*. (2009). *Salicylic acid*, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology*. 47: 177-206.
Vlot, A.C. D.F. Klessig. y S.W. Park. (2008). *Systemic acquired resistance: the elusive signal(s). Current Opinion in Plant Biology.* 11: 436–442.
Voinnet O. 2005. RNA silencing compared with innate immunity. *Nature* Rev Gen 6:206-220.
Whipps J. M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rizosphere. *J. Exp. Botany* 52:487-511.

CARACTERIZACIÓN DE UNA ASPARAGINASA PARA EL TRATAMIENTO DE LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

Aurora del Carmen García López[1] y Martha Leticia Santos Martínez[2]

RESUMEN

La L-asparaginasa, es una enzima que hidroliza L-asparagina en L-aspartato y amoniaco, su acción quimioterapéutica se utiliza como tratamiento en la leucemia linfoblástica aguda (LLA). La L-asparaginasa generalmente se obtiene de *E. Coli* o *Erwina chrysanthemi*, sin embargo la alta incidencia de hipersensibilidad ha limitado su uso. Durante la secuenciación del genoma de *Thermoplasma acidophilum* se encontró el orf Ta0338 que codifica para una L-asparaginasa tipo planta semejante a la humana. Este estudio consistió en la sobreexpresión de dicha enzima mediante expresión heteróloga utilizando el sistema pET28a+ para su producción en *E. coli*, posteriormente fue sometida a métodos de purificación y medición de actividad enzimática. Se espera que posteriormente dicha proteína sea utilizada en estudios con líneas celulares leucémicas para medir su actividad antineoplásica.

ABSTRACT

The L-asparaginase is an enzyme that hydrolyzes L-asparagine on L-aspartate and ammonia, its chemotherapeutic activity is used for the treatment of acute lymphoblastic leukemia. The L-asparaginase is usually obtained of *E. coli* or *Erwina Chrysanthem,* however the high incident of hypersensitivity has limited its use. During the sequencing of the *Thermoplasma acidophilum´*s genome, an orf Ta0338 that codes for a type plant L-asparaginase (human-like) was found. This study consisted in the overexpression of the heterologous version using pET28+a system in *E.coli*. After that, the enzyme was subject to purification and enzymatic activity studies. We expect this protein could be used in leukemic cell lines studies to measure its antineoplastic activity.

Palabras Clave: L-asparaginasa, LLA, *Thermoplasma acidophilum*.

INTRODUCCIÓN

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es la enfermedad maligna más frecuente en niños. Su pronóstico ha mejorado sustancialmente en las últimas décadas gracias al desarrollo de fármacos y protocolos terapéuticos más eficientes, pero a pesar de estos avances hay un fracaso en el tratamiento en 15-20% de los pacientes, en su mayoría por recaídas (NARTA et al, 2007).
Una de las características diferenciales de estas células malignas son las alteraciones metabólicas, que son la base de una modalidad de tratamiento selectivo antitumoral, dentro de la cual se encuentra la L-asparaginasa (L-ASP).
La L-ASP se utiliza como un agente quimioterapéutico para tratar una serie de trastornos linfoproliferativos, especialmente la LLA y el linfoma no Hodgkin. Se estima que unos 6000 casos nuevos (3400 varones y 2600 mujeres) de LLA se diagnostican cada año en los EE.UU (INABA et al, 2013).
La L-ASP (EC 3.5.1.1) es una enzima que cataliza la hidrólisis de la L-asparagina en L-aspartato y amoniaco. La síntesis de proteínas, tanto en células normales como en malignas, depende parcialmente de la presencia de asparagina exógena y, en ciertos tipos de células (linfoblastos, leucémicas), esta

[1] Universidad Autónoma de Aguascalientes; Av. Universidad No. 940, Ciudad Universitaria, C.P: 20131, Aguascalientes, Ags. México, aura115@hotmail.com
[2] Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, División de Biología Molecular; Camino a la presa San José No. 2055, Lomas 4ª Sección, C.P: 78216, San Luis Potosí, S.L.P. México, Isantos@ipicyt.edu.mx

dependencia es virtualmente total. La depleción enzimática de la asparagina por la asparaginasa, inyectada en el plasma, depriva a las células de este factor esencial, lo que no sólo interrumpe el crecimiento, sino que también puede conducir a la muerte celular y la regresión del tumor.
Hay dos tipos de L-ASP bacteriana, tipo I y tipo II, pero sólo la tipo II tiene actividad antileucémica. Las L-asparaginasas tipo II de bacterias son homotetrámeros, compuestos por subunidades con aproximadamente 300 aminoácidos.
La L-ASP se encuentra naturalmente en muchas especies. Las que poseen actividad antileucémica, generalmente se obtienen de *E. coli* y *Erwina chrysanthemy*. Debido a este origen bacteriano, el principal problema en la utilización de la L-ASP es la hipersensibilidad, que se desarrolla en un 3-78% de los pacientes tratados con las formas no modificadas de la enzima (EINSFELDT et al 2016).
Las reacciones de hipersensibilidad comprenden un espectro que abarca desde un rash leve hasta anafilaxia fatal. Estudios sobre la L-ASP de *E.coli* y *E. chrysanthemy* han encontrado que ambas enzimas demuestran inmunogenicidad y, cada una se ha utilizado como alternativa para pacientes que desarrollan hipersensibilidad a la otra forma.
A pesar de su indiscutible indicación en los últimos 50 años, siguen existiendo numerosos puntos de controversia, y su uso todavía sigue marcado por los efectos secundarios, la vida media corta de las formas nativas y la administración, que afecta la calidad de vida de estos pacientes por la frecuencia con la que han de acudir al centro hospitalario y las múltiples punciones que conlleva.
Durante la secuenciación del genoma *Thermoplasma acidophilum* se encontró el orf Ta 0338 que codifica para una L-ASP semejante a la humana. Este estudio, por tanto, tuvo como objetivo clonar y expresar L-asparaginasa de *T.acidophilum* en E. coli usando el plásmido pET28+, proteína que, posteriormente fue sometida a métodos de purificación y medición de actividad enzimática.

MÉTODOS Y MATERIALES

El orf Ta0338, de *Thermoplasma acidophilum* que codifica para la L-asparaginasa, se amplificó anteriormente mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se añadieron dos sitios de restricción NcoI y XhoI. El producto de la amplificación por PCR midió 825pb y fue clonado dentro del vector de expresión pET28+ donde se le añadieron 6 etiquetas de histidina C- terminal (6xHis-tag).

Conservación de células y Miniprep
El cultivo de células transformadas con el plásmido pET28+ se dejó crecer a 37ºC por 24hrs, se seleccionó una colonia que fue inoculada en medio LB líquido, de este último se tomaron 850µL y se mezclaron con 150µL de glicerol, se transfirió a un crioval y se almacenó a -80ºC.
Para el miniprep se tomaron 5ml del cultivo y se centrifugó a 8000rpm por tres minutos a temperatura ambiente se obtuvo un pellet al que fue añadido 250 µL de P1 Buffer, 250 µL P2 Buffer, 350 µL N3 Buffer, se centrifugó a 13000rpm por 10min, el sobrenadante se colocó en una columna QIAprep, que se lavó con 750 µL PEBuffer, se sometió a varios pasos de centrifugación y lavado; a los 50 µL de ADN obtenido se le añadió NE Buffer. Se realizó análisis de electroforesis en un gel de agarosa al 1%, durante 60 minutos a 80V con Buffer TAE 50 X, donde fue observada la proteína.

Tipificación molecular de las clonas de *E. coli* mediante digestión y PCR
Las células transformadas fueron sometidas a un proceso de digestión con la enzima de restricción XhoI. Para los reactivos y soluciones se utilizaron: DNA plasmídico a una concentración final de 1µg, Enzima XhoI 30U, Buffer NE 1X, BSA 1X, agua 9.75 µL con un volumen total de 25µL
Se incubó a 37ºC por una hora en el Thermomixen para posteriormente cargar la muestra en un gel de agarosa al 1% con Buffer TAE 1X, se corrió a 120V hasta observar que el colorante estuviera próximo al final del gel.
La detección del gen de la asparaginasa de *T. acidophilum* en plásmido se realizó mediante PCR. Se utilizó el plásmido pET28a(+)-Ta0338 100pg/µL extraído por miniprep, los primers Ta0338-1 F1, R1, Ta0338-2 F2 y R2 a 10 µMol, Buffer PCR 10X, Taq Polimerasa 5U/ µL, dNTP`s 10mM y agua estéril MQ.

La electroforesis se realizó con Agarosa al 1%, Buffer TAE a 0.5X, usando bromuro de etidio como revelador y como marcador de peso molecular Thermo Scientific ruler 1Kb DNA ladder.

Sobrexpresión heteróloga de la proteína L-ASP
Se inocularon 100mL de medio precalentado, que contenía kanamicina y cloranfenicol, con 5mL de cultivo; se dejó crecer con agitación vigorosa hasta que alcanzó una OD_{600} de 0.6. Se tomó una muestra "control no inducido" inmediatamente antes de la inducción y se congeló a -20ºC hasta el análisis SDS-PAGE.
Para inducir la expresión se añadió IPTG a una concentración final de 1mM. Se tomaron muestras de 1mL cada 4 horas, se centrifugaron a 4000rpm por 20 minutos y posteriormente fueron congeladas, el restante (45mL) fue colocado en tubos que se centrifugaron y congelaron de igual forma a -20ºC.

Purificación de L-ASP por cromatografía de afinidad por niquel
Preparación del lisado celular.
Se centrifugaron los 45mL del cultivo inducido para recuperar las células de *E. coli*. El pellet obtenido se resuspendió en Buffer de lisis NPI-10, posteriormente se añadió lisozima y se incubó en hielo. Se centrifugó el lisado y se recolectó el sobrenadante. Se guardaron 20µL del lisado limpio para posterior análisis SDS-PAGE.
Preparación de la columna Ni-NTA.
Se equilibró la columna de purificación Ni-NTA con Buffer NPI-10 y se centrifugó por 2 min a 2900rpm.
Purificación de la proteína recombinante.
Se cargaron 1200µL del lisado limpio que contenía la proteína de interés con las 6 etiquetas de histidina sobre la columna pre-equilibrada Ni-NTA, se centrifugó y se recolectó el eluido. Para eliminar las proteínas no deseables se lavó la columna Ni-NTA en dos ocasiones con Buffer de lavado NPI-20. Posteriormente se eluyó la proteína en dos ocasiones con Buffer de elución NPI-500, se centrifugó y se recolectó el eluido. Se dializó con buffer Tris-HCl (10mM, pH 7.5). Finalmente se analizaron todas las muestras incluidas las eluciones, por SDS-PAGE; utilizando como marcador de peso molecular BenchMark Ladder.

Cuantificación de la proteína por el método de Bradford
La proteína purificada fue cuantificada por el método BIO-RAD basado en el método de Bradford. La composición de los estándares y el blanco se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Cantidades de las soluciones y reactivos utilizados para el método de Bradford.

Tubos	Agua destilada estéril µL	Albúmina Bovina Sérica BSA[2µg/µL] µL	Muestra obtenida de la purificación de la proteína µL
Blanco	1000	0	0
No.1	999	1	0
No.2	998	2	0
No. 3	997	3	0
No.4	996	4	0
No.5	995	5	0
No.6	994	6	0
No.7	993	7	0
No.8	992	8	0
No.9	991	9	0
No.10	990	10	0
Muestra 1	990	0	10
Muestra 2	990	0	10

A cada uno de los tubos se le agregaron 300µL del colorante Bio-Rad protein assay solution®, se mezclaron suavemente y se dejaron reposar durante 15minutos. Una vez concluido el tiempo se leyó la absorbancia y concentración de cada uno de los tubos en el espectrofotómetro a 595nm. Se calculó la concentración real de la muestra de acuerdo a una curva estándar de BSA.

Determinación de la actividad enzimática de la proteína

Se prepararon las siguientes soluciones: hidróxido de sodio 4M, hipoclorito de sodio 0.2%, solución fenol-nitroprusiato, buffer de dilución de ácido cítrico 0.1M pH 5, solución de sustrato de L-asparaginasa, solución TCA stop, solución Estándar (3.9g de sulfato de amonio, 40mL de buffer de dilución de ácido cítrico).
Posteriormente con la Solución Estándar se realizaron diferentes diluciones (Tabla 2).

Tabla 2. Diluciones realizadas para la actividad enzimática

Dilución	Factor de dilución	Concentración mg/mL	Volumen de solución estándar mL
S1	60	1.3	0.833
S2	30	2.6	1.666
S3	10	7.8	5
S4	6	13.0	8.3
S5	4	19.5	12.5

En 5 nuevos tubos se agregaron 2mL de la solución sustrato, se incubaron por 10 min. Se añadieron 100µL de cada una de las diluciones anteriores a un tubo diferente, se incubaron por 30min. Se añadió a cada uno 0.4mL de la solución TCA-stop y posteriormente 2.5mL de agua.

Para el blanco sin dilución, se añadió en el tubo 2ml de solución sustrato, 100µL de agua destilada, 0.4mL de solución TCA-stop y 2.5mL de agua. Para el blanco muestra, 2ml de solución sustrato, 100µL de solución control, 0.4mL de TCA-stop y 2.5mL de agua. Y finalmente para el tubo muestra se colocaron 2mL de solución sustrato, 100µL de solución control, 0.4mL de TCA-stop y 2.5mL de agua.
Posteriormente de cada tubo, incluyendo los blancos y la muestra, se tomaron 20µL a los que se les añadió agua destilada, fenol-nitropusiato e hipoclorito de sodio al 0.2%. Los tubos fueron incubados por 10 minutos a 37ºC. De cada tubo se tomó 1mL para colocarse en celdas de espectrofotometría, y se realizó una curva de BSA.

RESULTADOS

Resultado del análisis de PCR (Figura 1a) que se realizó para asegurarnos de que los cultivos con los que estuvimos trabajando efectivamente contenían el gen de *T. acidophilum* que codifica para L-ASP, se pudo observar un producto de 6050pb que comparado con un estudio anterior (GUZMÁN at el, 2014) se confirma que se trata del tamaño del vector con el gen insertado. Se planeó repetir las pruebas de PCR para descartar errores en la técnica, desafortunadamente la prueba se realizó al final de la investigación, por lo que no se cuenta con el resultado del análisis. Resultados de la sobreexpresión heteróloga de la proteína L-ASP (Figura 1b), en el carril 1, correspondiente a la hora 8 posterior a la inducción con IPTG se puede contemplar un aumento significativo en la concentración de la proteína. El proceso de purificación (Figura 1c) arrojó una proteína de 32kDa que concuerda con el tamaño del estudio anterior de dicha proteína.

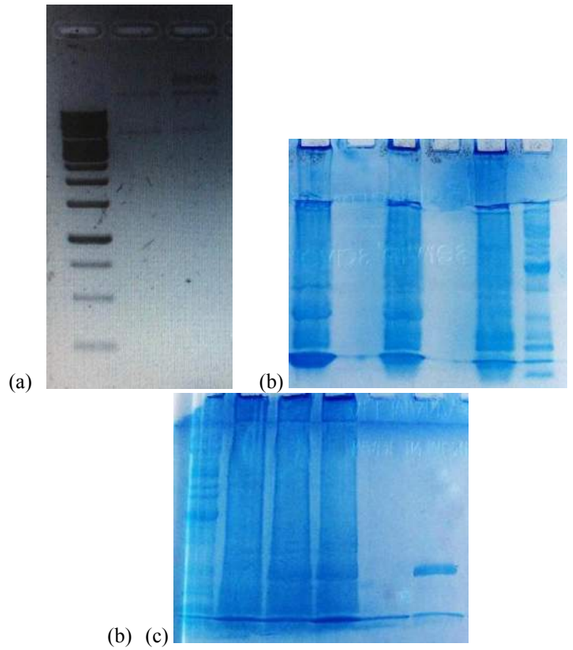


Figura 1. (a) Análisis de PCR usando gel de agarosa al 1%, en el carril 1 se observa el marcador 1kbp DNA ladder, carril 2 y 3 el producto del PCR 1 y PCR 2 de L-ASP de T. acidophilum. (b) Análisis SDS-PAGE de la sobrexpresión heteróloga de la L-ASP de T.acidophilum, carril 1 corresponde la hora 8 posterior a la inducción con IPTG, carril 2 y 4 libres, carril 3 a la hora 4, carril 5 muestra tomada al momento de la inducción y carril 6 marcador de peso molecular. (c) Análisis SDS-PAGE de la purificación de L-ASP de T. acidophilum, en el carril 1 se observa el marcador de tamaño Bench Ladder, carril 2 proteína dializada, carril 3 proteína dializada e incubada por 24hrs a 37ºC, carril 4 proteína dializada e incubada por 48hrs a 37ºC, carril 5 libre y carril 6 se observa la proteína dializada e incubada por 72hrs a 37ºC.

Se determinó la concentración de la proteína por BIO-RAD basado en el método de Bradford, donde se le adicionó un colorante ácido y la subsecuente medición a 595nm con un espectrofotómetro, la comparación con una curva estándar de BSA proporcionó una medida relativa de la concentración de la proteína de 0.195 mg/mL (Figura 3).

La actividad enzimática se determinó a partir de la curva estándar de $(NH_4)_2SO_4$ que se observa en la Figura 4. Obteniendo así, 4488.02 ASPU/g de actividad enzimática.

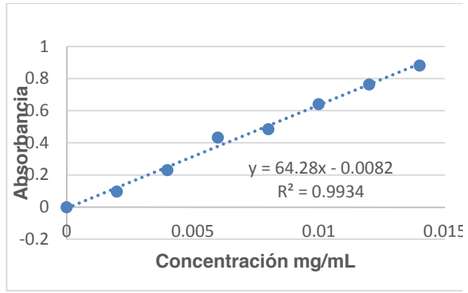


Figura 2. Curva de calibración de BSA de la cuantificación de proteínas por el método de Bradford. Se calculó la concentración de acuerdo a la fórmula $y = m \cdot x + b$, donde y= absorbancia de la muestra, m= pendiente de la curva estándar, b= ordenada al origen y x= la concentración de proteína total de la muestra.

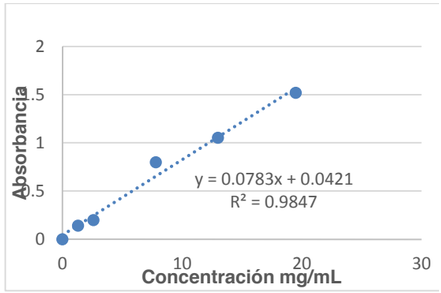


Figura 3. Curva estándar de $(NH_4)_2SO_4$ para medir actividad enzimática de la L-asparaginasa de T. acidophilum.

CONCLUSIONES

Este estudio reporta el análisis de una asparaginasa derivada de un gen de la arquea *Thermoplasma acidophilum*, que fue tipificada, sobrexpresada y purificada satisfactoriamente. Dicha proteína recombinante promete ser una innovación en el tratamiento de la LLA por sus propiedades termoestables y su estructura similar a la producida por el humano por lo que se planea posteriormente analizar la actividad antineoplásica de dicha proteína sobre líneas celulares leucémicas.

BIBLIOGRAFIA

ALFONSO, R. (2003). *Remington Farmacia,* Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.

GUZMÁN, G., SERNA, M. & SANTOS, L. (2014). "Identification, heterologous expression and detection of enzymatic activity of an asparaginase from the archaeon *Thermoplasma acidophilum*" en *Biocatalysis and Biotransformation,* Núm 5-6, Vol. 32, [pp.295-301].

GUILLEME, C., DELGADO, R., NAVARRO, J., AGUIRRE, I., SOLÀ, S., SÁNCHEZ, J. & LÓPEZ, L. (2013). "Actualización del tratamiento con L-asparraginasa en Pediatría" en *Anales de Pediatría*, Núm 5*,* Vol. 79, [pp. 329-e10].

EINSFELDT, K., BAPTISTA, I., PEREIRA, J., COSTA, I., DA COSTA, E., RIBEIRO, M. & ALMEIDA, R. (2016). "Recombinant L-Asparaginase from Zymomonas mobilis: A Potential New Antileukemic Agent Produced in Escherichia coli" en *PloS one*, Núm 6, Vol.11, e0156692.

INABA, H., GREAVES, M., & MULLIGHAN, C. G. (2013). "Acute lymphoblastic leukaemia" en *Lancet*, Núm. 9881, Vol. 381, [pp.1943-1955].

NARTA, U. et al. (2007). "Pharmacological and clinical evaluation of L-asparaginase in the treatment of leukemia" en *Critical Reviews in Oncology / Hematology*, Vol. 61, [pp.208 - 221].

PROPAGACIÓN IN VITRO DE *MORINGA OLEIFERA*

Eddaliz García Reyes[1] y José Francisco Morales Domínguez[2]

RESUMEN

Se realizó la propagación in vitro de *Moringa oleifera* partiendo de explantes de 1 cm de longitud tomados de plántulas de semillas germinadas, establecidas en el laboratorio de Biología Molecular por otros alumnos, los cuales fueron colocados en medio MS (Murashi y Skoog) básico. Algunas plantas del laboratorio que mostraban buen crecimiento de raíz y hojas se utilizaron para seguir propagando y generar nuevas plántulas, otras se aclimataron. Se evaluó un método de generación de raíces con reguladores AIA y BAP, colocando explantes en cajas petri con MS+ los reguladores. Por otra parte se realizó transformación genética con la cepa ARqui 1 y K599 de *Agrobacterium rhizogenes*, tomando tallos con un corte transversal y hojas. Además se extrajo ADN.

ABSTRACT

Was performed in vitro propagation of *Moringa oleifera* starting explants of 1 cm long taken from seedlings seeds germinated, established in the laboratory of Molecular Biology by other students, who were positioned in MS (Murashi and Skoo) basic. Some laboratory plants showing proper growth of roots and leaves were used for continue to propagate and generate new seedlings, other acclimated. A method evaluated of generation of roots with BAP and AIA regulators, placing explants in petri dishes with MS+ regulators. On the other hand genetic transformation was performed using the ARqui 1 and K599 stock of *Agrobacterium rhizogenes*, taking a transversal cut stems and leaves. Furthermore DNA was extracted.

Palabras clave: Propagación, Explantes, Transformación, Moringa, Plántulas.

INTRODUCCIÓN

Moringa oleifera Lam conocido comúnmente como el árbol de rábano, árbol de banquetas, marango, moonga, mulangay, aceite de árbol de Ben o Moringa. Pertenece a la familia Moringaceae, un grupo pequeño de plantas dentro del inmenso orden Brassicales que incluye la familia de la col y del rábano, junto con la familia del mastuerzo y de las alcaparras (APG, 2009). Moringaceae comprende únicamente un género, Moringa. Dentro de Moringa hay 13 especies (Verdcourt, 1985; Olson, 2002a), las cuales abarcan una gama muy diversa de hábitos o formas de crecimiento, desde hierbitas y arbustos hasta árboles grandes (Olson y Razafimandimbison, 2000; Olson, 2001a y 2001b). Moringaceae se distingue de las otras familias por una combinación única de rasgos (Olson, 2010). Sus especies se caracterizan por tener hojas pinnadas grandes, en donde cada hoja está dividida en muchos folíolos dispuestos sobre un armazón llamado raquis. Los frutos forman una cápsula larga y leñosa que cuando alcanza la madurez se abre lentamente en 3 valvas que se separan la una de la otra por su longitud, quedando pegadas sólo en la base del fruto. Las semillas presentan 3 alas longitudinales. La combinación de hojas pinnadas, frutos trivalvados y semillas con 3 alas hace que sea muy fácil reconocer una Moringa. Para asegurar la identificación, se pueden buscar las glándulas

[1] Universidad Autónoma Agraria Antonio narro, Departamento de Fitomejoramiento, Calzada Antonio Narro 1923, Buenavista, C. P. 25315, Saltillo, Coahuila, México. tics41133190@gmail.com
[2] Universidad Autónoma de Aguascalientes, Centro de Ciencias Básicas, Departamento de Química, Avenida Universidad 940, Ciudad universitaria, Villas de la universidad, C. P. 20131, Aguascalientes, Ags., México.
jfmoral@correo.uaa.mx

foliares características de esta familia, las cuales se encuentran en ambos lados flanqueando la base o en el ápice del pecíolo y en la mayoría de las articulaciones del raquis. Otras características únicas de la familia, pero menos fáciles de observar, incluyen el estilo hueco y las anteras con 2 esporangios o cámaras para el polen en vez de los 4 que suelen presentar las plantas con flor (Olson, 2003). Características aún menos aparentes incluyen los ductos de goma en la médula de los tallos y elementos de vaso con placas de perforación sin bordes (Olson y Carlquist, 2001; Olson, 2002b). M. *oleifera* se ha registrado en los bosques tropicales caducifolios del noroeste de la India y en el este de Pakistán (p.ej. Haines, 1922), en la zona entre Simla en la India y Faisalabad en Pakistán (Verdcourt, 1985). En contraste con lo poco que se sabe acerca de su distribución natural, queda ampliamente comprobado por registros de herbario que M. *oleifera* se cultiva en todos los países tropicales del mundo (Verdcourt, 1985). En México la encontramos abundantemente en los pueblos de toda la costa del Pacífico, desde el sur de Sonora hasta Chiapas, incluyendo el sur de la península de Baja California (al sur de La Paz y de Todos Santos).

Los ejemplares de moringa son especialmente abundantes y frondosos en las llanuras calientes del sur del istmo de Tehuantepec. La planta también se cultiva en los poblados de las depresiones tropicales secas del país, como la del Balsas y la depresión central de Chiapas. La planta se encuentra en los pueblos de la zona del Infiernillo y en las cercanías de Apatzingán, Mezcala, Iguala y Tequesquitengo. Como se puede apreciar gracias a su distribución cultivada, la moringa es una planta de zonas cálidas que nunca sufren heladas. En general, prospera mejor por debajo de los 500 msnm y crece muy poco cuando se cultiva a altitudes mayores a 1 500 metros. Moringa es un árbol que tiene un gran potencial para su cultivo en México así como en muchas partes de América tropical por su combinación singular de propiedades. Las hojas son comestibles y ricas en proteínas, con un perfil de aminoácidos esenciales muy balanceado. Al mismo tiempo, contiene vitaminas, principalmente A y C, en altas cantidades, así como antioxidantes potentes. Los frutos jóvenes son comestibles y las semillas producen un aceite comestible y lubricante de altísima calidad (Martínez, 1959; Reyes et al., 2006). Esta especie puede propagarse mediante dos formas: sexual y asexual (García Roa, 2003). De forma asexual el cultivo de tejidos involucra el crecimiento de células y tejidos in vitro en condiciones asépticas. La relativa homogeneidad de los cultivos y la facilidad con que las condiciones pueden estandarizarse (composición del medio de cultivo, parámetros nutricionales, niveles de reguladores de crecimiento, adición de efectores y/o inhibidores, etc.) ayuda a conseguir la reproducibilidad de los resultados (Doran, 2009). La micropropagación permite la multiplicación clonal masiva y rápida de plantas. Por lo general, el proceso se inicia con el establecimiento in vitro de brotes, nudos, segmentos de hoja o raíz y, en algunos casos, de embriones cigóticos (explantes) en condiciones asépticas de cultivo (Villalobos y Thorpe 1991).

El cultivo de tejidos vegetales lo llevan a cabo la mayoría de las veces agregando reguladores de crecimiento al medio MS básico, la propagación de moringa en este trabajo se evaluó si en medio MS básico; sin reguladores de crecimiento se obtenían resultados exitosos. El propósito de esta investigación fue propagar plantas de moringa in vitro; desde semillas germinadas, por una parte para la aclimatación, por otra regeneración de nuevas plántulas, como también realización de transformación genética por medio de *Agrobacterium rhizogenes*, extracción de ADN, y por ultimo generación de raíz por medio de reguladores de crecimiento.

MÉTODO Y MATERIALES

Propagación y Aclimatación
Siguiendo el protocolo del laboratorio se preparó medio de cultivo MS (Murashige y Skoog) líquido y sólido, utilizando concentraciones para 1L: solución A (1ml), B (1ml), C (2.5ml), D (2.5ml), E (5ml), F (10 ml), sacarosa (30gr), nitrato de K (1.9gr), nitrato de amonio (1.65gr), agar (8gr para solido) y se disolvió en un matraz, sobre la parrilla de agitación, se ajustó el pH a 5.7 (con NaOH y HCl a 1N) con la ayuda de un potenciómetro, agregamos agar (para el medio sólido), calentamos en

microondas y se esterilizó en la autoclave. A partir de plántulas ya emergidas establecidas en el laboratorio, bajo la campana de flujo laminar completamente esterilizada, en cajas de Petri se cortaron explantes de 1 cm de longitud aproximadamente evitando cortar las yemas, se sembraron en medio MS líquido y posteriormente en sólido, realizando un enjuague de 5-10 seg en un vaso de precipitado con 1ml de cloro en 100 ml de H2O destilada, otro en un vaso con 3 gotas de desinfectante en 100 ml de H2O destilada, y utilizando 2 vasos de precipitado con agua destilada estéril para enfriar pinzas y bisturí. Realizando enjuagues en las manos con etanol. Finalmente se sellaron los botes con papel vitafilm y se llevaron al área de incubación. En la aclimatación de moringa, se tomaron plantas con alto crecimiento de raíces y de hojas, de diferentes alumnos; generadas en el laboratorio, utilizando tierra negra de la marca Nutrigarden ya preparada se revolvió con agua para humedecer y se llenaron los vasos desechables agujerados, retirando las plantas sin lastimar la raíz bajo la llave de agua, se colocaron en los vasos de tierra colocándoles dos palitos y una bolsa de polietileno transparente para que estas crearan un microclima, día a día se les realizó pequeños orificios hasta que la bolsa quedara completamente rota y la planta aclimatada, a estas se les regó cada 2 días. Las plantas ya sin la bolsa se sacaron afuera del laboratorio para seguir su proceso, finalmente las plantas que lograron el objetivo se pasaron a bolsas negras con más tierra y se colocaron cerca de la puerta del edificio para que estuvieran contacto con el medio ambiente.

Generación de Raíces con Reguladores AIA y BA
En este proceso se preparó en sólido y líquido medio MS + reguladores de crecimiento AIA y BA, colocados en cajas de Petri (sólido). Se realizó la siembra en sólido a 4 cajas de Petri (de 12 - 13 hojas por caja) y en 4 matraces en líquido (de 17 – 18 hojas por matraz); de estas siembras 2 cajas Petri se dejaron en oscuridad y 2 cajas Petri en fotoperiodo, y 2 matraces en agitación; por 3 semanas.

Transformación Genética con cepa K599 y ARqua 1 de Agrobacterium rhizogenes.
Se realizaron dos métodos de transformación genética, previo al 2º protocolo de transformación se utilizaron hojas y tallos de moringa propagadas in vitro, se preparó medio líquido YEM para crecer bacterias en 4 tubos con 10 ml c/u, lista la inoculación de cepas K599 (50 mg/ L) y ARqua 1(100 mg/L) se incubó en agitación y oscuridad por 48 horas. Bajo la campana de flujo laminar completamente estéril los explantes se colocaron en cajas de Petri con MS para su aclimatación durante 48 horas, al tallo se le realizó un corte transversal y con una longitud de 0.5 cm. Pasado el tiempo requerido se prosiguió a realizar la infección de los tejidos, colocando una dilución de 1:10 para las bacterias, obteniendo un volumen final de 20 ml. Se colocaron los explantes en la dilución y se llevó a agitación por 30 min. Se sacaron los explantes secándolos en papel filtro estéril, ya secas se colocaron en las cajas con medio MS y se incubaron en obscuridad a 28º C, dejando pasar 48 horas se sacaron los explantes del cocultivo y se transfirió a un medio líquido adicionado con 500 mg/ L de cefatoxima (200 µl) y se volvió a incubar por 30 minutos, y se pasaron los explaltes a medio sólido de selección en cajas Petri con Kanamicina (25 mg/L). Finalmente se dejó incubado a 25º C en obscuridad por 20 días.

Generación de Plántulas
Los explantes fueron tomados de plántulas sanas con alto crecimiento tanto de raíz como de hojas, propagadas en el laboratorio por otros alumnos, de igual manera se les realizó un corte de 1 cm, en cajas de Petri estéril, y se sembró directamente, ya que estas no mostraban contaminación, en medio MS sólido; bajo la campana de flujo laminar completamente esterilizada con etanol, para seguir con su proceso se llevaron los botes al área de incubación.

Extracción de ADN
De las plantas propagadas in vitro por otros alumnos que resultaron exitosos al finalizar su aclimatación, se tomaron hojas de *Moringa oleífera* para obtener tejido pulverizado, esto se realizó con la ayuda de un mortero y para facilitar la pulverización se agregó Nitrógeno líquido. La mezcla

se colocó en microtubos eppendorf de 1.5 ml, de 20 a 100 mg aproximadamente añadiendo inmediatamente sin dejar descongelar 0.8 ml de buffer de lisis+ 0.3 % (2.4 µl) ß-mercaptoetanol. Para conseguir una mezcla homogénea se llevó al agitador y se colocaron los tubos en hielo por 5 min y se añadió 500 µl de fenol- cloroformo, se emulsificò. Ya emulsificada las muestras se centrifugó a 12000 rpm durante 5 min (12K/5min), se recuperó la fase acuosa en tubo limpio, se añadió RNASa se mezcló por inversión y se incubó a 37ºc por 20 min. Pasado este tiempo se volvió a repetir este paso dos veces, después recuperò la fase acuosa en tubo limpio y se agregó 500 µl de Isopropanol; se mezcló por inversión y se incubó a 20ºc/10 min, nuevamente se centrifugó y se eliminó sobrante quedando una pastilla. A esta pastilla se le agregó 0.2 ml de etanol al 70% y se mezcló por inversión. Nuevamente Se centrifugó y se eliminó sobrante para secar la pastilla, la cual se re suspendió con H_2O destilada estéril.

En un espectrofotómetro se cuantificaron las muestras de ADN midiendo la absorbancia en 260 nm y 280 nm y obteniendo como resultado la pureza de cada muestra. Tomándose 5 µl de muestra y 995 µl de H_2O destilada estéril. En la etapa de electroforesis se corrieron 6 muestras de ADN, en papel parafilm con una micropipeta se colocó 2 µl de buffer de corrida y la muestra de ADN, se mezcló y se colocaron en las celdillas de los peines en el porta gel. Se corrió el gel a 70 vlt. Ya corrida la muestra se tiñó en bromuro de etidio y en H_2O, se pasó al foto documentador para observar los resultados.

RESULTADOS

Propagación y Aclimatación

A partir de 33 semillas, traídas de la Paz B. C., puestas para germinar, en medio MS básico, se realizó la propagación de *M. oleífera* en el cual se obtuvo 131 brotes y como consecuencia 201 explantes; obteniendo un promedio de 6 explantes por semilla, en un tiempo de 15 días. El % de germinación que mostraron las semillas utilizadas fue de un 96 %.

Por otra parte en el proceso de aclimatación se lograron aclimatar 59 plantas de moringa de un total de 143 trasplantadas. Reflejando un 41.2 % de sobrevivencia.

Transformación Genética con cepa K599 y ARqua 1 de Agrobacterium rhizogenes.

En el 1er protocolo de transformación después de 2 días se mostró contaminación. Se prosiguió a emplear otro método de transformación genética, el cual se dejó en incubación a obscuridad por tiempo indefinido.

Generación de Plántulas

De 15 botes con plántulas sanas y con alto crecimiento se obtuvieron 79 botes con 5-6 explantes cada uno.

Generación de Raíces con Reguladores AIA y BA

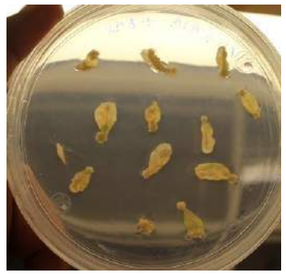
En esta prueba se observó poco crecimiento de callo en las cajas de Petri, pero no se obtuvieron los resultados esperados tanto las sembradas en cajas de Petri como en las sembradas en medio líquido, las concentraciones de AIA y BA no fueron las correspondientes; se les aplico muy poco regulador. Sin embargo en la 5 semana de la estancia se volvió a realizar la prueba con otro protocolo, utilizando solo medio MS sólido + AIA y BA.

Extracción de ADN

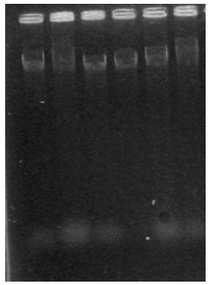
En concentración de ADN para las 19 muestras evaluadas se obtuvo un promedio de 1.64 µg/µl y en pureza 1.87 nm.

Algunas de las plantas aclimatadas, colocadas cerca con el medio ambiente.

Explantes en MS en fotoperiodo, en el área de incubación.



Explante con poco crecimiento calloso. 1er protocolo



Muestra de ADN nº 3, 6, 8, 9, 10, 11. (Colocadas en las celdillas del gel, de izquierda a derecha)

CONCLUSIÓN

La utilización de la tecnología del cultivo in vitro de tejidos vegetales para *Moringa oleífera* L. mostró resultados exitosos propagando este en medio MS sin ningún tipo de regulador de crecimiento. Por otra parte para la aclimatación el porcentaje de sobrevivencia fue muy bajo debido a que no se utilizaron plántulas completamente jóvenes. Para la transformación genética y para la generación de raíces no se obtuvieron resultados exitosos. Con el protocolo que se siguió para extracción de ADN se pudo observar visiblemente las bandas de ADN.

LITERATURA CITADA

- APG (Angiosperm Phylogeny Group). 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. Botanical Journal of the Linnean Society 161:105-121.
- Doran, P. (2009) Application of plant tissue cultures in phytoremediation research: incentives and limitations. Biotechnol. Bioeng., 103:60-76
- García Roa, M. 2003. Producción de semillas forestales de especies forrajeras enfatizadas en sistemas silvopastoriles. INAFOR. 37 p.
- Haines, H. H. 1922. Botany of Bihar and Orissa. Part III. Calyciflorae. Adlard & Son & West Newman, London. 316 p.
- Martínez, M. 1959. Plantas útiles de la flora mexicana. Botas, México, D. F. 621 p.
- Olson, M. E. 2002a. Combining data from DNA sequences and morphology for a phylogeny of Moringaceae. Systematic Botany 27:55-73.

- Olson, M. E. y S. G. Razafimandimbison. 2000. Moringa hildebrandtii: A tree extinct in the wild but preserved by indigenous horticultural practices in Madagascar. Adansonia sér. 3 22:217-221.
- Olson, M. E. 2001a. Stem and root anatomy of Moringa (Moringaceae). Haseltonia 8:56-96.
- Olson, M. E. 2001b. Introduction to the Moringa Family. In The miracle tree: The multiple attributes of Moringa, L. J. Fuglie (ed.). Technical Centre for Agricultural and Rural Cooperation, Wageningen/ Church World Service, New York. p. 11-28.
- Olson, M. E. 2010. Moringaceae. In Flora of North America North of Mexico, vol. 7, Flora of North America Editorial Committee (eds.). Flora of North America Association, New York y Oxford. p. 167-169.
- Olson, M. E. 2003. Ontogenetic origins of floral bilateral symmetry in Moringaceae. American Journal of Botany 90:49-71.
- Olson, M. E. y S. Carlquist. 2001. Stem and root anatomical correlations with life form diversity, ecology, and systematics in Moringa (Moringaceae). Botanical Journal of the Linnean Society 135:315-348.
- Olson, M. E. 2002b. Intergeneric relationships within the Caricaceae-Moringacecae clade (Brassicales), and potential morphological synapomorphies of the clade and its families. International Journal of Plant Sciences 163:51-65.
- Reyes, N., E. Spörndly e I. Ledin. 2006. Effect of feeding different levels of foliage of Moringa oleifera to creole dairy cows on intake, digestibility, milk production and composition. Livestock Science 101:24-31.
- Verdcourt, B. 1985. A synopsis of Moringaceae. Kew Bulletin 40:1-23.
- Villalobos, VM; AThorpe, A. 1991. Micropropagación: Conceptos, metodología y resultados. In Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Roca, W.M. y Mroginski, L.A. (eds.). Cali, Colombia. 970 p.

PRE-ACLIMATACIÓN Y ACLIMATACIÓN DE *EPIDENDRUM CARDIOPHORUM* Y *MYRMECOPHILA GRANDILFORA*, ORQUÍDEAS DE LA HUASTECA POTOSINA

Claudia García Zepeda[1] y Candy Carranza Álvarez[2]

RESUMEN

La familia Orchidaceae es una de las más grandes y diversas familias de plantas. Sin embargo, su distribución ha disminuido notablemente debido a la alteración y destrucción de su hábitat así como, su difícil reproducción. Una alternativa para disminuir el tiempo de regeneración de las orquídeas es la micropropagación. En este proyecto se micropropagaron y preaclimataron dos especies de orquídeas *Epidendrum cardiophorum* y *Myrmecophila grandiflora*. Se probaron tres sustratos (Carbón vegetal, Corteza roja, Agar Plant TC), se evaluó la respuesta a dos auxinas de crecimiento (Indole-3-Butyric-Acid (AIB) y Indole-3-Acetic-Acid (AIA)) ambas a una concentración de 1 ppm. Se realizó una evaluación semanal durante tres semanas. En el análisis de varianza y prueba Tukey se muestra que no hay diferencias significativas entre los tratamientos.

ABSTRACT

The orchid family is one of the largest and most diverse plant families. However, its distribution has decreased significantly due to the alteration and destruction of their habitat and their difficult reproduction. An alternative to reduce the regeneration time is the micropropagation. In this project they were micropropagated and pre-acclimated two species of orchids *Epidendrum cardiophorum* and *Myrmecophila grandiflora*. Three substrates (Charcoal, red bark, Agar Plant TC) were tested, the response to two auxin growth (Indole-3-Butyric-Acid (AIB) and Indole-3-Acetic-Acid (AIA)) was evaluated both to a concentration of 1 ppm. A weekly evaluation was performed for three weeks. In the analysis of variance and Tukey test shows no significant differences between treatments.

Palabras Clave: Pre- aclimatación, vitro-orquídeas, auxinas.

INTRODUCCIÓN

Las orquídeas pertenecen a la familia botánica Orchidaceae, que comprende entre 25 mil y 30 mil especies muchas de las cuales tienen una gran importancia económica y socio-cultural. A pesar de la numerosa cantidad de especies que comprende la familia Orchidaceae, la riqueza de las orquídeas está siendo amenazada debido a su vulnerabilidad, inestabilidad y al abuso en su uso como recurso y destrucción de

[1] Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento Forestal. Calzada Antonio Narro 1923, Buenavista, 25315 Saltillo, COAH. Claudia_garciaz81@outlook.com. Teléfono: 844-127-44-02.
[2] Unidad Académica Multidisciplinaria Zona Huasteca, Cd. Valles, S.L.P. Romualdo del Campo 501, Fracc. Rafael Curiel. Laboratorio de Investigación en Ciencias Ambientales. (481) 3812348 candy.carranza@uaslp.mx

su hábitat (Cox, 2013). Además, la incursión indebida del hombre en los medios naturales ha generado desequilibrio tanto en las orquídeas como en otras especies nativas (Tiza, 2010). Por ello, surge la necesidad de recuperar especies nativas en peligro de extinción a través de otras técnicas biotecnológicas como es el cultivo in vitro de tejidos vegetales. El cultivo in vitro o la micropropagación se inicia con la extracción de pequeños fragmentos de tejido tomados de diversas partes de la planta, para después ser llevados a un medio de cultivo determinado. Por esta técnica se han multiplicado diversas especies de orquídeas como Euchile mariae (Ames) Withner, Laelia speciosa, Dendrobium, Laelia anceps, Phalaenopsis y Sobralia xantholeuca. Por ello, el objetivo de este proyecto fue pre aclimatar plántulas de Epidendrum cardiophorum y Myrmecophila grandiflora.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal
El material para realizar la micropropagación de plantas se obtuvo de la Región Huasteca del estado de San Luis Potosí.

Esterilizado de material
Los recipientes que se utilizaron en el proceso fueron desinfectados en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 10 % de concentración durante una hora, después se enjuagaron con agua del grifo y se colocaron en la estufa de convección con una temperatura de 200 ° C.

Preparación de medios de cultivo
Se empleó el medio de cultivo comercial Murashige–Skoog (MS; Murashige & Skoog 1962, Phytotechnology®), el cual se preparó disolviendo 4.43 g/L de medio, se enriqueció con 30 g/L de sacarosa comercial y 3g/L de carbón activado. El pH se ajustó a 5.7 con NAOH 1N con el uso de un potenciómetro. Para la preparación del medio semisólido se añadieron 8 g/L de agar Plant TC®, y finalmente se esterilizaron en autoclave a 121°C/ 20 min a 15 libras de presión atmosférica. Previo a la adición del agar se añadieron los reguladores de crecimiento vegetal y/o los extractos naturales al medio de cultivo antes de ser esterilizado.

Pre-aclimatación de *M. grandiflora* y *E. cardhioporum*
Para iniciar la pre-aclimatación de las especies en estudio, se realizaron seis repeticiones de cada uno de los tratamientos (n= 18) evaluados. El Tratamiento control (T1) contenía únicamente 20 mL de Medio basal (MS), el tratamiento T2 contenía 1 ppm de Indole-3-Butyric-Acid (AIB) y el tratamiento T3 contenían Indole-3-Acetic-Acid (AIA).

En cada uno de los tratamientos se probaron tres soportes naturales para evitar el uso de agar plant (Tabla 1). Todos los tratamientos se prepararon en recipientes de 500 mL de capacidad y fueron sellados con papel vitafilm y esterilizados en autoclave. Se realizaron evaluaciones semanales para determinar la formación de nuevas raíces, brotes y acelerar el crecimiento de las plántulas de *E. cardiphorun* y *M. grandiflora.*

Tabla 1. Tratamientos empleados en la aclimatación de las orquídeas

Tratamiento	Contenido	Sustrato		
		Corteza	Agar	Carbón
T1	MB	6	6	6
T2	MB+AIA (1 ppm)	6	6	6
T3	MB +AIB (1ppm)	6	6	6

Trasplante de *E. cardiphorun* y *M. grandiflora* en condiciones de asepsia
La campana y los recipientes se limpiaron con etanol al 70%, dentro de la campana colocamos recipientes y materiales a utilizar para el trasplante, se activó el flujo de aire (3 min), y posteriormente se activaron los rayos ultravioleta (3 repeticiones). Para el trasplante se utilizó equipo de protección (bata, lentes y cubre-bocas), para evitar que las plántulas se contaminaran. Por cada recipiente se colocaron 2 plántulas y se realizaron 27 frascos para cada especie (*E. cardiphorun* y *M. grandiflora*).

Las plantas fueron colocadas en el cuarto de cultivo con un fotoperiodo de 16/8 h, se realizaron tres evaluaciones semanales, registrando el número de raíces, numero de brotes, altura de plántulas, contaminación (hongo, levadura, bacteria) y oxidación de plantas. La contaminación y oxidación se evaluó todos los días para retirar las muestras dañadas y evitar la propagación del agente contaminante. Transcurridas las tres semanas de evaluación las plantas con una altura de 5.5 a 8 cm de cada tratamiento fueron trasplantadas a macetas y colocadas en domos para conservar el 70% de humedad (B y C).

Análisis estadístico
Todos tratamientos se realizaron por triplicado, y se realizaron dos experimentos independientes. Se evaluó el porcentaje de oxidación y contaminación, y el número de brotes cada semana. El número de raíces y plántulas representa el promedio de cada tratamiento. Se utilizó el programa STATISTICA 8. Los gráficos se realizaron en Sigma Plot.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Respuesta de *E. cardiophorum* y *M. grandiflora* en la etapa de pre-aclimatación
En la Figura 1, se presentan los resultados obtenidos de la pre-aclimatación de *E. cardiophorum* y *M. grandiflora*. En el análisis estadístico a los tratamientos establecidos durante tres semanas de evaluación, no se muestran diferencias estadísticamente significativas en las variables medidas (incremento en altura, número de brotes, y número de raíces) ($p>0.05$) entre ninguno de los tratamientos probados para ambas especies de orquídeas.

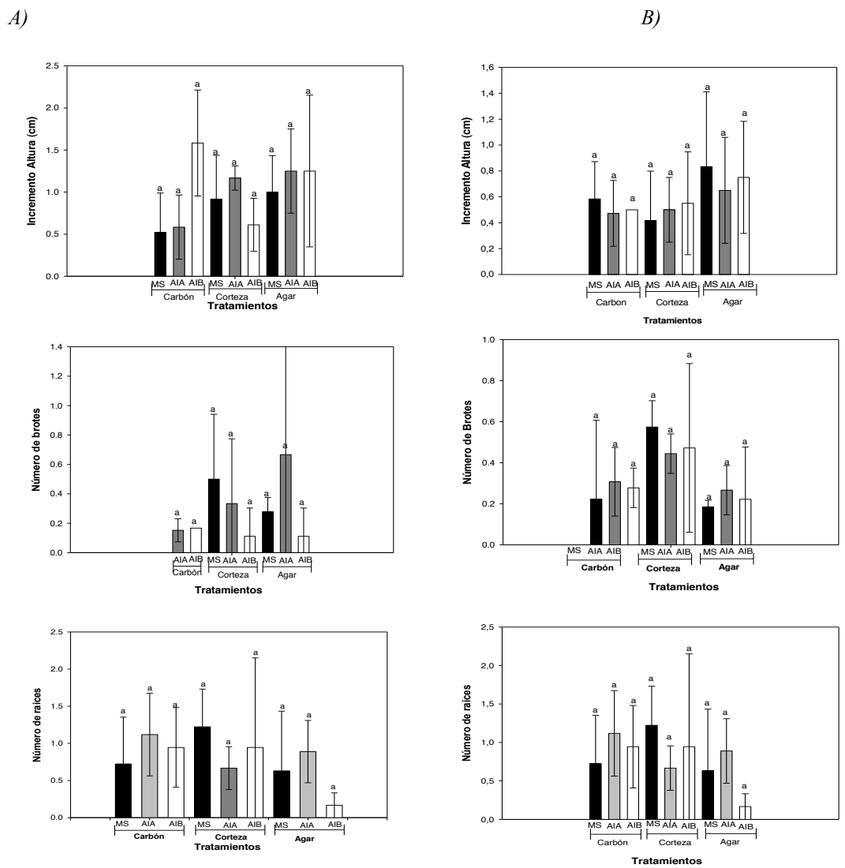


Figura 1. Respuesta morfogenética (incremento de la altura, nuevos brotes y formación de raíces en los diferentes soportes (carbón vegetal, corteza de pino y agar). A) Epidendrum cardiophorum; B) Myrmecophila grandiflora.

Aunque las diferencias observadas en la respuesta morfogenética no son significativas en este periodo de tiempo, se observó que para *E. cardiophorum*, el carbón vegetal favoreció brotes de mayor calidad y con mayor altura cuando el sustrato fue enriquecido con AIB, mientras que en el sustrato de corteza de árbol con esta misma auxina se obtuvieron brotes más sanos y con una mayor calidad de raíces (Figura 1A). En cuanto a *M. grandiflora* aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas (Figura 1B), se observaron nuevos brotes y raíces nuevas de mayor calidad en los tratamientos con corteza de árbol. Estos resultados demuestran que el uso de agar en las etapas de enraizamiento y pre-aclimatación podría sustituirse por el uso de sustratos de soporte naturales como la corteza de pino. *E. cardiophorum* y *M. grandiflora* al igual que *Encyclia mariae* son orquídeas epifitas, en las cuales es imprescindible la aireación de sus raíces para su supervivencia (Santos y Carranza, 2009). Los sustrato naturales como el carbón vegetal y corteza de pino se caracterizan por su alta porosidad permitiendo una correcta aireación en las raíces y en consecuencia, la absorción de agua y nutrientes para el desarrollo de las plántulas. Moreno y Menchaca (2007) observaron que la adición de sustratos orgánicos durante el cultivo *in vitro* aumentan el porcentaje de supervivencia de las plántulas durante la etapa de aclimatación, adjudicando este factor a los resultados observados en este experimento.

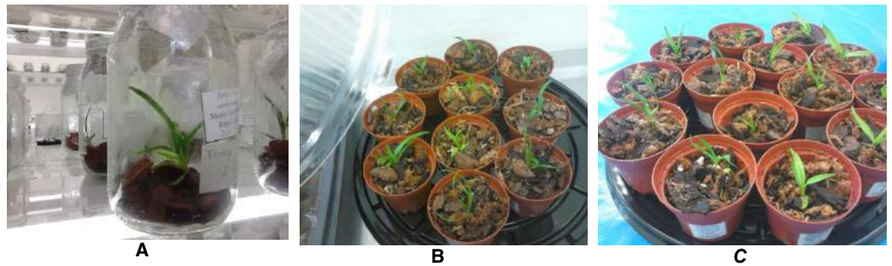
Respuesta de *E. cardiophorum* y *M. grandiflora* en la etapa de trasplante *ex vitro*

Una vez realizado el proceso de pre-aclimatación, las plántulas de *E. cardiophorum y M. grandiflora* que alcanzaron una mayor altura y un mayor número de brotes, se sometieron al proceso de aclimatación *ex vitro*. En la Figura 2, se presenta la apariencia de las plántulas en esta etapa de cultivo. En esta etapa el porcentaje de sobrevivencia fue del 100% para ambas especies después de dos semanas de evaluación; además, no se registró contaminación ni oxidación.

Es importante mencionar que un número considerable de plántulas micropropagadas *in vitro* no sobreviven a las condiciones medio ambientales, debido a que tienen más baja humedad relativa, niveles altos de intensidad luminosa y un entorno séptico que generan estrés en las plántulas (Chugh *et al*., 2009). Por ello, es de suma importancia realizar una etapa de pre-aclimatación a las plantas de manera que éstas puedan sobrevivir cuando sean llevadas al medio ambiente. Los experimentos pre-aclimatación realizados en este proyecto, favorecieron el alto porcentaje de sobrevivencia mostrado en *E. cardiophorum* y *M. grandiflora*.

En un estudio realizado por Ávila y Salgado-Garciglia (2006), se obtuvo un porcentaje de sobrevivencia del 70% en *L. autumnalis*, *L. albida*, *E. citrina* y *O. cavendishianum*, mientras que en *L. speciosa*, la sobrevivencia fue de hasta de un 98%, debido a que las plántulas in vitro se mantuvieron por 20 días en condiciones de invernadero previo a su transplante.

La aclimatación es la etapa final, donde la manipulación debe ser muy cuidadosa, ya que es donde se produce el mayor índice de mortandad, principalmente en el proceso de trasplante. Van ginderdeuren (2009), menciona que la mayoría de las plantas producidas *in vitro* deben ser aclimatadas para obtener así un número suficiente de plantas vivas y vigorosas para trasplantar al medio ambiente, además en este estudio con *Chloraea virescens* (Willd.), demostró que el tamaño de las plántulas es un factor importante para lograr un mayor porcentaje de sobrevivencia.



A B C

Figura 2. Etapas de preaclimatación in vitro y aclimatación ex vitro. A) Etapa de pre-aclimatación de Epidendrum cardiophorum sobre corteza de pino; B) Etapa de aclimatación de Epidendrum cardiophorum C) Etapa de aclimatación de Myrmecophila grandiflora.

CONCLUSIONES

Se estableció un sistema de pre-aclimatación in vitro con diferentes sustratos naturales de soporte. Dado que el análisis estadístico realizado en esta etapa demostró que no existe diferencia significativa entre los tratamientos, es posible sustituir el uso de agar en la última etapa de cultivo *in vitro*, de manera que se reduzcan los costos de la micropropagación, y se favorezca la calidad de los brotes. Además, se encontró que la etapa de pre-aclimatación es factor indispensable para lograr un mayor porcentaje de sobrevivencia durante la etapa de aclimatación de las orquídeas *Epidendrum cardiophorum* y *Myrmecophila grandiflora*.

BIBLIOGRAFÍA

Ávila, D. I., Salgado-Garciglia, R. (2006). Propagación y mantenimiento in vitro de orquídeas mexicanas, para colaborar en su conservación. *BIOLÓGICAS, Facultad de Biología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo*, *8*, 138–149.

Barrera-Vargas, D.G., Chavez-Avila V.M., Sandoval-Zapotitla E (S/A). Propagación in vitro vía organogénesis indirecta de *Laelia speciosa* L. (Orchidaceae) especie en peligro de extinción. XI congreso Nacional de Biotecnología Y Bioingeniería. Universidad Autónoma de México. •

Chugh S., Guha S., Rao U. (2009). Micropopagation of orchids: A review on the potential of different explants. Scientia Horticulturae. 122: 507 – 520.

Cox T. L. D. (2013). Orquídeas: Importancia y uso en México. Bioagrociencias, 6 (2). Obtenida el 12 de julio de 2016 de: http://www.ccba.uady.mx/revistas/bioagro/V6N2/Articulo%201.pdf

Moreno M. D., Menchaca G. R. (2007). Efecto de los compuestos orgánicos en la propagación in vitro de Stanhopea tigrina bateman (Orchidaceae)" en Foresta Veracruzana 9(2): 27 – 32.

Pérez-Molphe, B., Ramírez-Malagón, R., Núñez-Palenius, H.G., Ochoa-Alejo, A. (1999). Introducción al cultivo de tejidos vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes. Dentro de: Munguía-Sánchez, L.G. y Castro-Aranda, N.I. (2012).Micropropagación de especies forestales de la Huasteca Potosina. Universidad de San Luis Potosí Campus Huasteca.

Santos D.M.S.; Carranza A. C. (2009). Plant refeneration through direct shoot formation from leaf cultures and from protocorm – like bodies derived from callus of Encyclia mariae (Orchidaceae), a threatened Mexican orchid. In vitro Cell. Dev. Biol. – Plant. 45 (2):162 – 170.

Suárez-quijada I., Hernández-Altamirano M., Chávez-Ávila M. V., Sandoval-Zapotitlán E. y 1 & Martínez-palacios A. (2007). Propagación *in vitro* y Aclimatización de *Euchile mariae* (Ames) Withner (Orchidaceae). LANKESTERIANA 7(1-2): 388-393. Obtenida el 12 de julio de 2016 de: http://www.redalyc.org/pdf/443/44339813081.pdf

Tiza A. G. (2010). Propagación *in vitro* de las orquídeas *Dendrobium, Laelia anceps, Phalaenopsis y Sobralia xantholeuca,* Universidad Veracruzana, Facultad de Ciencias Químicas. Versión electrónica obtenida el 12 de julio de 2016 de: http://cdigital.uv.mx/bitstream/123456789/31065/1/TizaArias.pdf.

Van ginderdeuren V. R. (2009). Aclimatación de Plántulas de *Chloraea virescens* (Willd.) Lindl. Cultivadas *in vitro*. Universidad Austral de Chile. Tesis de licenciatura. Obtenida el 12 de julio de 2016 de: http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2009/fag492a/doc/fag492a.pdf

DISEÑO DE CONSORCIOS MICROBANOS PARA LA DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS

Martha Isela Gutiérrez Amézquita[1] y Varinia López Ramírez[2]

RESUMEN

Estudios recientes muestran que el intercambio metabólico en un consorcio microbiano contribuye a la remediación de sitios contaminados con hidrocarburos. Es por ello que la generación de estas asociaciones es una alternativa ambientalmente amigable. En el presente trabajo se evaluó la relación antagónica existente entre 21 cepas degradadoras de hidrocarburos aisladas del Río Lerma de Salamanca y de una toma de gasolina en Pueblo Nuevo, Guanajuato; mediante la técnica de gota-césped para generar 3 consorcios diferentes utilizando naftaleno como fuente de carbono obteniendo una mayor degradación en el consorcio 3 formado por las cepas SA1-12, SA1-15 y SS2-9 identificadas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Providencia rettgeri* y *Enterobacter sp.,* respectivamente. Nuestros resultados sugieren que éste consorcio tiene potencial para ser aplicado en ambientes contaminados con hidrocarburos.

Palabras Clave: consorcio microbiano, antagonismo, degradación de hidrocarburos.

ABSTRACT

Recent studies show that the metabolic exchange in a microbial consortium contributes to the remediation of hydrocarbons contaminated sites. For that reason, the generation of these associations could be an environmentally friendly alternative. In this work, we evaluated the antagonistic relationship between 21 degrading strains of hydrocarbons isolated from the Lerma River Salamanca and gasoline pump in Pueblo Nuevo, we used the drop-lawn method to generate 3 different consortia using naphthalene as carbon source obtaining a best degradation in the consortium 3 constituted by the SA1-12, SA1-15 and SS2-9 strains identified as *Pseudomonas aeruginosa*, *Providencia rettgeri* and *Enterobacter sp.,* respectively. Our results suggest that this consortium has potential to be applied in environments contaminated of hydrocarbons.

Keywords: microbial consortium, antagonism, hydrocarbon degradation.

INTRODUCCIÓN

La industria petroquímica es una de las actividades que generan beneficios económicos para la sociedad, sin embargo, al mismo tiempo afecta al medio ambiente por la emisión de residuos tóxicos y difíciles de degradar como son alcanos, cicloalcanos, benceno, tolueno, xilenos, fenoles y compuestos orgánicos policíclicos, tanto en suelos como en cuerpos de agua (Das y Chandran, 2010). Actualmente, existe interés y una creciente promoción de métodos ambientales para la limpieza de sitios contaminados con petróleo (Fathepure, 2014).

La biorremediación ofrece una alternativa viable para el control de contaminación de agua y suelo ocasionada por residuos petroquímicos. Esta técnica es una solución eficaz y un método de tratamiento económico y ecológico en la que se utiliza la capacidad de microorganismos para biodegradar hidrocarburos y además estos microorganismos que pueden ser bacterias, hongos, levaduras incluso microalgas son aislados del entorno, en particular de los lugares contaminados con petróleo (Dindar *et al*., 2013). Estos microorganismos pueden trabajar en conjunto en un mismo ambiente para la biodegradación

[1] Instituto Tecnológico Superior de Irapuato, Ingeniería Bioquímica; Irapuato-Silao Km. 12.5, CP. 36821, Irapuato, Gto., mar_tha19chivas@hotmail.com
[2] Instituto Tecnológico Superior de Irapuato, Coord. de Ing. Bioquímica; Irapuato-Silao Km. 12.5, CP. 36821, Irapuato, Gto., valopez@itesi.edu.mx

mediante la generación de un consorcio microbiano. Algunos géneros reportados con capacidad de utilizar hidrocarburos como fuente de carbono son *Pseudomonas, Burkholderia, Acinetobacter, Mycobacterium,* entre otros (Das y Chandran, 2010).

Estudios recientes muestran que el intercambio de metabolitos y señales que tiene lugar dentro de un consorcio microbiano contribuye a la diversificación del proceso metabólico (Ochoa y Montoya, 2010). Un consorcio microbiano es una asociación de poblaciones microbianas que pueden ser o no de la misma especie, que trabajan en conjunto beneficiándose del metabolismo de los demás, dichas interacciones metabólicas con frecuencia contribuyen, a través de la división del trabajo, a las capacidades emergentes a nivel de la comunidad tales como la biodegradación o el crecimiento más rápido. La externalización de las funciones metabólicas de los demás miembros, integra cada vía en un mismo proceso metabólico evitando así conflictos bioquímicos (Ponomarova y Raosaheb, 2015; Ochoa y Montoya, 2010). El objetivo de este trabajo fue el diseño de consorcios microbianos capaces de degradar hidrocarburos con el fin de identificar aquellos aislados dentro del ceparío del Instituto Tecnológico Superior de Irapuato, que puedan ser empleados para la remoción de hidrocarburos en suelos y agua contaminados por hidrocarburos.

MÉTODOS Y MATERIALES

Reactivación de cepas
Se utilizaron cepas previamente aisladas e identificadas por Cynthia Segovia, Abigail Gallardo y Eduardo Aguirre, obtenidas de agua y de sedimento del Río Lerma de Salamanca (Código: SA- o SS-), así como de una toma de gasolina clandestina en Pueblo Nuevo, Guanajuato (Código AG-), de las cuales se evaluó también la capacidad para degradar hidrocarburos. La reactivación de las cepas se llevó a cabo en cajas Petri con agar nutritivo aplicando la siembra por estriado e incubando a 28°C por 48 horas.

Ensayos de antagonismo
Para evaluar la relación antagónica entre los aislados, se prepararon pre-inóculos en caldo nutritivo y se incubaron por 48 horas a 28°C y 120 rpm. Posteriormente cada cultivo se vertió en una caja Petri mezclado con agar nutritivo atemperado y se dejó solidificar en campana de flujo laminar, posteriormente se inocularon sobre éstos 20 µL de cada pre-inóculo, las cajas se incubaron a 28°C por 48 horas y seguido de esto se evaluó la relación existente entre los aislados. La inhibición del crecimiento la notamos por la presencia de halos de inhibición en los aislados inoculados como césped o por la falta de desarrollo en los aislados inoculados como gota (Figura 1).

Diseño de consorcios
Las cepas que no fueron inhibidas por algún otra y que previamente fueron identificadas molecularmente se seleccionaron para conformar los consorcios bacterianos compuestos por tres aislados de diferente género, seleccionando para el consorcio 1 las cepas marcadas con los códigos SA1-1, SS3-1 y AG13; para el consorcio 2 los aislados SA1-15, AG2 y SA3-3; consorcio 3 con SA1-12, SA1-15 y SS2-9, los cuales se inocularon en medio Touson a $D.O_{600\ nm}$ de 0.1 con 0.075% v/v de naftaleno llevando a un volumen de 40 mL e incubando a 28°C, 135 rpm por 10 días, tomando 1 mL de muestra cada 48 horas. Al mismo tiempo se realizaron los ensayos por cepa, empleando como control negativo el medio de cultivo sin pre-inóculo y con presencia de naftaleno.

Degradación de naftaleno
Las muestras que se tomaron cada 48 hrs. a partir de nuestros ensayos de degradación fueron tratadas con diclorometano. La fase orgánica se colocó sobre un papel filtro y se reveló con yodo metálico. La intensidad de las manchas se comparó con el control.

RESULTADOS

La evaluación del antagonismo entre aislados nos permitió conocer la capacidad inhibitoria de algunos aislados frente a otros y poder definir que aislados podrían formar parte de un consorcio microbiano. En la Figura 1, se muestra el ensayo de inhibición de la cepa AG4 identificada como *Bacillus cereus* (Gram positiva) al ser confrontada con los aislados bacterianos, se observa el halo de inhibición que se generó con la cepa SA1-8 identificada como *Pseudomonas aeruginosa* (Gram negativa) a las 48 horas de la inoculación a comparación de los demás inóculos que si crecieron sin presentar halo de inhibición. Según lo reportado por (Albarado *et al*., 2014) la estructura de la membrana externa de la célula puede influir en la actividad antagónica siendo así las bacterias clasificadas como Gram negativas las que mayor antagonismo pueden presentar sobre las denominadas Gram positivas.

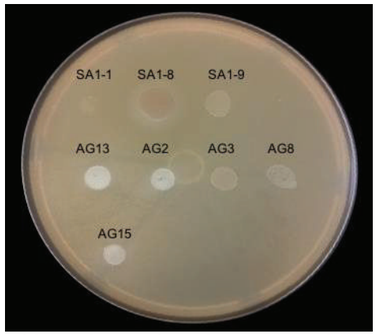
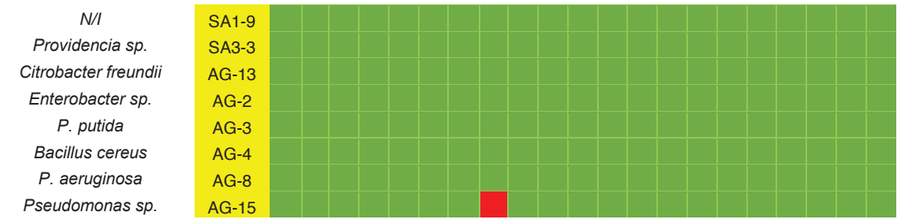


Figura 1. Desarrollo microbiano observado en los ensayos de confrontación. Se aprecia la inhibición del crecimiento de la cepa AG4 al confrontarla con la cepa SA1-8.

Los ensayos de antagonismo se realizaron a un total de 21 aislados. La Tabla 1 muestra el comportamiento de los aislados frente al resto de las cepas, cabe destacar que únicamente se observó inhibición del crecimiento en las cepas marcadas con los códigos SS4-7, SA1-4, SA1-8 y AG15 las cuales presentaron inhibición al ser inoculadas en cinco de las cepas por lo cual se descartaron para el diseño de los consorcios. La cepa SA1-8 resulto ser la más antagónica de todos los aislados.

Tabla 1. Inhibición de las cepas que mostraron antagonismo

Género	Código	SS2-9	SS3-1	SS3-6	SS4-7	SA1-4	SA1-12	SA1-13	SA1-14	SA1-15	SA2-6	SA3-1	SA1-1	SA1-8	SA1-9	SA3-3	AG-13	AG-2	AG-3	AG-4	AG-8	AG-15
Enterobacter sp.	SS2-9																					
Enterobacter sp.	SS3-1																					
Enterobacter sp.	SS3-6																					
Burkholderia sp.	SS4-7																					
N/I	SA1-4																					
P. aeruginosa	SA1-12																					
N/I	SA1-13																					
N/I	SA1-14																					
Providencia rettgeri	SA1-15																					
N/I	SA2-6																					
N/I	SA3-1																					
P. aeruginosa	SA1-1																					
P. aeruginosa	SA1-8																					



N/I: no identificado
Cepas que presentaron inhibición
Cepas que no presentaron inhibición

Degradación de naftaleno

La degradación cualitativa del naftaleno se realizó a partir de la extracción orgánica con diclorometano de las muestras tomadas cada 48 hrs. a partir de los ensayos de degradación. La intensidad de las manchas se interpreto como la presencia de naftaleno en las muestras. En la Figura 2 se muestran los resultados de los ensayos de degradación de naftaleno llevada a cabo por las cepas SA1-12, SS2-9 y SA1-15 (*P. aeruginosa*, *Enterobacter sp., Providencia rettgeri*), las cuales conforman al consorcio 3; como se puede observar, la intensidad de las manchas de las cepas individuales disminuye con respecto al control y el cambio es más notorio para el consorcio ya que las manchas se aprecian tenues desde las 48 horas de incubación, lo cual indica que la presencia de naftaleno iba disminuyendo por lo cual se estaba llevando a cabo la degradación de éste. Los géneros *Pseudomonas sp*., y *Enterobacter sp*., de acuerdo a lo reportado por Patel y col. (2011), resultan ser eficientes degradadoras de naftaleno cuando actúan en conjunto.

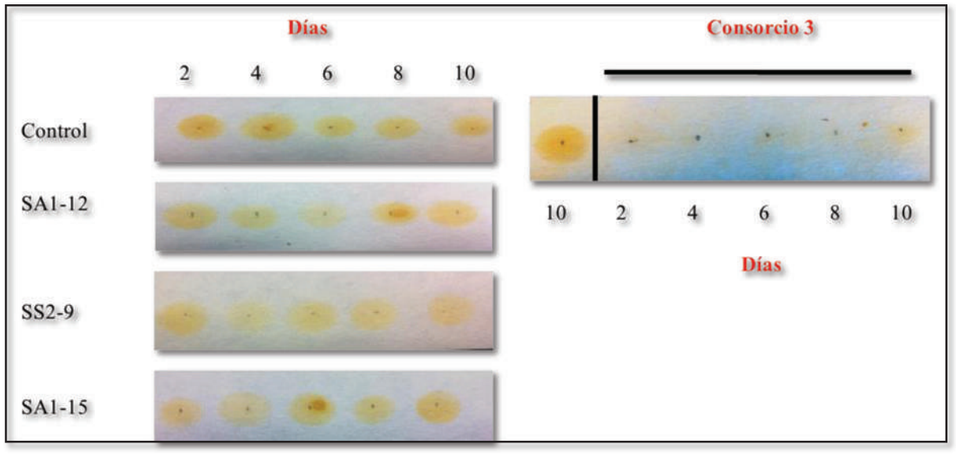


Figura 2. Degradación de naftaleno con el consorcio 3 así como con las cepas individuales que lo integran a los 2, 4, 6, 8 y 10 días de incubación.

CONCLUSIONES

Las cepas que presentaron antagonismo fueron las cepas: SA1-8, SA1-4, SS4-7 y AG15, el resto de las cepas fueron capaces de desarrollarse en presencia del resto de los aislados, lo cual indica que son posibles candidatos para el diseño de consorcios con capacidad degradadora de naftaleno. El consorcio formado por cepas de los géneros *Pseudomonas aeruginosa*, *Providencia rettgeri* y *Enterobacter sp.,* resultó ser cualitativamente mejor degradador de naftaleno lo que sugiere que éste tiene potencial para ser aplicado en ambientes contaminados con este hidrocarburo.

BIBLIOGRAFIA

Albarado Ysasis, Luzmila; Flores, Evelin; Guzmán, Militza; Salazar, Elsa. (2014). Actividad antagónica en aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. Multiciencias, vol. 14, núm. 1, Enero-marzo, 2014, [22-28].

Das Nilanjana, Chandran Preethy. (2010). Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. Biotechnology Research International., vol. 2011, Junio-Julio. (doi:10.4061/2011/941810)

Dindar Efsun, Olcay Fatma Topac Sagban, Savas Baskaya Huseyin. (2013). Biorremediation of petroleum-Contaminated Soil. Biol., Environ, Num. 19, Vol. 7, Enero-Mayo [39-47].

Fathepure Z. Babu. (2014). Recent studies in microbial degradation of petroleum hydrocarbons in hypersaline environments. *Frontiers in Microbiology*. Num. 173, Vol. 5

Ochoa Carreño Diana Carolina, Montoya Restrepo Alexandra. (2010). Consorcios microbianos: Una metáfora biológica aplicada a la asociatividad empresarial en cadenas productivas agropecuarias. Universidad Nacional de Colombia, Vol, XVIII, Octubre-Noviembre, [55-74].

Patel V, Jain S, Madamwar D. (2011). Naphthalene degradation by bacterial consortium (dv-al) developed from Alang-sosiya ship breaking yard, Gujarat, India. Elsevier, Vol. 107, Agosto-Diciembre, 2011 [122-130].

Ponomarova Olga, Raosaheb Patil Kiran (2015). Metabolic interactions in microbial communities: untangling the Gordian knot. *Elsevier.* Num. 27, [37–44].

AUTOMATIZACIÓN DE LA TOMA DE IMÁGENES CON MATLAB PARA LA MEDICIÓN DEL POTENCIAL HÍDRICO EN SUELO ORGÁNICO E INORGÁNICO POR TERMOGRAFÍA INFRAROJA

Raul Alejandro Gutierrez Sanchez[1] y Carlos Villaseñor Mora[2]

RESUMEN

Las cámaras infrarrojas sirven para la obtención de imágenes para estudios termográficos. La mayoría del software disponible para éstas cuenta con las correcciones necesarias para que las imágenes sean adecuadas para su análisis, pero el proceso de la toma de imágenes puede llegar a ser largo y complicado. La automatización de la toma de imágenes conlleva el ahorro de tiempo y la precisión en las imágenes, es decir, posibilidad de establecer el intervalo de tiempo entre la adquisición de cada imagen.

Palabras Clave: Termografía, imágenes, automatización.

INTRODUCCIÓN

En proyectos previos sobre termografía en la DCI se han tenido problemas porque las imágenes adquiridas no cuentan con una buena precisión en tiempo y posición, por lo que la automatización de la adquisición de imágenes llega a ser muy útil. En este caso, además de la automatización se incluye una iluminación artificial, a la cual también pueden asignársele períodos de encendido y apagado.

MÉTODOS Y MATERIALES

Para la automatización de la toma de imágenes se utilizó el programa MATLAB® en conjunto con un microprocesador Arduido Uno. Existe un paquete de soporte entre estos dos productos, el cual nos permite hacer uso de todas las funciones del Arduino y de MATLAB desde la barra de comandos de MATLAB.

Se eligió MATLAB por su gran capacidad de asociarse con multitud de productos en el mercado a través de paquetes adicionales, incluyendo las cámaras que funcionan conectadas a la computadora donde éste está instalado. La posibilidad de controlar la cámara y el Arduino al mismo tiempo con MATLAB nos permitió realizar la automatización de la toma de imágenes así como el incluir la iluminación artificial. Primero se realizaron pruebas con la cámara web de la computadora y después se probó el programa con la cámara infrarroja.

RESULTADOS

Se aprendió a trabajar con los paquetes de Arduino y de cámaras para MATLAB con lo que se logró realizar un programa con interfaz gráfica a través de la cual se controla la cámara y el Arduino. Las pruebas realizadas con la cámara web de la computadora se muestran en la figura 1.

[1]Universidad de Guanajuato, Ingeniería Física; Loma del Bosque 103, Lomas del Campestre, C.P: 37150, León, Gto, gutierrezsr2012@licifug.ugto.mx
[2]Universidad de Guanajuato, DCI, Departamento Ingenierías Química, Electrónica y Biomédica, Loma del Bosque 103, Lomas del Campestre, C.P: 37150, León, Gto, vimcarlos@fisica.ugto.mx

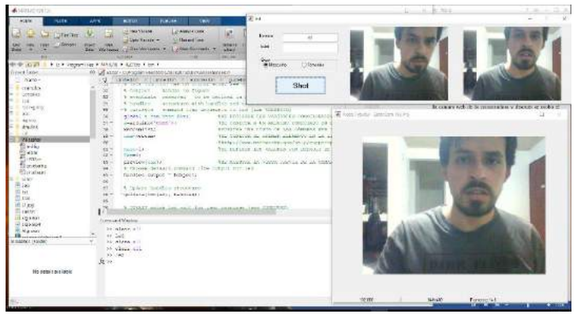


Figura 1. Captura de pantalla de la prueba del programa con la cámara web. La imagen de la izquierda muestra la primera imagen tomada con la cámara, la imagen de la derecha muestra la última foto tomada con la cámara. La imagen más grande es una pre-visualización en tiempo real de la imagen actual de la cámara.

Siendo exitosas las pruebas con la cámara web se procedió a conectar la cámara infrarroja, el programa con la cámara infrarroja se muestra en la figura 2 algunas de las fotos capturadas con la cámara infrarroja se muestran en las figuras 3 y 4.

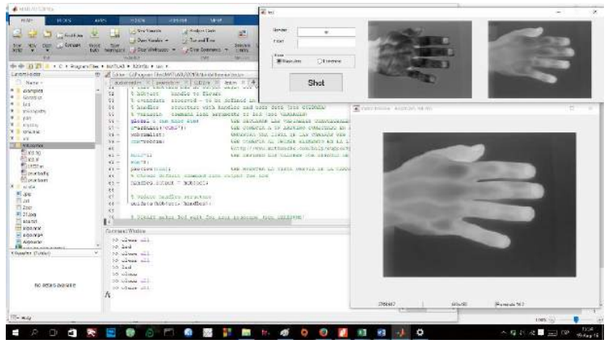


Figura 2. Captura de pantalla del programa con la cámara infrarroja. Las imágenes mostradas son de la mano de una persona sumergida en agua con hielos para observar el proceso de recuperación de temperatura.

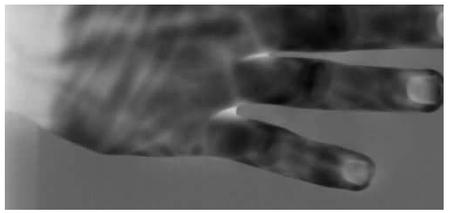


Figura 3. Primera foto tomada por la cámara infrarroja automáticamente, muestra la mano recién sumergida.

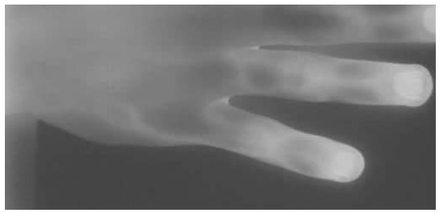


Figura 4. Última foto tomada por la cámara infrarroja automáticamente, muestra la mano después de 3 minutos.

Habiendo cumplido el objetivo de automatizar la adquisición de fotos de la cámara infrarroja el programa fue 1modificado para cumplir un propósito más específico, tomar fotos de cualquier cámara conectada, una con iluminación artificial y otra sin iluminación. El resultado de estas últimas pruebas se muestra en las figuras 5, 6 y 7.

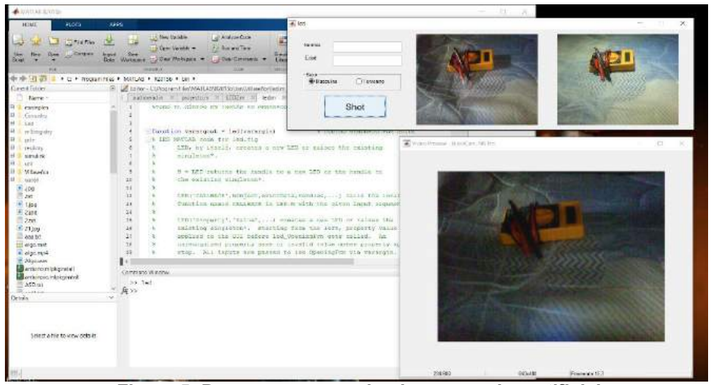


Figura 5. Programa que enciende y apaga luz artificial

Figura 6. Foto tomada con la iluminación artificial encendida

Figura 7. Foto tomada sin la iluminación artificial

CONCLUSIONES

La automatización de la toma de imágenes puede aplicarse no solo a la termografía si no a todas las técnicas fotográficas, es decir, con el uso de microcontroladores se pueden automatizar distintas tareas además de la adquisición de imágenes.

BIBLIOGRAFIA

"Arduino Support from MATLAB" en MathWorks. Consultada en http://www.mathworks.com/hardware-support/arduino-matlab.html (fecha de consulta 25-06-2016).

"Acquire Images from Webcams" en MathWorks. Consultada en http://www.mathworks.com/help/supportpkg/usbwebcams/ug/acquire-images-from-webcams.html (fecha de consulta 30-06-2016).

EXPRESIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA-ESTRUCTURAL DE ENZIMAS QUE PARTICIPAN EN LA DEGRADACIÓN DE TRIACILGLICEROLES EN EL ADIPOCITO

Hernández Ceja Carmen Lucero[1] y Lara González Samuel[2]

RESUMEN

ATGL es la enzima inicial responsable de la cascada de catabolismo de triacilgliceroles (TAG), su actividad se realiza de forma independiente de la barrera de proteínas que involucra la gota de lípido, siendo entonces muy importante en lipólisis basal. Sin embargo su actividad se encuentra regulada por las proteínas G0S2 y CGI-58, las cuales inhiben o incrementan su actividad respectivamente. Se han tenido desarrollos acerca de ésta enzima pero del complejo ATGL:CGI-58 son escasos y por lo tanto su estructura tridimensional es desconocida. Es por esto que el objetivo del trabajo es obtener las condiciones para la purificación y posterior cristalización del complejo. Se trabajó con una construcción de ATGL de humano que tenía deletado 30 aminoácidos del extremo amino terminal y se evaluó su solubilidad con respecto a la versión silvestre (WT). Transformándose en el plásmido pET28 de bacteria *E. coli* BL21(DE3) pLyss, se realizaron ensayos de expresión con el fin de obtener la condición óptima; después se hizo ensayo de solubilidad para poder cuantificar y tener una buena concentración de proteína. Sin embargo se observó que la mayor cantidad de proteína estaba en la fracción insoluble y con ella se llevó a cabo la purificación por columna de afinidad a níquel. Detectando que la adición de desnaturalizantes como urea, y uso de Tritón, glicerol 10% ayuda a obtener proteína soluble.

ABSTRACT

ATGL is the initial enzyme responsable for catabolism of triacylglycerols (TAG) cascade, its activity is independent of the protein barrier that involves the lipid droplet, making this lipase very important in basal lipolysis. However, its activity is regulated for G0S2 and CGI-58 proteins, which inhibit or increase their activity respectively. There have been developments about this enzyme but complex ATGL:CGI-58are scarce, and therefore its three-dimensional structure is unknown. The objective of this work is get the conditions for the purification and subsequent crystallization of the complex. We worked with a construction of ATGL of human that deleting 20 aminoacids of the end terminal amino and assessed its solubility with respect to the wild versión (WT). Transforming into plasmid pET28(DE3) in E. coli strains pLyss, subsequently expression assays were performed in order to obtain the optimal condition; we made essay of solubility to be able to quantify and have a optimal concentration of protein. We noted that the greater amount of protein was in insoluble part and with it the purification was carried out by nickel affinity column. Detecting that adittion of denaturant urea, and use of triton, glycerol 10% and □-ME helps to get soluble protein.

Palabras claves: Triacilgliceroles, adipocitos, lipólisis, ATGL, proteínas, expresión, purificación.

[1] Instituto Tecnológico de Celaya. Departamento de Ingeniería Bioquímica. Av. García Cubas Pte. #600 esq. Av. Tecnológico, Celaya, Gto., México. CP. 36000. lucero.hdezceja@gmail.com
[2] Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. División de Biología Molecular. Camino a la Presa San José 2055, Col. Lomas 4 sección. CP. 78216. San Luis Potosí. S. L. P. samuel.lara@ipicyt.edu.mx

INTRODUCCIÓN

Los lípidos, junto con las proteínas y los carbohidratos, son macronutrientes necesarios en la nutrición humana. Sus funciones biológicas son muy diversas, además de ser fundamentales en la formación de estructuras celulares, los lípidos son las moléculas de almacenamiento energético (1). Lípidos provenientes de la dieta o los que son sintetizados se almacenan principalmente en el tejido blanco adiposo (WAT) como triacilgliceroles (TAG), en una sola y grande gota de lípidos ocupan 85-90% del citoplasma, presionando el núcleo y una capa fina del citosol en la periferia de la célula (1).

Los TAG son lípidos neutros compuestos de tres ácidos grasos esterificados al carbono principal de una molécula de glicerol (7). Cuando la célula requiere de energía, los TAG son degradados por enzimas mediante un proceso denominado lipólisis.

Ésta hidrólisis secuencial es catalizada por tres diferentes enzimas, en la primera etapa, los TAG son hidrolizados a diacilglicerol (DAG) y una molécula de ácido graso es liberada, esta reacción es catalizada por la enzima ATGL. Después los DAG son convertidos a monoacilglicerol (MAG) y un segundo ácido graso por la acción de HSL. Al final, MGL hidroliza MAG, produciendo glicerol y el último ácido graso (4).

Desde el descubrimiento de lipasa triacilglicerol adiposo (ATGL) en 2004, se comenzó a realizar estudios para investigar y caracterizar los mecanismos de lipasa. Por lo tanto, su actividad hidrolítica en TAG hace a esta lipasa muy importante en lipólisis basal, lo cual incluye una hidrolasa esencial TAG llamada lipasa triacilglicerol adiposo (ATGL), el activador ATGL gen comparativo de identificación (CGI-58), y el inhibidor de ATGL G0/G1 gen interruptor (8). Juntos con lipasa sensible a hormona (HSL) y lipasa monoacilglicerol (MGL), estas proteínas constituyen la “maquinaria lipolítica” básica. Recientemente se encontró que en condiciones basales, HSL permanece predominantemente en el citosol, mientras que perilipina, ATGL y su co-activador, proteína Adhd5, también llamada CGI-58, se encuentran en la superficie de la gota de lípido, formando complejo inactivo que limita la actividad hidrolítica (2). ATGL es altamente específica y es responsable de la actividad en ambas condiciones.

ATGL, con un peso molecular de 54 kDa, tiene su importancia en el catabolismo, se muestra en ratones deficientes de ATGL y humanos con mutación en este gen. Mutaciones de ATGL en humanos es asociada con la acumulación sistémica de TAG, llamada “enfermedad de almacenamiento de lípidos neutros con ictiosis” (NLSDI). Una de las características de esta enfermedad es que los individuos presentan piel escamosa, acumulación de gotas de TAG en leucocitos, médula ósea, hígado y músculo (2).

Sin embargo se sabe que CGI es activador de la enzima ATGL pero no se conoce la interacción del complejo CGI-58/ATGL y por ende su estructura tampoco está determinada, por lo tanto el objetivo del presente trabajo es obtener las condiciones para su purificación y posterior cristalización, elucidando los conceptos del proceso de lipólisis en adipocitos blancos; optimizando estrategias para obtener enzima de forma soluble y a una alta concentración.

MATERIALES

Plásmido pET28 ATGL-**Δ**30, células competentes pET 28(DE3) pLyss, IPTG, antibióticos, amortiguadores, columna de afinidad a Níquel, Thermo-Block.

METODOS Parte I y II

ENSAYO DE EXPRESIÓN

Construcción de un vector de expresión.

A partir de una construcción elaborada en el laboratorio de Biología Estructural del IPICYT, previamente. La cual consiste en el vector de expresión pET28 con el gen de ATGL de humano, truncándole 30 aminoácidos del extremo N-terminal (pET28/hATGL_D30) que tiene resistencia a Kan.

I.Ensayo de expresión

Las cepas utilizadas en este experimento fueron BL21(DE3), ésta construcción se transformó en cepas pLyss de la bacteria *E. coli*, con resistencia a Chlo[50**µ**g/mL], por el método de transformación por choque térmico y plaqueo en medio LB, con resistencia a Kan[50**µ**g/mL]; dejándose en incubación a 37°C por 12h. Posteriormente se seleccionaron colonias de la placa para preparar un preinóculo con ATGL y otro con vector vacío, en medio LB líquido con sus correspondientes antibióticos, se dejó en incubación a 37°C por 12h en agitación continua.

El preinóculo se utilizó para inocular a una dilución 1:20 en medio LB líquido, con los antibióticos requeridos Kan[50**µ**g/mL] y Chlo [34**µ**g/mL], pasados 90 min aproximadamente se revisó la DO_{600} para alcanzar un rango de 0.6 a 0.8, se tomó t0. Se hizo una dilución 1:50 y se incubó a 37°C monitoreando la DO a las 2, 4, 6 y 8h, se indujo la expresión con 1mM de IPTG (isopropil *β*-D-1 tiogalactopiranósido) + 2% de aceite, se hizo por duplicado para evaluar la condición: sin aceite. El cultivo con las condiciones descritas se centrifugó a 6,000 rpm por 10 min a 4°C. Tomando muestra para analizar en SDS-PAGE. Posteriormente se desnaturalizó a 95°C por 10 min y se almacenó a -20°C. Evaluación de mayor concentración de proteína, para resolver ésta cuestión se precipitó con 1 mL de acetona y se centrifugó a 20,000 rfc por 10 min, se repitió lo anterior; se decantó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en amortiguador de lisis. Se realizó una dilución 1:10 para evaluar concentración por método de Bradford y conocer qué cantidad se encuentra para correr las mismas en el gel de expresión por SDS-PAGE y analizar su expresión. Para conocer la expresión de la proteína en cierta condición, se corrieron las muestras más buffer de carga, en gel de acrilamida desnaturalizante al 12% por SDS-PAGE, mediante ésta técnica se hace la separación en función de la masa molecular.

Pruebas de solubilidad.

Se evaluó la expresión y solubilidad de la proteína, lo cual permite conocer la concentración y poder cuantificar la cantidad de proteína presente. El pellet celular del paso anterior se resuspendió en amortiguador de lisis (8M urea, 1% Tritón, 1% CHAPS) y se sonicó (5 ciclos 10s ON/50s OFF a 40% de amplitud), para evaluar solubilidad el lisado se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min a 4°C. Se tomaron fracciones del sobrenadante y pellet, se calentaron a 95°C por 10 min, para analizarse por SDS-PAGE y método de Bradford.

PURIFICACIÓN por cromatografía de afinidad a Níquel

Para la purificación se utilizó una columna de agarosa Ni donde fue transferido el sobrenadante. Condición nativa: La columna se equilibró con 3CV de

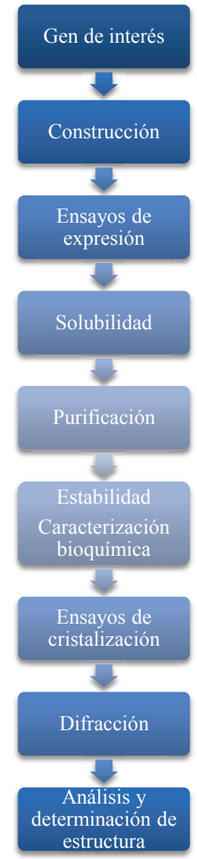


Figura 1. Diagrama de flujo del proceso de producción de proteínas

amortiguador (50mM Trsi pH 8.0, 10% glicerol, 150mM NaCl, 150mM KCl, 1mM β-ME, 10mM Imidazol) la elución se realizó con gradiente de imidazol de 10 a 500 mM. Las fracciones eluídas fueron recolectadas y se evalúo la expresión por SDS-PAGE. Condición desnaturalizante: La columna se equilibró con 3CV de amortiguador (Urea 8M, 50mM Tris pH 8.0, 0.5M NaCl, 1mM β-ME, 10mM imidazol, 1% Tritón). La elución se realizó con gradiente de imidazol de 10 a 500mM, para el amortiguador de 10 mM de imidazol se llevó a cabo con gradiente de urea 1CV (**∇** urea: 8,7,6,5,4,3,2,1,0.5, 0; 50mM Tris pH 8.0, 0.5M NaCl, 1mM β-ME, 10mM imidazol, 1% Tritón), después se lavó con 5 CV para amortiguador de 500mM de imidazol. Las fracciones eluídas fueron recolectadas y se evalúo la expresión por SDS-PAGE.

WESTERN-BLOT

Con la técnica de Western Blot se puede estimar el tamaño de una proteína, ser utilizado para comparar cuantitativamente los niveles de proteína entre muestras, etc. Se prepararon geles de acrilamida desnaturalizantes al 10% corriendo las muestras de 500mM de imidazol en ambas condiciones nativas y desnaturalizantes, usando anticuerpo de ratón y buffer de transferencia (Trizma base 25mM, glicina 192 mM, isopropanol 7.5% (V/V).

II. Se llevó a cabo la expresión, purificación e identificación de la proteína para **hATGL Δ30** en pLyss con resistencia a Kan[50mg/mL] y Chlo [34mg/mL] en presencia de **G0S2** en BL21 Star con resistencia a Kan[50mg/mL] y **CGI** en Codon Plus con resistencia a Strep [75mg/mL], Kan[50mg/mL], Chlo [34mg/mL] respectivamente, además de un vector pET28 vacío en pLyss con resistencia a Chlo [34mg/mL], como control negativo. La purificación en ambas condiciones sólo se realizó para pET 28 vacío. Al igual que en los métodos anteriores se tomó muestra para evaluar expresión por SDS-PAGE.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CLONACIÓN Y ENSAYO DE EXPRESIÓN

Ensayo de expresión: Los niveles de expresión de ATGL en cepas de *E. coli* son buenos además la adición de 1mM de IPTG indujo satisfactoriamente a la proteína, ya que se pudo observar buena expresión en los geles de corrida; en el ensayo de expresión se tuvo que la condición sin aceite y DO_{600}0.6 obtenido a 37°C a las 4h en continua agitación tiene mayor cantidad de células viables, para la expresión de nuestra proteína y para corroborar la buena expresión a la condición mencionada se corrieron geles por SDS-PAGE.

El uso de acetona para precipitar la proteína nos muestra resultados de gel homogéneos y mayor claridad para conocer qué condición es la mejor teniendo más muestra y así seguir con la metodología y cumplir con el objetivo.

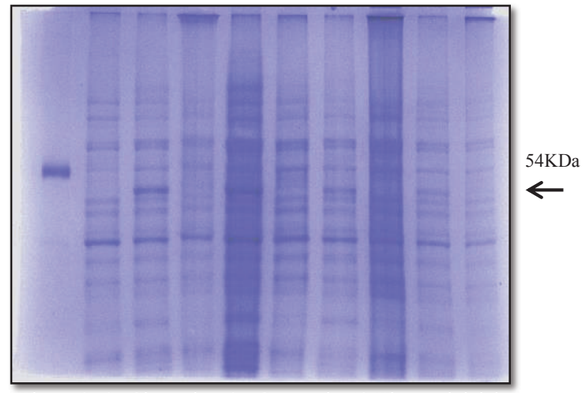


Figura 2 **s/a**: Sin aceite **c/a:** Con aceite **t0:**Tiempo inicial

Pruebas de solubilidad: Se encontró que el sonicado (5 ciclos, 10s ON/50s OFF) y amortiguador de lisis (50mM Trsi pH 8.0, 10% glicerol, 150mM NaCl, 150mM KCl, 1mM β-ME, 10mM Imidazol) nos da una mayor concentración de proteína hecho comprobado por el método de Bradford [1.75**µ**g/**µ**L].

Sin embargo expresión observada en SDS-PAGE refleja que en condiciones nativas no es soluble, así que se empleó una estrategia de desnaturalización (Urea 8M, 50mM Tris pH 8.0, 0.5M NaCl, 1mM β-ME, 10mM imidazol, 1% Tritón), se puede ver por SDS-PAGE que se obtuvo mayor cantidad de proteína en estas condiciones.

PURIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD A NÍQUEL

Los resultados arrojan que la proteína empieza a eluir a 500mM de imidazol obteniendo la mayor concentración de proteína de acuerdo a SDS-PAGE (Figura 3), pero en condiciones nativas no se tiene suficiente proteína para poder realizar ensayos de cristalización.

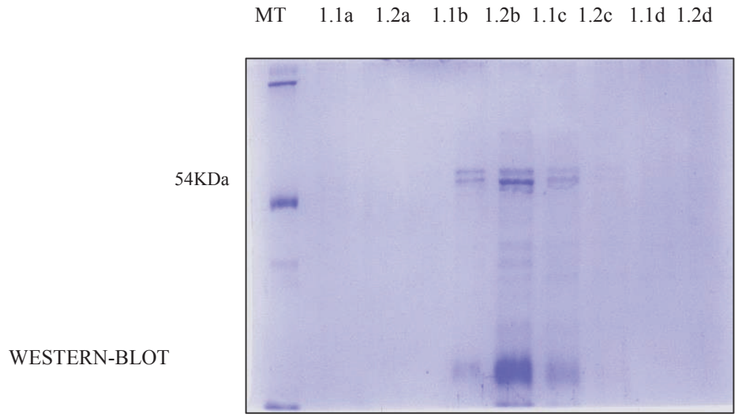


Figura 3. Elución a 500 mM de imidazol
a: C.Nativas WT **b:** C.Desnaturalizantes WT
c: C. Nativas **Δ**30 **d:** C. Desnauralizantes **Δ**30

Para asegurarse si nuestra proteína en esas condiciones está presente o si hay algún agregado o residuo, finalmente obtenemos que no hay proteína en la fracción insoluble pero sí degradación en la proteína.

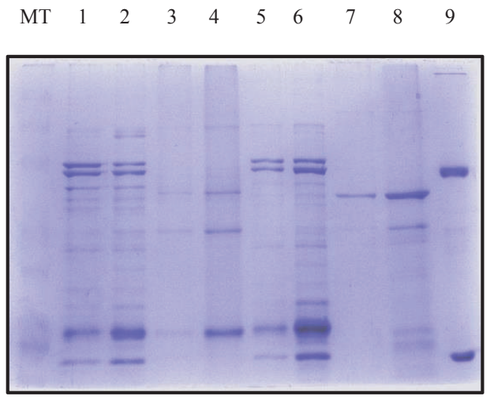


Figura 4. SDS-PAGE ATGLWT=**1,2**:10mM **3,4**:0.5M ATGL D30=**5,6**:10mM **7,8**:0.5M **9**:BSA y CGIcontrol

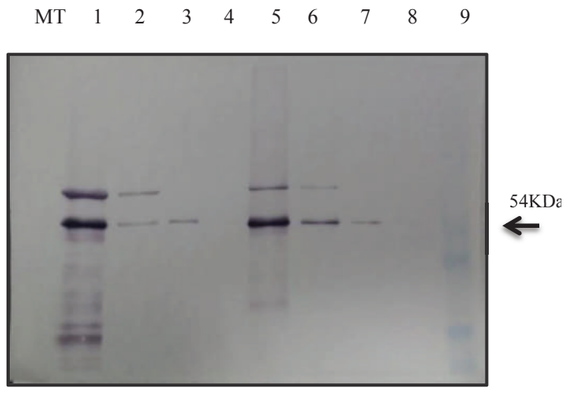


Figura 4. W. Blot ATGLWT=**1,2**:10mM **3,4**:0.5M ATGL D30=**5,6**:10mM **7,8**:0.5M **9**:BSA y CGIcontrol

Para comparar los resultados obtenidos con vector vacío, ATGL más CGI y GOS2 respectivamente, la metodología se siguió de la misma manera habiendo solo un cambio en la etapa de purificación de ATGL más CGI y G0S2, en donde no se purificó por gradiente de urea. Lo que nos resultó que el bandeo de degradación visto en Western-Blot es parte de la bacteria *E. coli* usada en transformación y no se trata de degradación de la proteína estudiada. Se vio por geles SDS-PAGE (Figura 6) que las fracciones solubles e insolubles de ATGL**Δ**30/G0S2 mostraban una mayor cantidad de proteína, sin embargo comprobando por Western (Figura 7) se descartó ésta posibilidad ya que no se tuvo una banda en la fracción soluble con la cual se puedan realizar ensayos de cristalización.

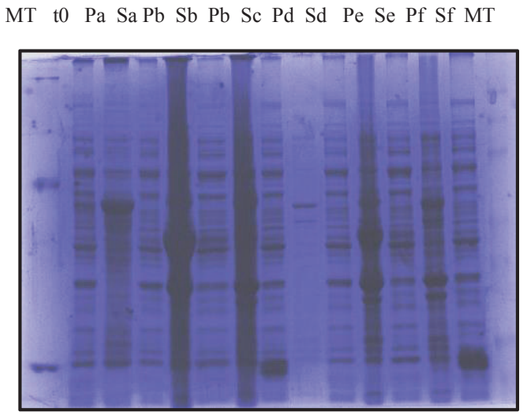


Figura 6. a: ATGL WT b:ATGL/CGI c: ATGL/G0S2 d: ATGL **Δ**30 e:ATGL**Δ**30/CGI f:ATGL**Δ**30/G0S2

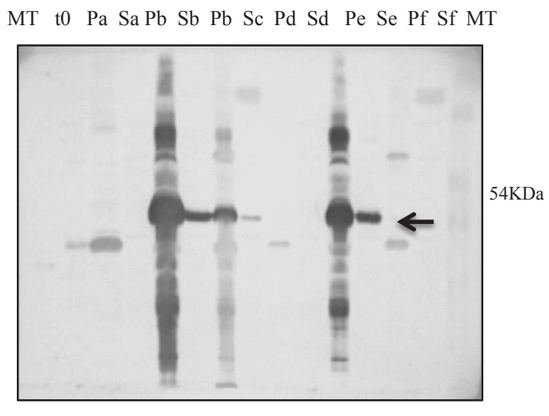


Figura 7. a: ATGL WT b:ATGL/CGI c: ATGL/G0S2 d: ATGL **Δ**30 e:ATGL**Δ**30/CGI f:ATGL**Δ**30/G0S2

CONCLUSIONES

Los adipocitos contienen la mayor fuente de reserva de energía almacenada en el cuerpo en forma de triacilgliceroles. En el mecanismo enzimático de hidrólisis la participación de enzima ATGL es vital ya que si se interrumpe el proceso no continúa, es por ello que se necesita conocer más, tanto de las vías de transducción de señales que regulan la movilización de lípidos en adipocitos como de las funciones de las enzimas que están implicadas. La proteína recombinante ATGL a la cual se le retiró 30 aminoácidos terminales clonada en el vector pET28 (DE3) se expresa eficientemente en cepas de pLyss de *E. coli* inducido con IPTG a 37°C durante 4h. ATGL**Δ**30 se obtiene mejor purificada en 500mM de imidazol por columna de afinidad a níquel, con buena concentración en SDS-PAGE, a pesar de esto se observa por Western-Blot que en condiciones nativas no se tiene fracción soluble pero en condiciones desnaturalizantes se presenta fracción soluble y degradados lo que podría ser útil para ensayos de cristalización, sin embargo falta evaluar el efecto de estabilidad.

El uso de *E. coli* como vector de transformación es viable pero nos muestra degradación de ella misma que puede confundirse con la proteína; la inducción de la proteína con G0S2 ayuda a tener mayor cantidad de esta, ya que actúa como un inhibidor del mecanismo lipotóxico y estimula la actividad de ATGL, pero en condiciones nativas no se obtiene soluble probablemente debido a cambio conformacional que presenta y su interacción hidrofóbica. Queda pendiente evaluar ensayos de estabilidad en diversas condiciones pero hasta aquí podemos decir que la adición de desnaturalizantes como urea, y uso de Tritón y glicerol 10% ayuda a incrementar la cantidad de proteína obtenida.

REFERENCIAS

1. Bolsoni, A (2015). Lipolysis and lipases in White adipose tissue-An update, São Paulo, Scielo.

2. Lass A (2010) Lipolysis-A highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of celular fat stores, USA, Progress in Lipid Research, Elsevier

3. Eichmann T (2015). ATGL and CGI-58 are lipid droplet proteins of the hepatic stellate cell line HSC-T6, Austria, American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.

4. Sánchez B (2007). Vías de Señalización que Participan en la Regulación de la Lipólisis en Adipocitos, México, D.F. UNAM.

5. Daber, R (2007) Structural analysis of lac repressor bound to allosteric effectors. Journal of molecular biology 370.

6. Khatib, A (2016). Reassessing the Potential Activities of Plant CGI-58 Protein, Austria, PLOS one. http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0145806

7. The medical biochemistry page.org (2016). Fatty Acid Oxidation. http://themedicalbiochemistrypage.org/es/fatty-acid-oxidation-sp.php

8. Heir C (2015). G0/G1 Switch Gene 2 Regulates Cardiac Lipolysis, Austria, Institut of Molecular Biosciences.

Soriano J (2006). Nutrición básica humana, Valencia, España. Universitat de València, Pag:96-97.

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE HIDROGELES ELECTROACTIVOS DE POLI(ACRILAMIDA-CO-ÁCIDO ACRÍLICO)/POLIPIRROL

Carlos Antonio Hernández Landín[1] y Victor Manuel Ovando Medina[2]

RESUMEN

En este trabajo, se sintetizaron hidrogeles de poli(acrilamida-*co*-ácido acrílico) (AAm/AAc) variando la relación de acrilamida/ácido acrílico en 100:0, 70:30 y 50:50 usando persulfato de amonio como iniciador. Los hidrogeles obtenidos de esta manera, fueron usados para preparar un composito de hidrogeles electroactivos mediante la polimerización de pirrol en presencia de los hidrogeles, obteniendo un composito de AAm/AAc/Polipirrol. Los materiales fueron caracterizados mediante espectroscopia de FTIR y se determinaron sus propiedades de hinchamiento. Se observó mediante un modelo de hinchamiento de pseudo-primer orden que el hidrogel con mayor capacidad de hinchamiento y mayor velocidad de hinchamiento inicial fue el hidrogel AAm/AAc 70/30, siendo de igual manera rígido en su estructura y resistente en su manipulación.

ABSTRACT

In this report Hydrogels were synthesized from poly(acrylamide-*co*-acrylic acid) (AAm/AAc) varying the relation of acrylamide/acrylic acid in 100:0, 70:30 and 50:50 using ammonium persulfate as initiator. Hydrogels obtained from this way, were used to prepare an electroactive hydrogels composite through the pyrrole polymerization in presence of the hydrogels, obtaining an AAm/AAc/Polypyrrole composite. Materials were characterized by FTIR spectroscopy and it was determined their properties of swelling. It was observed by swelling kinetic of pseudo first order the hydrogel with higher swelling maximum capacity and higher initial swelling speed was hydrogel AAm/AAc 70/30, being also rigid in his structure and resistant on him manipulation.

Keywords: Hydrogel, polymerized, swelling_kinetic, Polypyrrole.

INTRODUCCIÓN

Los sistemas avanzados de liberación controlada ofrecen un grado significativo en la libertad en la elección del lugar de aplicación. Mientras que muchas formulaciones tradicionales deben ser inyectadas o ingeridas, los sistemas poliméricos de liberación controlada pueden ser localizados prácticamente en cualquier cavidad corporal, de modo que estos soportes de fármacos pueden situarse en el organismo en, o cerca de la zona de interés, pueden ser implantados o pueden ser adheridos externamente a la piel, gracias a ello han aparecido nuevas rutas posibles de administración de fármacos. Los sólidos poliméricos son especialmente aptos para formar geles gracias a su estructura de largas cadenas. La flexibilidad de estas cadenas hace posible que se deformen para permitir la entrada de moléculas de algún disolvente dentro de su estructura tridimensional.

Como antecedentes se tiene el desarrollo de hidrogeles electroconductivos inteligentes por polimerización de pirrol dentro de hidrogel de poliacrilamida para impartir las propiedades múltiples de estímulos sensibles, además de la optimización de la formación del hidrogel (Sáez y Sanz, 2016). De igual manera el antecedente de la preparación química de nanoestructuras de polipirrol (PPy) de soluciones acuosas individuales que contengan L-serina y ácido L-glutamico para la comprobación de la aplicación como dispositivo de implante con objetivo de la liberación de un fármaco (Valencia, 2014). En éste último trabajo, además se hace mención que el polipirrol ha sido extensivamente

[1] Instituto Tecnológico de Celaya, Av. Tecnológico y Antonio García Cubas Pte #600, C.P. 38010, Celaya, Guanajuato., MÉXICO, E-mail: 13030671@itcelaya.edu.mx
[2] Universidad Autónoma de San Luis Potosí Coordinación Académica Región Altiplano (Campus Matehuala), Carretera Cedral KM 5+600, Col. Ejido San José de las Trojes, C.P. 78700, Matehuala, San Luis Potosí., MÉXICO, victor.ovando@uaslp.mx

estudiado dado su capacidad térmica y química, facilitando la preparación y electroactividad y es conocido como material biocompatible por lo cual ha sido utilizado en algunas aplicaciones medicas que incluyen biosensores, ingeniería de tejidos, implantes neurales y dispositivos de administración de fármacos. Para los usos biomédicos, la adhesión de biomoleculas o especies biológicamente activas a polipirrol (PPy) es un paso crítico para lograr su biofuncionalidad.

MARCO TEÓRICO

En la síntesis de hidrogeles junto a los elementos habituales de cualquier reacción de polimerización, tales como el disolvente, monómero y el iniciador, se necesita de un agente entrecruzante, que será el responsable de la estructura rígida del gel (Ratner y Hoffman, 1976). Al sintetizar un hidrogel se puede elegir un gran número de monómeros los cuales se dividen en distintas categorías, monómeros con sustituyentes laterales no ionizables (de entre los cuales se puede incluir a la acrilamida); monómeros con grupos funcionales ionizables o monómeros zwiteriónicos, estos últimos consisten en dos grupos cargados y unidos a la cadena principal. Su característica primordial es que para el polímero entrecruzado el hinchamiento de la red es mayor en disolución salina que en agua.
Los hidrogeles se preparan mediante el hinchamiento de una estructura entrecruzada en agua o fluidos biológicos que contienen grandes cantidades de ésta. De entre los métodos para su preparación entrecruzada está la reacción química, el cuál es una reacción de copolimerización y entrecruzamiento entre uno o más monómeros y un monómero multifuncional el cual está presente en pequeñas proporciones, este último es denominado agente entrecruzante el cual presenta una masa molecular pequeña que se une a cadenas de peso molecular grande a través de sus grupos funcionales. Es necesario emplear un agente desencadenante de la reacción de polimerización o iniciador. Los sistemas de iniciación que pueden emplearse son los habituales en la síntesis de polímeros, siendo estos radicales libres, temperatura, iniciadores iónicos, radiación gamma o par redox (Sáez y Sanz, 2003).

METODOLOGÍA

Durante la experimentación en el laboratorio se utilizaron los siguientes reactivos descritos en la Tabla 1 con su respectivo grado de pureza y la compañía de la cual el reactivo fue adquirido. Dichos reactivos fueron utilizados tal y como se encontraban en su almacenamiento en el laboratorio. Así mismo se hizo uso del equipo de infrarrojo Agilent Technologies Cary 630 FTIR para la obtención de los espectros de infrarrojo.

Tabla 1. Reactivos químicos usados en la experimentación

Reactivo	Compañía	Grado de pureza
Acrilamida	Sigma Aldrich	>99%
Persulfato de amonio	Jalmek	>=98%
N,N' – Bisacrilamida de metileno	Sigma Aldrich	99%
Acido acrílico	Sigma Aldrich	99%
Pirrol	Aldrich Chemistry	98%
Cloruro de potasio, Cristal	J.T. Baker	100%

Síntesis de la matriz de poliacrilamida con ácido acrílico (PAAm/AAc).
En un vial de tapa rosca con capacidad de 25 ml se depositaron agua destilada para posteriormente pesar y agregar una dewtrminada cantidad de acrilamida (AAm) y una vez se realizó su completa disolución se pesó y disolvió acido acrílico (AAc) en la solución y una vez se disolviera realizar lo mismo con N,N' Bisacrilamida de metileno (NNMBAM) y de igual manera con persulfato de amonio según las cantidades que le correspondiese según la sustancia a tratar para la realización del hidrogel mostradas en la Tabla 2. Los viales se colocaron a baño maría a 60ºC con una agitación magnética por un periodo de una hora para que después del periodo de reacción la sustancia en el vial cambiara de estado líquido a sólido mostrando así la formación del hidrogel. El vial contenedor de cada hidrogel fue roto para así liberar el hidrogel y colocarlo en un vaso de precipitados con 200 ml de agua destilada de manera que el hidrogel fuese cubierto completamente por el agua con el

objetivo de retirar impurezas de los componentes que no reaccionaron. Este proceso de lavado se repitió por cuatro veces, cambiando el agua de lavado cada doce horas. Así mismo se realizaron duplicados de la síntesis de los hidrogeles siendo una caracterización y otra para su posterior uso en la polimerización de pirrol.

Tabla 2. Cantidad en gramos de reactivos de composición de hidrogeles según sus concentraciones en base de acrilamida y ácido acrílico

	Agua, g	AAm, g	AAc, g	NNMBAM, g	APS, g
AAm/AAC 100/0	20	2.40	0.00	0.024	0.014
AAm/AAC 70/30	20	1.68	0.72	0.024	0.014
AAm/AAC 50/50	20	1.20	1.20	0.024	0.014

Polimerización de pirrol dentro de la matriz de poliacrilamida y ácido acrílico.
Los hidrogeles lavados se cortaron en discos de 3 cm de longitud y se dejaron reposar en una solución de agua destilada (200ml), pirrol como monómero (1.34 gr) y cloruro de potasio como electrolito de transporte (3.5 gr) por aproximadamente 24 horas con el fin de permitir la difusión/adsorción de pirrol en el interior del hidrogel. Una vez terminado el tiempo para la difusión de pirrol en el hidrogel se recurrió a la técnica de oxidación con persulfato de amonio en la solución acuosa de los hidrogeles en la misma concentración molar que la del pirrol en dicha solución (0.0099866 M) siendo la cantidad de 4.56 gramos de persulfato de amonio. Una vez realizado esta oxidación se lavó el hidrogel en agua destilada a manera de sumergir los hidrogeles completamente con el fin de retirar impurezas cambiando así el agua en un ciclo de 12 horas repitiendo dicho ciclo 4 veces.

Los hidrogeles que se guardaron como replicas no se polimerizaron. Se tomaron muestras de estos hidrogeles y de aquellos con pirrol y así fueron secados en estufa con el objetivo de realizar un espectro FTIR e identificar sus grupos funcionales y así, discutir si dicho hidrogel tenía los grupos funcionales requeridos por sus compuestos. De igual manera se tomaron muestras de los hidrogeles polimerizados con objetivo de realizar la cinética de hinchamiento siendo que dichas muestras fueron secadas en estufa hasta lograr un peso constante (peso inicial) y llevadas a agua destilada para su constante monitoreo y revisión por lapsos de tiempo para la medición de su peso hasta alcanzar un equilibrio en donde dichos hidrogeles no incrementaran su peso en lapsos de tiempo considerablemente largos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La cantidad en gramos de cada componente de los hidrogeles se reportan en la tabla 3 con el hidrogel (A) y su réplica (B).

Tabla 3. Cantidad en gramos reportada de los hidrogeles y sus réplicas en la experimentación

	Agua, gr	AAm, gr	AAc, gr	NNMBAM, gr	APS, gr
AAm/AAc 100/0 (A)	20.02	2.4024	0	0.0242	0.0137
AAm/AAc 100/0 (B)	20.13	2.4076	0	0.0246	0.0141
AAm/AAc 70/30 (A)	20.03	1.6794	0.7226	0.0248	0.0147
AAm/AAc 70/30 (B)	20.09	1.6829	0.7226	0.0239	0.0137
AAm/AAc 50/50 (A)	20.05	1.2010	1.2116	0.0242	0.014
AAm/AAc 50/50 (B)	20.04	1.2003	1.2026	0.024	0.0148

Estas cantidades de solución fueron colocadas en viales a baño maría por una hora a 60°C para llevar a cabo la síntesis de la matriz. Terminado dicho proceso, se lavaron con agua destilada para retirar impurezas. Por el contacto extenso con el agua algunos hidrogeles se hincharon como se muestra en la figura 1, figura 2 y figura 3.

Figura 1. Hidrogel AAm/AAc 100/0

Figura 2. Hidrogel AAm/AAc 70/30

Figura 3. Hidrogel AAm/AAc 50/50

Los hidrogeles fueron cortados en cilindros de 3 cm de longitud de los cuales se obtuvieron dos cilindros por cada hidrogel aproximadamente. Se preparó la solución de pirrol con las concentraciones reportadas en la tabla 4 y se dejó reposar un cilindro de cada hidrogel en su respectiva solución.

Tabla 4. Solución para la polimerización de los hidrogeles

	Agua destilada, gr	Pirrol, gr	KCL, gr
Solución AAm/AAc 100/0 (A)	200	1.35	3.5001
Solución AAm/AAc 70/30 (A)	200	1.35	3.4995
Solución AAm/AAc 50/50 (A)	200	1.36	3.5071

Posteriormente de un lapso de tiempo se realizó la polimerización con ayuda de un potenciostato a 1.5 V por 10 minutos al hidrogel AAm/AAc 100/0 sin embargo no se obtuvieron los resultados esperados puesto que el hidrogel no reaccionó de la manera propuesta siendo que se deshizo por las descargas y el tiempo de 10 minutos no fue óptimo en dicha polimerización (Cotlame 2016) por lo cual se optó por la técnica de oxidación con persulfato de amonio en la solución de pirrol en la cual los hidrogeles se encontraban reposando. Al término de su lapso de oxidación, se tomó una muestra de los hidrogeles polimerizados y de las réplicas que no fueron polimerizadas para ser llevadas a secado por estufa a 60°C con el fin de realizar un análisis en infrarrojo y así determinar sus grupos funcionales en dichos hidrogeles para comprobar la obtención de dichos grupos característicos de los componentes en el hidrogel, ver figura 4 y figura 5.

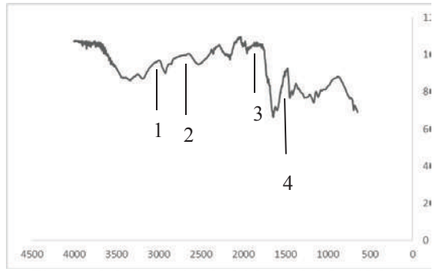


Figura 4. Infrarrojo de hidrogel AAm/AAc 50/50 sin pirrol (no polimerizado)

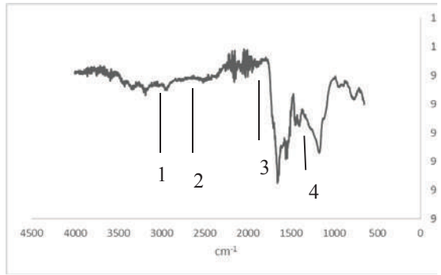


Figura 5. Infrarrojo de hidrogel AAm/AAc 50/50 con pirrol (polimerizado)

Siendo 1. Amina ($-NH_2$), 2. Grupo carboxílico (-COOH), 3.Cetona (C=O), 4. Amida ($-CONH_2$) por lo cual los hidrogeles obtuvieron los grupos funcionales y además en la figura 6 la cetona es más a resaltar por el pirrol.

De misma manera se tomaron muestras de los hidrogeles polimerizados y de las réplicas no polimerizadas para llevar a cabo un análisis de hinchamiento llevando los hidrogeles a secado y luego sumergiéndolos en agua destilada, tomando muestra del peso y tiempo sumergido hasta alcanzar un equilibrio con el fin de obtener una de hinchamiento gracias a la ecuación 1), ecuación 2) y ecuación 3) (Peppas, 1983).

$$S = \frac{m_t - m_0}{m_0} x100\% \quad (1)$$

$$W = \frac{m_t - m_0}{m_t} x100\% \quad (2)$$

$$k_{2,s}t = \frac{1}{(q_{eq} - q)} - \frac{1}{q_{eq}} \quad (3)$$

Así dio paso a la obtención de la figura 6 y la figura 7. Se determinó el peso de hinchamiento máximo ($q_{máx}$), la constante de hinchamiento ($K_{2,s}$) y la velocidad inicial de hinchamiento (r_0) mostradas en la tabla 5.

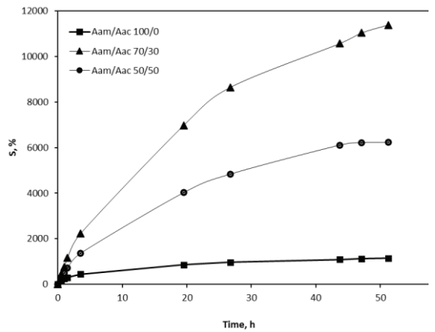


Figura 6. Cinética de hinchamiento de hidrogeles en función de AAm/AAc

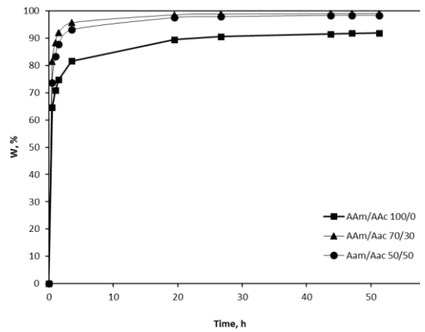


Figura 7. Porcentaje de agua absorbida por los hidrogeles

Tabla 5. Resultados de la muestra de hinchamiento

	$q_{máx}$	$K_{2,s}$, $x10^{-3}$	r_0, h^{-1}
AAm/ AAc 100/0 (1)	12.7551	251.08497	40.84967
AAm/AAc 70/30 (2)	136.9863	0.5748651	136.9863
AAm/AAc 50/50 (3)	74.6268	1.296462	7.22021

La constante de hinchamiento del hidrogel sin ácido acrílico es alta en comparación con aquellos que tienen ácido. Además el hidrogel que tiene mayor velocidad inicial de hinchamiento es el (2), siendo que de igual manera es aquel que tiene el mayor peso de hinchamiento máximo de entre los hidrogeles. Sin embargo el que tiene menor velocidad de hinchamiento inicial es el (3) siendo incluso aún más baja que el (1) pero con mayor peso de hinchamiento gracias al ácido acrílico.

CONCLUSIONES

- La cinética de hinchamiento de AAm/AAc 70/30 fue la mayor dada su consistencia física más rígida. Su capacidad de absorber agua igualmente es proporcional al acido acrílico sin embargo la Acrilamida es de igual importancia como muestra el hidrogel AAm/AAc 50/50 y el 100/0, siendo que el mejor balance para la mayor capacidad y mayor velocidad de hinchamiento fue AAm/AAc 70/30.
- La consistencia física de los hidrogeles se ve afectada por la concentración de ácido acrílico, siendo aquel con una concentración cero de ácido el más rígido y resistente por sobre los demás y aquel con concentración de 50/50 como el más delicado pues por la manipulación del mismo tiende a deshacerse.

REFERENCIAS

1. Peppas, N.A., Franson, N.M. (1983). A simple equation for description of solute reléase II. Fickian and anomalous release from swellable devices. J Control Release 5: 37-42.
2. Ratner, B., & Hoffman, A. (1976) Hydrogels for Medical and Related Applications. *American Chemical Society*, 1.
3. Sáez, V., Hernández, E., & Sanz-Angulo, L. (2003). Liberación controlada de fármacos. Hidrogeles. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, *4*(1), 21-91.
4. Saha, S., Srkar, P., Mrinmoy, S., & Girl, B. (2015). Electroconductive Smart polyacrylamide-polypyrrole (PAC-PPY) hidrogel: a device for controlled reléase of risperidone. *Royal Society of Chemistry*.
5. Valencia, L., Pérez, C., Del Castillo, T., Castillo, O., & Carmelo J. (2014). Chemical Polymerization of pyrrole in the presence of L-serine or L-glutamic acid: Electrically controlled amoxicillin release from composite hydrogel. *Journal of Applied Polymer Science.*

INDUCCIÓN DEL ESTADO STRAIN-GLASS MEDIANTE TRATAMIENTO TÉRMICO EN LA ALEACIÓN $Ni_{50}Mn_{34}In_{14}Cr_2$

A Alejandra de Jesús Hernández Saucedo[1] y Horacio Flores Zuñiga[2]

RESUMEN

El estado strain glass es un estado estáticamente desordenado en un sistema ferroelastico/martensíta que normalmente presenta una serie de propiedades que lo caracterizan como el efecto memoria de forma, la superelasticidad, pero que no sufre transformación martensítica de manera detectable por métodos comunes. Se partió de una aleación $NI_{50}Mn_{34}In_{14}Cr_2$ en estado martensítico elaborada por fusión en arco eléctrico. Para obtener el estado strain glass se realizaron tratamientos térmicos a 500ºC por 8 h y 26 h, y a 600ºC por 8h y 40h hasta lograr que no se detectara la trasformación martensítica. Se utilizó la técnica de calorimetría diferencial de barrido DSC para analizar la transición martensítica. La microestructura y análisis químico elemental se obtuvieron mediante microscopía electrónica de barrido con espectrómetro EDS. Se demostró que los tratamientos térmicos de 500ºC por 26h y 600ºC por 40h tienen un fuerte efecto sobre la transformación martensítica de la aleación logrando así tener una de las características del estado strain glass, que es, la no detección en DSC de la transformación martensítica en la aleación.

ABSTRACT

The strain glass state is a disordered state in a statically ferroelastic / martensite system that exposes a number of properties that characterize it, as the shape memory effect, super elasticity and also doesn't undergo martensitic transformation in a typical way with common methods. The study started from a martensitic $Ni_{50}Mn_{34}In_{14}Cr_2$ alloy elaborated by arc melting fusion. In order to obtain the strain glass state some heat treatments were carried out: 500°C for 8h and 26h, and 600°C for 8h and 40h until martensitic transformation is not longer detected. The Differential scanning calorimetry DSC has been used to detect the martensitic transformation. Microstructure and chemical composition have been studied in a Scanning electron microscope, which is equipped with an EDS spectrometer. It has been demonstrated that heat treatment of 500°C for 26h and 600°C for 40h have a strong effect on the martensitic transformation, because, the null detection of martensitic transformation in DSC.

Palabras Clave: Transicion glass, Transición martensíta, Strain-glass,

INTRODUCCIÓN

Toda materia tiende a tomar una forma más ordenada a baja temperatura para reducir la entropía, como lo requiere la tercera ley de termodinámica. Esta exigencia termodinámica es el origen de una gran variedad de transiciones de desorden-orden observadas en la naturaleza. El ejemplo más familiar es la transición líquido-cristal, que es un ordenamiento de configuración atómica. El ordenamiento de otras cantidades físicas es también conocido, como el ordenamiento de momento magnético, el dipolo eléctrico, y finalmente de la deformación elástica. Las transiciones desorden-orden correspondientes son la transición ferromagnética, la transición ferroeléctrica, y la transición ferroelástica/martensítica, respectivamente. Estas transiciones juegan un papel central en materiales estructurales y funcionales y son también tema importante de la ciencia de materiales y de la física [1].

[1] Universidad Autónoma de Aguascalientes, Centro de Ciências Básicas; Av. Universidad # 940, Ciudad Universitaria, C.P: 20131, Aguascalientes, Aguascalientes, alejabdradejesus@gmail.com
[2] Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, División de Materiales Avanzados; Camino a la Presa San José 2055, Lomas 4 sección, C.P: 78216, San Luís Potosí, San Luís Potosí, horacio.flores@ipicyt.edu.mx

Por otro lado, existen las transiciones vítreas, que producen un estado congelado del sistema desordenado y que sólo tiene orden a muy corto alcance. Estas transiciones desorden – vidrio son las transiciones conjugadas correspondientes a las transiciones desorden-orden (Figura 1). Este estado vítreo se produce en general por la introducción de defectos puntuales en un sistema que sufre la transición desorden-orden [1]. Ésta se ha observado en una amplia gama de sistemas complejos y por lo general ocurre debido a la existencia de aleatoriedad, que causa la frustración de la transición, de tal manera que el ordenamiento de largo alcance sea inaccesible [2,3].

La transición desorden-vidrio más familiar es la transición estructural, la cual es la transición conjugada a la transición líquido-cristal. La transición estructural vítrea puede formarse por dopaje de suficiente cantidad de defectos puntuales en un sistema puro que tiene una transición normal líquido-cristal, por ejemplo Na en SiO_2.

La transición ferromagnética tiene una transición conjugada que se llama “spin glass”; ésta puede ser formada por el dopaje de defectos no magnéticos en un sistema ferromagnético, y el resultado es un arreglo desordenado congelado de dipolos magnéticos. La transición ferroeléctrica tiene la transición vítrea llamada “relaxor”; ésta puede se forma introduciendo defectos puntuales en un sistema ferroeléctrico y el resultado es un arreglo congelado desordenado de dipolos eléctricos. Una transición vítrea de deformación “strain glass", es la transición conjugada de una transición ferroelástica/martensítica [1].

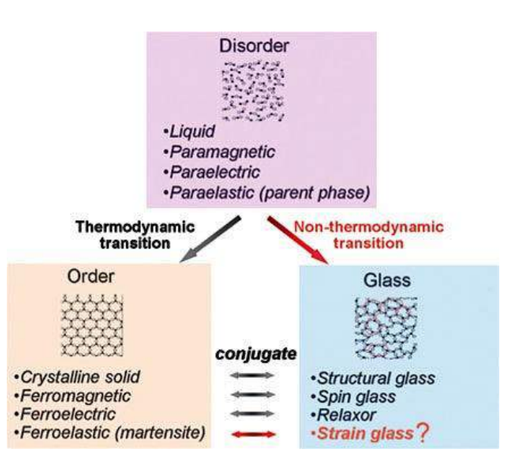


Figura 1. Hay dos clases de transiciones de fase en la naturaleza: desorden-orden y desorden-vidrio (desorden congelado)

La transformación martensítica, es una transición termodinámica, caracterizada por la existencia de una temperatura de transición clara, en la cual un cambio repentino del orden de largo alcance ocurre, y es acompañada por una transferencia de calor. Por lo tanto, tales transiciones termodinámicas fácilmente pueden ser identificadas descubriendo el efecto térmico, el cambio estructural/simetría, y los dominios grandes de la fase de baja temperatura.

La transformación martensítica es una transformación sólido-sólido de primer orden sin difusión por movimiento coordinado de átomos en distancias menores a las interatómicas. Por lo tanto, esta nueva fase mantendrá la composición y el orden atómico de la fase inicial, debido a que la posición relativa

de los átomos se mantiene durante la transformación. La transformación se produce entre una fase de alta temperatura, también llamada austenita, y una fase de baja temperatura, o martensita [5]. Esta transformación es la causa del efecto memoria de forma y de la superelasticidad.

Entonces el strain glass en un estado vítreo en un sistema ferroelastico/martensíta que no sufre transición martensítica detectable por DSC, por lo que no sería lógico esperar los efectos de memoria de forma, y superelasticidad. Sin embargo, el strain glass también puede presentar un efecto de memoria de forma muy similar a una aleación martensítica normal, además también puede tener superelasticidad [1].

En objetivo de este proyecto, es el estudio de la aleación $Ni_{50}Mn_{34}In_{14}Cr_2$, y en particular el efecto de los tratamientos térmicos en la transformación martensítica y en las temperaturas características de dicha transformación con el fin de obtener el estado strain-glass en la aleación. El análisis de la temperatura de trasformación martensítica se estará monitoreando con estudio de DSC, hasta lograr que prácticamente desaparezca la transición martensítica en las curvas de calorimetría, bajo la hipótesis de que esto nos dará indicios de que la aleación $Ni_{50}Mn_{34}In_{14}Cr_2$ aparentemente "no transforma" pero sufre transición strain glass. También se realizará ccaracterización microestructural de la aleación y de la composición química.

MÉTODOS Y MATERIALES

Para obtener la aleación $Ni_{50}Mn_{34}In_{14}Cr_2$, primero se consiguieron los metales puros de Ni, Mn, In y Cr. Después se realizaron cálculos para conocer la masa requerida de cada metal y posteriormente se usa la Balanza Analítica (OAHUS Explorer) para obtener las masas requeridas para la estequiometría. Enseguida los metales se introdujeron a un horno de arco eléctrico, donde la aleación se obtiene por fusión de los elementos puros. Así la aleación $Ni_{50}Mn_{34}In_{14}Cr_2$ se obtiene en barra. Posteriormente se encapsuló en argón y se le dio un tratamiento térmico de 24h a 900°C en el horno tipo mufla (Thermolyne 48000 Furnaceport) y se templó en agua con hielo. Después la barra de aleación se cortó en tres trozos iguales en la Cortadora de Disco de Diamante (SBT modelo 650).

La Pieza 1 sin tratamiento térmico posterior (STT): Se cortó en dos trozos. Uno de ellos se pulverizó en un mortero de ágata para estudiarlo en Difracción de rayos X (XDR SmartLab RIGAKU –DRX: 20 a 100). El segundo trozo se pulió para obtener acabado espejo (lijas 400, 600, 2400 y 4000, paño con Al_2O_3 de 0.3µm para la observación en el Microscopio Electrónico de Barrido (ESEM FEI-QUANTA 200). Asimismo se adquirieron 6 espectros EDS y micrografías a diferentes aumentos (1-50 X) y (5-100 X).

La Pieza 2 (TT 500ºC): Encapsulada en atmósfera de Ar se trató a 500°C por 1h, 500°C por 2h, 500°C por 3h, hasta que desapareció la transición martensítica. A las 8h de tratamiento térmico a 500°C (la muestra en tubo de cuarzo se templa en agua con hielo) un trozo de la pieza se utilizó para el análisis de calorimetría diferencial de barrido (DSC) y otro trozo se sometió a un microlijado (como la pieza 1) para la observación en el mismo Microscopio Electrónico de Barrido, y se adquirieron 6 espectros EDS y micrografías (1-50 X) y (5-100 X). A las 26h de tratamiento térmico a 500°C (la muestra en tubo de cuarzo se templa en agua con hielo) un trozo de la pieza se pulverizó para análisis en el mismo equipo de Difracción de rayos X, y finalmente otro pequeño trozo se utilizó para el análisis de DSC.

La Pieza 3 (TT 600ºC): Tratamientos térmicos a 600°C por 1h, 600°C por 2h, 600°C por 3h… hasta que desaparece la transición martensítica. A las 8h de tratamiento térmico a 600°C se le cortó un trozo que se utilizó para el análisis DSC y otro trozo se preparó para la observación en microscopio de barrido SEM dándole acabado espejo y así adquirir 6 espectros EDS y micrografías (1-50 X) y (5-100 X). A las 40h de tratamiento térmico a 600°C un trozo de la pieza se pulverizo para análisis en el equipo de Difracción de rayos X, y otro pequeño trozo se utilizó para el análisis DSC.

RESULTADOS

La figura 2 muestra las curvas de calorimetría DSC de la pieza 1 (STT), de la pieza 2 con tratamiento térmico 500°C por 8h y de la pieza 3 con tratamiento térmico 600°C por 8h. En la calorimetría de la pieza 1 obtenida en rampas de enfriamiento y calentamiento entre -80°C y 500°C, con temperatura constante de 10°C/min, se ve que la temperatura de trasformación tiene lugar en torno a 110°C. En la calorimetría de la pieza 2 obtenida en rampas de entre 40°C y 130°C, con temperatura constante de 10°C/min, se ve que la temperatura de trasformación tiene lugar en torno a 70°C. En la calorimetría de la pieza 3 obtenida en rampas de entre 40°C y 130°C, con temperatura constante de 10°C, se ve que la temperatura de transformación tiene lugar en torno a 85°C. Se puede observar que la temperatura de transformación martensítica en la pieza 2 y 3 después de los tratamientos térmicos se desplaza hacia temperaturas más bajas en comparación a la temperatura de transformación de la pieza 1 (STT). Para la pieza 2 el desplazamiento de la temperatura de trasformación fue más notorio, pues se desplazó 40°C a diferencia de la pieza 3 que se desplazó 25° tomando como referencia la temperatura de trasformación de la pieza 1 (STT). Estos resultados muestran que el tratamiento térmico afecta fuertemente la temperatura de transformación, además de modificar anchura y altura de los picos.

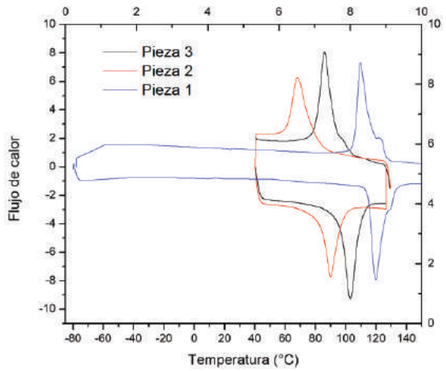


Figura 2. Termogramas obtenidos por DSC. En azul la pieza 1(STT), En rojo la pieza 2 (500ºc por 8h) y negro la pieza 3 (600ºC por 8h).

La tabla 1 muestra la composición química promedio de la aleación, resultados obtenidos por el microanálisis en microscopio electrónico de barrido. La fórmula original de la aleación es $Ni_{50}Mn_{34}In_{14}Cr_2$, podemos observar que la composición promedio del In en la pieza 1 cambia y hay considerable dispersión en los valores. Para la pieza 2 la dispersión en los valores de composición química es alta, como se ve en la desviación estándar, y que indica que la composición no es muy homogénea. Esto ocurre en menor medida para la pieza 3. Los resultados del microanálisis reflejan que las tres muestras no son homogéneas. Esta falta de homogeneidad nos indica que la aleación no se fundió correctamente durante su realización, en particular.

Tabla. 1. Microanálisis de la pieza 1 (STT), pieza 2 (500°C por 8h) y pieza 3 (600°C por 8h).

Elemento	Pieza 1	Pieza 2	Pieza 3
Ni	50.3±2.75	51.8±2.85	48.4±0.24
Mn	32.5±0.50	32.5±1.22	32.1±0.29
In	14.3±3.77	12.1±6.51	16.9±0.12
Cr	2.9±1.69	3.5±1.24	2.6±0.20

En la figura 3 se puede apreciar la microestrctura de la pieza 1 sin tratamiento térmico, donde se puede observar, los cristales individuales de martensita que aparecen largos y delgados como agujas(imagen C). La figura 4 son micrografías de la pieza 2 con tratamiento térmico 500ºC por 8h, donde se aprecian cristales de martensita (imagen C), la figura 5 muestra las micrografías de la pieza 3 con tratamiento térmico 600ºC por 8 h, donde también se aprecian los cristales de martensita (imagen C).

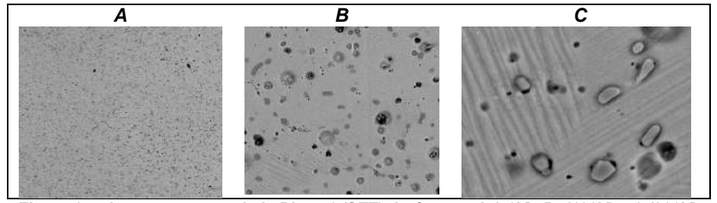


Figura 3: microestructuras de la Pieza 1 (STT). Imágenes A (50X), B (100X) y 3 (200X).

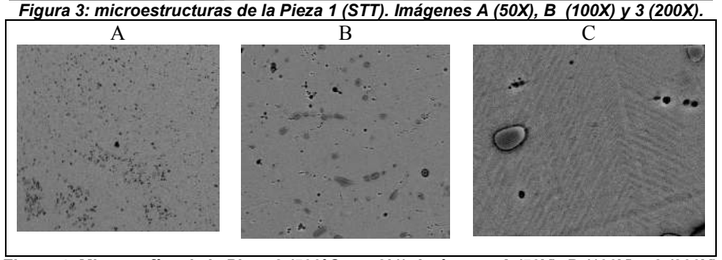


Figura 4: Micrografías de la Pieza 2 (500°C por 8h)). Imágenes A (50X), B (100X) y 3 (200X).

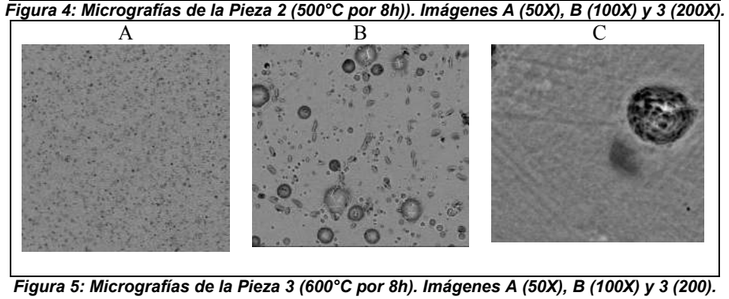


Figura 5: Micrografías de la Pieza 3 (600°C por 8h). Imágenes A (50X), B (100X) y 3 (200).

Las micrografías tomadas a las tres piezas revelan la presencia de precipitados y huecos (imágenes A), los cuales para poderlos apreciar mejor se tomaron imágenes B y C, las cuales revelan que estos pequeños puntos son poros y precipitados presentes en la aleación. La micrografía tomada a 100X de la pieza 2, muestra la presencia de poros con distinto contraste al igual para la muestra 3, en ambos casos se debe a que la aleación no presentaba homogeneidad. Se aprecia que la microestructura se reproduce en las tres piezas, en cuanto a poros y partículas, aunque para la pieza 2 y 3 los cristales de martensita se observan más localizados en la superficie analizada de la aleación. La presencia localizada de los cristales de martensita es el resultado del temple de las piezas con tratamiento térmico de altas temperaturas a bajas temperaturas. Lo que conlleva a la formación de tales cristales a nivel nano y no a nivel macro como en la pieza 1. La figura 6 muestra el difractograma de rayos X de la pieza 1 (STT), este se comparó con una carta cristalográfica en el programa Power cell. La similitud de los picos entre los dos difractogramas ayudó a obtener la posible estructura cristalina de la celda unitaria de la aleación.

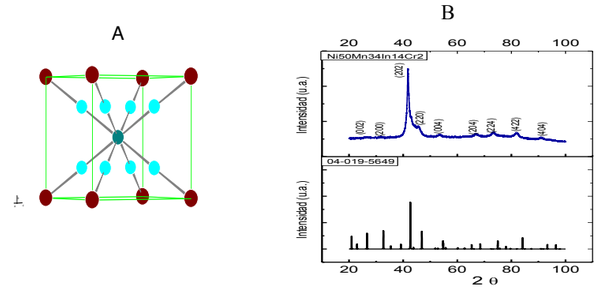


Figura 6: Imagen A muestra la posible estructura cristalina, forma tetragonal. Imagen B comparación de los difractogramas.

La figura 7 muestra las curvas de calorimetría obtenidas por DSC de las piezas 2 y 3 después de haber sido sometidas a 500°C por 26h y 600°C por 40h respectivamente. En ambos casos se observa que la temperatura de trasformación martensítica desapareció después de los tratamientos térmicos y sólo podemos apreciar en ambos gráficos la curva característica de la temperatura de Curie. Por lo que se puede decir que la influencia del tratamiento térmico sobre la transformación martensítica es muy alta y además con estos resultados podemos constatar que la temperatura de trasformación martnensítica puede ser modificada en un rango amplio de temperaturas mediante tratamientos térmicos.

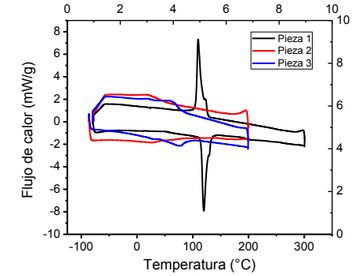


Figura 7. Termogramas de DSC., en negro para la pieza 1(STT), rojo para la pieza 2 (500ºc por 26h) y azul para la pieza 3 (600ºC por 8h).

Las figuras 8 y 9 muestran los difractogramas de rayos X de la pieza 2 (500°C por 26h) y la pieza 3 (600°C por 40h), tales difractogramas se compararon con cartas cristalográficas en el programa Power cell. Para ambos casos se obtuvo la posible estructura cristalina de la celda unitaria de la aleación.

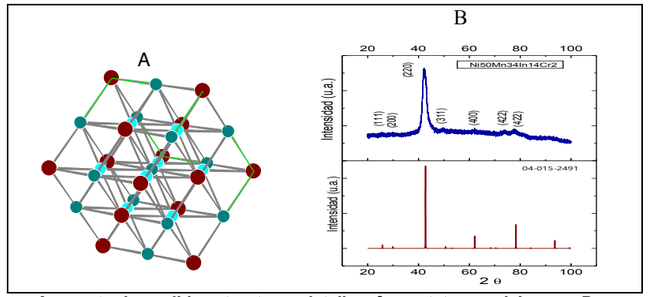


Figura 9: Imagen A muestra la posible estructura cristalina, forma tetragonal. Imagen B comparación de los difractogramas. Pieza a 600°C por 40 h

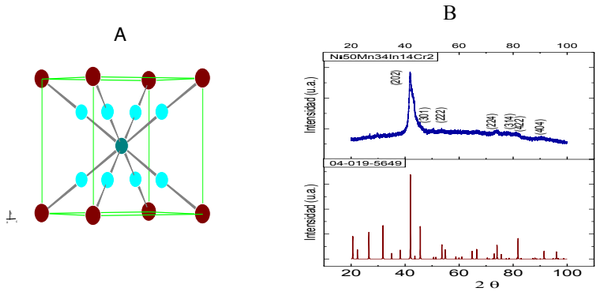


Figura 9: (A) la posible estructura cristalina tetragonal. (B) comparación de los difractogramas (a 600°C por 40 h)

Como lo muestran los resultados anteriores la aleación dejó de transformar por efecto de tratamientos térmicos. Esta ausencia de transformación martensítica en la aleación $Ni_{50}Mn_{34}In_{14}Cr_2$ nos da indicios del estado strain glass en la aleación, por lo que se puede decir que los tratamientos térmicos propician a la formación estado strain glass en un sistema ferroelastico/martensítico.

CONCLUSIONES

1. Se logró demostrar que los tratamientos térmicos tienen efecto sobre la transición martensítica, al grado de hacer desaparecer dicha transformación en el análisis DSC.
2. Los resultados arrojados por las curvas de calorimetría nos dan indicios del estado Strain-glass en la aleación.
3. Para la muestra que fue sometida a 500°C por 26h no se observa la transformación martensítica en la calorimetría, para corroborar el estado Strain-glass se necesita un Análisis Mecánico Dinámico (DMA).
4. Para la muestra que fue sometida a 600°C por 40h la transformación martensítica no se observa en el gráfico de calorimetría, para corroborar el estado Strain-glass se necesita un Análisis Mecánico Dinámico (DMA)
5. Para verificar la Temperatura de Curie se necesita realizar una magnetometría

BIBLIOGRAFIA

1. XIAOBING, R. (2012). “Strain Glass and Strain Glass Transition”, T. Kakeshita et al. (eds.), *Disorder and Strain-Induced Complexity in Functional Materials*, Springer Series in Materials Science 148, [pp. 201-204].
2. YUMEI, Z., y DEZHEN, X. et al.(2009). “High temperature strain glass in Ti50,,Pd50−xCrx… alloy and the associated shape memory effect and superelasticity”, American Institute of Physics, Applied Physics Letters 95, [pp 1-3]
3. SARKAR, S. et al. (2005). “Evidence for Strain Glass in the Ferroelastic-Martensitic System Ti50_xNi50_x” The American Physical Society, Physical Review Letters, [pp 1-4]
4. WANG, Y. et al. (2008). “Strain Glass: Glassy Martensite” en Materials Science Forum Vol. 583, [pp 67-84]
5. García, S. (2014). Influencia de los tratamientos de envejecimiento isotermo en las propiedades de la transformación martensítica en Aleaciones metamagnéticas Ni-Mn-In-co. Consulta en http://academica-e.unavarra.es/handle/2454/10963 (fecha de consulta 27-06-2016).

PELÍCULAS DE QUITOSANO/GLICERINA/POLIALCOHOL VINÍLICO PARA SU POTENCIAL APLICACIÓN EN LA REGENERACIÓN CELULAR: CONDICIONES DE PREPARACIÓN

Epitacio Herrera De Santiago[1] y Ma Elena Calixto-Olalde[2]

RESUMEN

En este proyecto se elaboraron películas a partir de disoluciones de quitosano a 1.25 % (m/v) en ácido acético a 1 % (v/v), empleando glicerina como plastificante en concentración de 8.4 % (v/v). Las variables fueron el tipo de agitación; magnética y mecánica, temperatura de secado: medio ambiente y 28° en incubadora. Otro elemento incorporado fue el polialcohol vinílico. Se caracterizaron con TGA la mejor película. Los resultados obtenidos muestran que la agitación mecánica a 1500 rpm permite reducir el tiempo de agitación y evita la segregación de la glicerina, la cual se presentaba a pesar de utilizar 9 horas de mezclado total cuando la agitación es magnética. En lo que respecta a la temperatura de secado, se encontró que el incremento de 28 a 35°C favorece la segregación de la glicerina. El análisis por TGA permite determinar que la incorporación de la glicerina presenta un abatimiento en la temperatura de máxima velocidad de descomposición. La incorporación del PVA favorece el secado y aumenta la flexibilidad de las películas.

ABSTRACT

In this project films from solutions of chitosan they were prepared at 1.25% (m / v) acetic acid to 1% (v / v) using glycerine as plasticizer concentration 8.4% (v / v). The variables were the type of agitation; magnetic and mechanical, drying temperature: environment and 28 ° in an incubator. Another element incorporated was the poly vinyl alcohol. TGA were characterized with the best film. The results show that the mechanical stirring at 1500 rpm reduces the stirring time and prevents segregation of glycerine, which appeared despite using 9 hours of total mixing when agitation is magnetic. With respect to the drying temperature, it was found to increase from 28 to 35 ° C favors the segregation of glycerine. TGA analysis to determine the incorporation of glycerin has a depression in the temperature of maximum rate of decomposition. The incorporation of PVA favors drying and increases the flexibility of the films.

Palabras Clave: Quitosano, glicerina, plastificante, poli alcohol vinílico

INTRODUCCIÓN

El quitosano (CHT) es un polímero natural que se obtiene a partir de la desacetilación química o enzimática de la quitina que forma parte de la estructura de soporte de numerosos organismos vivos, es un biopolímero lineal altamente insoluble en agua, tiene alto peso molecular y su estructura porosa favorece la elevada absorción de agua [1]. Los apósitos a base de CHT son una alternativa de solución de

[1] Universidad Autónoma de Coahuila, Facultad de Ciencias Biológicas; Conocido Coyote Coah., Sin nombre, C.P: 27450, Torreón, Coahuila, epichelito@gmail.com
[2] Instituto Tecnológico Superior De Irapuato, Departamento de Materiales; Carretera Irapuato-Silao km 12.5, El Copal, Nombre, C.P: 36821, Irapuato, Guanajuato, macalixto@itesi.edu.mx

gran interés, gracias a las propiedades únicas que presenta el QT, como la biodegradabilidad, no toxicidad, efecto antibacteriano y biocompatibilidad que al momento de su aplicación como apósitos permiten cubrir y proteger la herida manteniendo un nivel de humedad adecuado[2]. Además se puede moldear de diferentes formas, siendo una opción económica, accesible, y fácil de preparar. Sin embargo, la baja resistencia mecánica y el cambio de algunas características y/o propiedades, bajo condiciones húmedas, limitan su uso en la ingeniería de tejidos. Muchas de las propiedades de estas película dependen de varios parámetros tales como el peso molecular y grado de desacetilación, el ácido orgánico utilizado y la posible presencia de plastificante [3], que es una de las alternativas utilizadas para mejorar la flexibilidad y capacidad de procesamiento, disminuyendo la resistencia a la tensión, dureza, etc., debido a que genera cambios en el volumen libre que favorecen la movilidad de las cadenas poliméricas.

La capacidad del quitosano de formar películas o soportes ha permitido su aplicación dentro de los campos de ingeniería de tejidos y liberación de drogas, debido tanto a sus propiedades mecánicas como a su baja tasa de biodegradación [4]. Los soportes de quitosano pueden servir para mantener, reforzar y en algunos casos organizar la regeneración tisular; como matriz puede ser utilizada para liberar materiales bioactivos o influenciar directamente el crecimiento celular [5].

El glicerol o glicerina ha sido el plastificante más utilizado durante mucho tiempo para diferentes aplicaciones gracias a su buena eficiencia, gran disponibilidad, la baja exudación y por su poder humectante e hidratante ha sido utilizado para la preservación de injertos de piel, este plastificante en su información genética, además de sus propiedades antivirales y antibacterianas, posee grandes características que permiten la rápida y homogénea regeneración de piel sobre quemaduras superficiales [6].

El alcohol polivinílico (PVA) tiene muchas aplicaciones en diversas ramas de la ciencia. Sin embargo, en aplicaciones estructurales, debido a sus bajas propiedades mecánicas y la degradación térmica, su uso ha sido limitado. Sin embargo el PVA mezclado con quitosano mejora de manera significativa la flexibilidad de la película y con ello se mejora la manipulación de esta [7].

El objetivo de este trabajo fue la establecer las condiciones de preparación de películas de quitosano con glicerina como plastificante para su potencial aplicación en regeneración celular.

MÉTODOS Y MATERIALES

Reactivos

Los reactivos utilizados fueron poli alcohol vinílico (PVA) (Mw 89000-98000 g/mol y grado de hidrólisis de 99%,), quitosano (QT) (peso molecular bajo y grado de dasacetilación del 80%) y ácido acético grado reactivo, todos marca Sigma Aldrich. Glicerina grado comercial (GL)

Preparación de las películas

Para ello se disolvió 1.25 % (m/v) de quitosano en disoluciones de ácido acético al 1% (v/v) las disoluciones fueron agitadas magnéticamente 700 rpm y mecánicamente a 1500 rpm. El orden de adición de los reactivos fue disolver el quitosano en la solución de ácido acético. Utilizando agitación magnética se dejó la solución de quitosano 2, 3 y 6 h de agitación después de cada tiempo se realizó la adición de la glicerina y se dejó en agitación la mezcla 2 y 3 horas. Posterior a este tiempo las películas fueron vaciadas en cajas Petri. En cuanto a la temperatura de secado se utilizaron 35, 28 y30°C en una

incubadora durante 24 horas y después de éste tiempo se mantuvieron 15 días más a temperatura ambiente.

Análisis Termogravimétrico

Se realizó en un equipo TA Instruments Modelo 20 en un intervalo de 25-700 °C, velocidad de calentamiento de 10°C/min, y un flujo de N_2 de 20 mL/min.

RESULTADOS

Las diferentes condiciones de preparación de las películas tuvieron efecto en la segregación de la glicerina. Una de las primeras variables evaluadas fue el tiempo de mezclado el cual en un inicio se realizaron modificaciones considerando lo reportado por Srinivasa y colaboradores [3], ellos proponían una combinación de 6 h de agitación de la solución de quitosano y 3 horas posterior a la incorporación de quitosano además de ésta se propusó 2 h de agitación de la solución de quitosano y 2 horas posterior a la agitación y una más de 3 y 3 respectivamente. Lo que se obtuvo bajo estas condiciones fue la segregación de la glicerina, como se muestra en la Figura 1, lo cual se muestra como pequeñas gotitas sobre la superficie de la película. El mismo comportamiento se presentó para la combinación de mezclado de 6 X 3 y de 2X2.

El proceso de segregación fue en mayor proporción cuando la temperatura de secado para 35 y 30°C, determinándose que a 28° era la temperatura más adecuada de secado.

La evaluación del tipo de agitación de forma mecánica a 1500 rpm demostró que se reduce el tiempo de preparación de las películas y no se presenta segregación Figura 2

Fig. 1A- Película de QT con agitación magnética de 700 rpm y tiempo de agitación de 2 X 2.

Fig. 2 Película de QT con agitación mecánica 1500 rpm y 30 minutos de agitación de la solución de QT y 30 minutos la mezcla con GL.

Otra de las variables que resultó ser muy importante considerar fue la temperatura de secado ya que un incremento de dos grados puede favorecer la segregación de la glicerina a pesar de que se utilice agitación mecánica. Esto permitió determinar que la temperatura más adecuada era de 28 °C, la cual permitía obtener películas homogéneas(Fotos no mostradas

La combinación de agitación mecánica a 1500 rpm y a una temperatura de secado permitía obtener películas más flexibles sin embargo aún frágiles. Por lo anterior se decidió evaluar la incorporación de

PVA en un 1% lo que dio como resultado la obtención de películas flexibles y disminuyó su fragilidad como se muestra en Figura 2. Después de 15 días de secado a temperatura ambiente la película incremento su flexibilidad y elasticidad por lo cual ya al doblarla la película no se fractura.

Fig. 4A.- Película de QT 1.25% con 8.4%glicerina y PVA 1%

Figura 4B. Película de QT 1.25% con 8.4%glicerina y PVA 1% doblada

Los resultados por TGA de la película que ya no presentó segregación pero sin PVA permite concluir que se tiene un buen mezclado al disminuir la temparatura de máxima velocidad de descomposición originada por la incorporación de la glicerina respecto al QT puro, como se indica en la Tabla 1.

Tabla 1. Temperatura de máxima velocidad de descomposición para las películas QT y QT/GL obtenidas a 1500 rpm, una hora de agitación 30X30, y temperatura de secado de 28°C.

Parámetro	*Quitosano puro*	*Quitosano y glicerina*
Temperatura de máxima velocidad de descomposición (°C)	*276.89 °C*	*248.47 °C*

CONCLUSIONES

La evaluación de las diferentes variables permitió establecer que el tiempo de preparación de las películas puede ser reducido de 9 a 1 hora si se utiliza agitación mecánica a 1500 rpm.

La temperatura de secado es una variable fundamental ya que aun cuando se tenga un buen mezclado la segregación de la glicerina puede presentarte a temperaturas mayores de 28°C.

El PVA disminuye el tiempo de secado e incrementa la elasticidad de la película, lo cual refuerza el efecto de la glicerina y disminuye la fragilidad de la película favoreciendo su fácil manipulación

Por lo cual las condiciones más adecuadas para la obtención de películas QT/PVA/GL fue utilizando agitación mecánica de 1500 rpm durante 30 minutos para la disolución del QT y después de la incorporación de la GL 30 minutos de agitación más para un total de una hora y a una temperatura de secado de 28°Cdurante 24 horas y posterior a esto a temperatura ambiente.

Es importante señalar que los resultados obtenidos en este trabajo darán la pauta para proponer un material con propiedades antimicrobianas y que favorezcan la regeneración celular, además de completar su caracterización lo cual quedó fuera del alcance de este proyecto.

BIBLIOGRAFÍA

1. Piquero J., (2010). Preparación y caracterización de hidrogeles de quiosano para soporte de células de cartílago, Universidad de Zaragoza.

2. Ishihara M, K. Ono, M. Sato, K. Nakanishi, Y. Saito, H. Yura, T. Matsui, H. Hattori, M. Fujita, M. Kukuchi, A. Kurita. (2001). Acceleration of wound contraction ande healing with a Photocrosslinkable chitosan hidrogel. Wound Rep Reg 9, 513-521.

3. Srinivasaa, P.C, Rameshb, M.N, Tharanathan, R.N. (2007). Effect of plasticizers and fatty acids on mechanical and permeability characteristics of chitosan films. Food Hydrocolloids 21 1113-1122.

4. Rojas O, Moya M, Sibaja M, Ruepert C, Vega-Baudrit JR, (2004). Rev. Iberoamer. Polím., 5(3), 133.

5. Abram, (2004). AP “Quitina y Quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones”, Pontificia Universidad Católica del Perú, Fondo Editorial.

6. Khoo, T.L., Halim, A.S., Mat Saad, A.Z., Dorai A.A. (2010). The application of glycerol-preserved skin allograft in the treatment of burn injuries: An analysis based on indications. Published by Elsevier Ltd and ISBI. burns 36 897–904.

7. Aleksey G., Rozhin, (2005). “Anisotropic saturable absorption of single-wall carbon nanotubes aligned in polyvinyl alcohol”, Chemical Physics Letters, Vol. 405, 288-293.

8. Suárez L. F., Talante J., Mina J. H. y Peñaranda J. (2013). Desarrollo de Apósitos de Quitosano para su posible Aplicación en la regeneración del Tejido Epithelial: Caracterización Mecánica. Revista Colombiana de Materiales N 5, pp 56-63. Edición Epecial Artículos Cortos.

AUTOMATIZACIÓN DE LA TOMA DE IMÁGENES CON MATLAB PARA LA MEDICIÓN DEL POTENCIAL HÍDRICO EN SUELO ORGÁNICO E INORGÁNICO POR TERMOGRAFÍA INFRAROJA

Karla Natalia Herrera Guzmán[1] y Carlos Villaseñor Mora[2]

RESUMEN

La termografía infrarroja requiere la toma periódica de imágenes y analizarlas, y aunque la mayoría del software disponible para las cámaras infrarrojas ya cuenta con las correcciones necesarias para trabajar con las imágenes que producen, la toma periódica de imágenes sigue siendo un proceso que puede complicarse y requerir de mucho tiempo. Es por esto que la automatización de la toma de imágenes resulta de gran ayuda en este tipo de estudios.

INTRODUCCIÓN

Proyectos anteriores relacionados con la toma de fotografías termográficas en la DCI han mostrado que las imágenes adquiridas pueden ser difíciles de analizar si no se toman con en el momento correcto y posición precisa, por lo que la automatización de este proceso llega a ser casi indispensable. En este proyecto además de la automatización se incluye una iluminación artificial que puede habilitarse para tomar imágenes con y sin ella.

Palabras Clave: Termografía, Imágenes, MATLAB.

MÉTODOS Y MATERIALES

El principal programa utilizado en la realización de este proyecto fue MATLAB, esto debido a su capacidad de establecer comunicación con una gran cantidad de productos en el mercado (tales como dispositivos electrónicos y software), incluyendo un paquete para trabajar con Arduino y otro para trabajar con una cámara conectada a la computadora, los cuales utilizamos para este proyecto. Con estos paquetes es posible controlar el Arduino y la cámara desde la barra de comandos de MATLAB, esto nos permitió realizar un programa con una interfaz gráfica que realiza las operaciones necesarias para esta adquisición de imágenes.

RESULTADOS

Fuimos capaces de aprender a utilizar MATLAB y sus paquetes de Arduino y de cámaras, gracias a eso logramos realizar un programa con interfaz gráfica a través de la cual se controla la cámara y el Arduino. Primero se realizaron pruebas con la cámara web de la computadora, cuyos resultados se muestran en la figura 1.

[1]Universidad de Guanajuato, Ingeniería Física; Loma del Bosque 103, Lomas del Campestre, C.P: 37150, León, Gto, herreragk2012@licifug.ugto.mx
[2]Universidad de Guanajuato, DCI, Departamento Ingenierías Química, Electrónica y Biomédica; Loma del Bosque 103, Lomas del Campestre, C.P: 37150, León, Gto, vimcarlos@fisica.ugto.mx

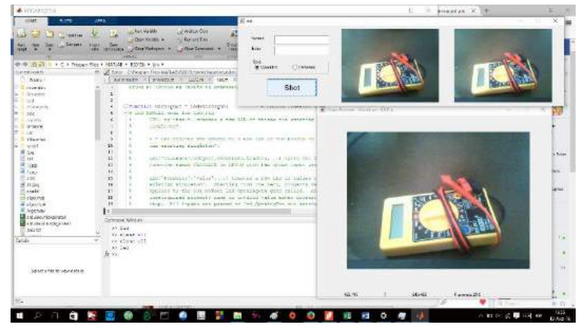


Figura 1. Captura de pantalla de la prueba con la cámara web. La imagen de abajo es una pre-visualización en tiempo real de la cámara. La imagen pequeña de la izquierda muestra la primera imagen tomada con la cámara mientras que la imagen de la derecha muestra la última imagen tomada con la cámara

Posteriormente se realizaron pruebas con la cámara infrarroja, observando que funcionaba de la manera deseada (Figura 2), en las figuras 3 y 4 se muestran algunas fotos tomadas con el programa de automatización.

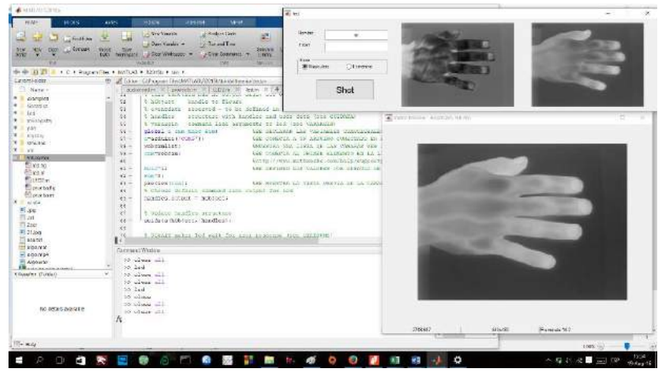


Figura 2. Captura de pantalla del programa con la cámara infrarroja. Las imágenes mostradas son de una mano previamente sumergida en agua helada. Se puede observar el proceso de recuperación.

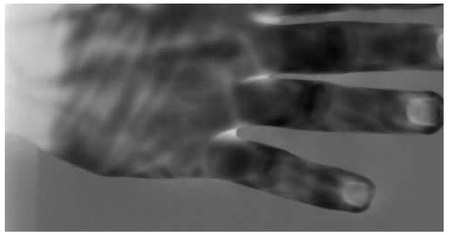


Figura 3. Primera foto tomada por la cámara infrarroja, mano recién sumergida.

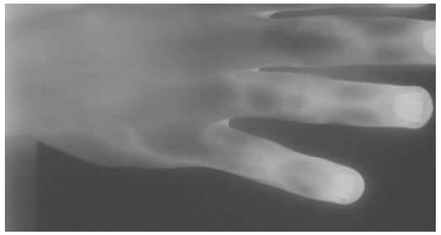


Figura 4. Última foto tomada por la cámara infrarroja, mano después de 3 minutos.

Después de haber obtenido imágenes con la cámara infrarroja el programa fue modificado para cumplir propósitos más específicos, la automatización de toma de imágenes de cualquier cámara conectada a la computadora para tomar una foto con iluminación, desactivar la iluminación y tomar una segunda foto. Los resultados se muestran en las Figuras 5, 6 y 7.

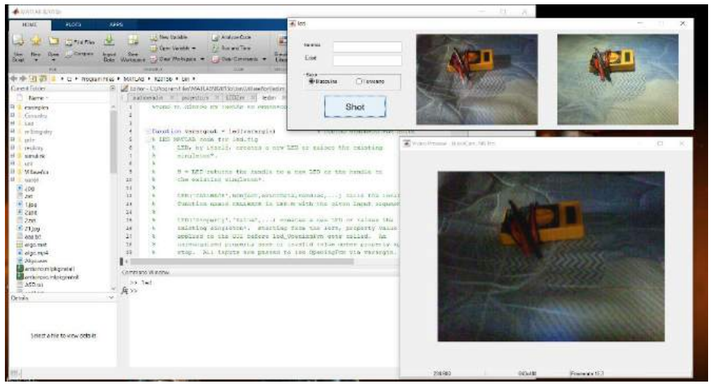


Figura 5. Captura de pantalla del programa que enciende y apaga luz artificial

Figura 6. Foto tomada con la iluminación artificial

Figura 7. Foto tomada sin la iluminación artificial

CONCLUSIONES

La utilización de microcontroladores ayuda en la automatización de una gran cantidad de tareas, lo que reduce el tiempo que se necesita dedicarle al proceso, por lo que la utilización del método de automatización de la toma de imágenes junto con un microcontrolador hace que esto se pueda aplicar a todas las técnicas que requieran la toma de fotografías.

BIBLIOGRAFIA

"Arduino Support from MATLAB" en MathWorks. Consultada en http://www.mathworks.com/hardware-support/arduino-matlab.html (fecha de consulta 25-06-2016).

"Acquire Images from Webcams" en MathWorks. Consultada en http://www.mathworks.com/help/supportpkg/usbwebcams/ug/acquire-images-from-webcams.html (fecha de consulta 30-06-2016).

USO DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS PARA SERS PARA DIAGNÓSTICO TEMPRANO, NO INVASIVO DE AFECCIONES EN HUMANOS

Martha Mariana Herrera Hernández[1] y Hugo Ricardo Navarro Contreras[2]

RESUMEN

El ácido siálico (SA, Neu5Ac), es un importante marcador fisiopatológico y es característico encontrarlo en elevadas concentraciones en saliva de personas con cáncer de mamá. Debido a esto, la medición de SA, se plantea como una forma de diagnóstico temprano, eficaz y no invasivo de la neoplasia mamaria. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) es un fenómeno que realza la emisión Raman, procedente de un analito que se adsorbe o se encuentra en la proximidad cercana a una superficie metálica rugosa. En este trabajo se demuestra, que el uso de la técnica SERS, proporciona la alta sensibilidad, la selectividad y especificidad de detección de SA (analito), lo que lo convierte en un método viable de diagnóstico.

ABSTRACT

The Sialic Acid (SA), is an important pathophysiological marker and is typical to find it in high concentrations in saliva of persons with breast cancer. Due to this, SA's measurement, it appears as a form of early, effective and not invasive diagnosis of the mammary neoplasia. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) is a phenomenon that heightens the emission Raman, proceeding from an analito that is adsorbed or be located in the proximity near to a metallic rugose surface. In this work is demonstrated, that the use of the technique SERS, provides the high sensibility, the selectivity and specificity of SA's detection, what turns it into a viable method of diagnosis.

Palabras Clave: Nanopartículas de plata, SERS, Ácido Siálico.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es el más común entre las mujeres en todo el mundo, pues representa el 16% de todos los cánceres femeninos. Se estima que en 2004 murieron 519 000 mujeres por cáncer de mama. Las bajas tasas de supervivencia observadas en países poco desarrollados pueden explicarse principalmente por la falta de programas de detección precoz, que hace que un alto porcentaje de mujeres acudan al médico con la enfermedad ya muy avanzada. Así pues, la detección precoz con vistas a mejorar el pronóstico y la supervivencia de esos casos sigue siendo la piedra angular del control del cáncer de mama (OMS, 2004). En la búsqueda de métodos eficaces, sencillos y no invasivos, para la detección temprana de cáncer de mama, ha generado gran interés, la medición de ácido siálico en líquidos corporales por métodos altamente sensibles, como la técnica espectroscópica Surface-enhanced Raman Scattering (SERS), lo cual se estudia para su aplicación diagnóstica.

El término Ácido Siálico (SA, por su nombre en inglés) es el nombre genérico para los derivados *N*- u *O*-sustituidos del ácido neuramínico, un monosacárido de nueve carbonos. El N- ácido acetilneuramínico (Neu5Ac) es la forma predominante de SA y casi la única forma encontrada en seres humanos. Un grupo n-acetil y el grupo carboxilo confiere una carga negativa sobre la molécula bajo condiciones fisiológicas. La concentración de SA en fluidos corporales puede reflejar el estado metabólico y se ha reconocido como un marcador biológico para una variedad de procesos fisiopatológicos. Elevados niveles de SA han demostrado ser un rasgo característico en saliva de pacientes con cáncer de mama, y por lo tanto, se ha

[1] Universidad Autónoma de Aguascalientes, Depto. de Apoyo a la Investigación; Av. Universidad No. 940, Ciudad Universitaria, C.P: 20131, Aguascalientes, Ags., mariana3328@hotmail.com
[2] Coordinación para la Innovación y Aplicación de la Ciencia y la Tecnología, Av. Sierra Leona #550, Col. Lomas 2ª, C.P. 78210, San Luis Potosí, SLP., hnavarro@uaslp.mx.

sugerido como un marcador predictivo, no invasivo, para los pacientes con este tipo de cáncer. Actualmente los métodos disponibles de detección específica y cuantificación son complicados, costosos y laboriosos, mientras que las técnicas más sólidas sufren de la no especificidad e interferencia (Vinogradova E., *et al*, 2014), de tal manera que se plantea SERS como una mejor técnica de análisis.

SERS es una de las más poderosas técnicas espectroscópicas y ha sido utilizado en áreas como la química, ciencia de los materiales y ciencias biológicas (Liu J., *et al*, 2016). Tiene un gran potencial como una sonda analítica molecularmente específica, para la detección de la débil señal Raman de analitos en concentraciones bajas o con una baja dispersión Raman (Vinogradova E., *et al*, 2014).

Denominada en español, espectroscopia de Raman amplificada por superficie, SERS ocurre cuando un analito es adsorbido o se encuentra en la proximidad cercana a una superficie metálica rugosa (principalmente el oro o la plata) en un proceso que realza enormemente la emisión Raman. Suspensiones coloidales metálicas de tamaño nano son los substratos SERS más comunes debido a su facilidad de preparación, larga vida útil y alto factor de intensificación (EF) de la señal Raman que puede ser excitada desde el ultravioleta (UV) a la región espectral infrarroja (Uskoković S., 2016). Las nanopartículas de los metales nobles al ser excitadas directamente con radiación electromagnética producen *plasmones localizados resonantes de superficie* (LSPR). Comparados con las estructuras cuánticas (moléculas), las nanoestructuras metálicas tienen una capacidad o sección eficaz de absorción y dispersión que puede ser varios órdenes de magnitud superiores a las secciones eficaces normales de las moléculas. En forma simple, puede decirse que la amplificación en SERS es la re-radiación (dispersión elástica) por el metal de la dispersión Raman molecular. (Aroca, F., 2014).

La mayor amplificación se obtiene en agregados de nanopartículas, en la intersección de dos o más nanoestructuras y bifurcaciones, construidas sobre el sustrato SERS (Cheng L., *et al*, 2014). Solo un número muy limitado de metales tienen las propiedades ópticas adecuadas (función dieléctrica) para sostener plasmones localizados de superficies en nanoestructuras, en la región del espectro electromagnético en que se llevan a cabo los experimentos Raman. El oro y la plata son los más notables con estas características. La amplificación de la dispersión molecular y de la fluorescencia molecular son máximas cuando las frecuencias moleculares se acoplan con nanoestructuras cuya resonancia del plasmón coincide con las frecuencias moleculares de emisión o dispersión. Oro y plata, son radiativos y tienen una sección eficaz de dispersión varios órdenes de magnitud mayores que las moléculas. (Aroca, F., 2014).

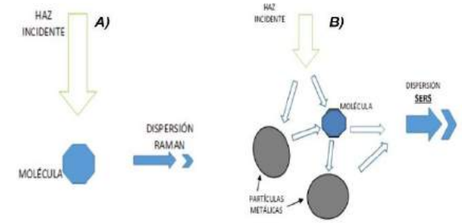


Figura 1. A) Proceso de dispersión de Raman en ausencia de partículas metálicas. B) Proceso de dispersión de Raman en presencia de partículas metálicas.

En este trabajo, se pretende demostrar la viabilidad de la aplicación de la técnica SERS, con sustrato coloidal de nanopartículas de plata, en un método de detección temprano de cáncer de mama, estableciendo las condiciones para una curva de calibración de SA. Dicha curva se asentara en un sistema que permita medir la concentración de SA presente en saliva y relacionarla con indicios de un padecimiento. Debido a la importancia de la topografía del sustrato coloidal en un buen mejoramiento

SERS, se obtienen espectros utilizando nanopartículas con diferente morfología, al fin de conseguir la mayor amplificación de la señal Raman.

METODOLOGÍA

Síntesis de nanopartículas esféricas de plata (AgNPs) por el método de Turkevich. La solución coloidal de AgNPs fue preparada por reducción de Ag^+ con citrato trisódico ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$). A 10 mL de una solución de nitrato de plata ($AgNO_3$) 2.5 mM en agua desionizada (ADI), que es calentada a 95ºC y con agitación creciente, durante un tiempo aproximado de 45 min, se le añadieron 10 mL de una solución de citrato trisódico 2.5 mM. Alrededor de 25 min después de la adición del citrato, se obtuvo la solución final, color gris-lechoso, indicativo de la formación de nanopartículas de plata. Una vez a temperatura ambiente, las AgNPs se lavaron en cuatro ciclos de centrifugación (6000 rpm por 3 min.) - redispersión en ADI.

Síntesis de nanoestrellas de plata (AgNSs). Se prepararon dos soluciones coloidales de NSs, variando la concentración de soluciones acuosas de $AgNO_3$ y de ácido ascórbico (L-AA). A temperatura ambiente, se colocaron 7.5 mL de $AgNO_3$ 0.7 mM en agitación (con barra magnética) de aprox. 200 rpm, e inmediatamente se adicionaron 2.5 mL de L-AA 100mM. Después de 10 min de agitación, se obtuvo una solución, ligeramente gris, de AgNSs. En seguida, se realizó el lavado del producto, con tres ciclos de centrifugación (6000 rpm por 3 min.) - redispersión en ADI y un ciclo intermedio con etanol. Se repitió el procedimiento anterior, para la síntesis y lavado de la segunda solución de AgNSs, a partir de $AgNO_3$ 0.25mM y L-AA 0.5mM.

Caracterización. Se colocaron 20 µL solución de AgNPs 2.5 mM, AgNSs 0.7 mM y AgNSs 0.25 mM, cada una sobre una placa de silicio, para su observación por microscopia electrónica de barrido SEM (en inglés, Scanning Electron Microscope) en INSPECT F50-scanning electron microscopy.

Medición SERS. Se prepararon soluciones de ácido N- acetilneuramínico (Neu5Ac) en agua desionizada, en concentraciones 20, 100 y 200 mg/dL. Mezclas 2:1 de los tres tipos de partículas de plata, con cada una de las concentraciones de Neu5Ac, se depositaron en sustrato de aluminio. Además, se hicieron 3 depósitos, de cada tipo de coloide de plata en ADI (sin Neu5Ac). Se obtuvieron 12 espectros SERS en el micro RAMAN HORIBA con software LabSpec y dos líneas de excitación, láser verde (532 nm), objetivo x10, rango de 400 a 1800 cm^{-1}, tiempo de exposición de 40 segundos, 4 acumulaciones, 1800 gr/mm, abertura de 100µm, enfocado sobre la superficie del líquido. La fluorescencia se substrajo con el programa OriginLab.

RESULTADOS

Las imágenes obtenidas por Scanning Electron Microscopy (SEM), de las Nanopartículas de plata, por reducción con citrato (Cit-AgNPs), y los 2 tipos de Nanoestrellas de plata, por reducción con ácido ascórbico (AA-AgNSs), se observan en la figura 2. En base a las mediciones en SEM, el diámetro promedio para las Cit-AgNPs fue de 30.38 nm. Dichas nanopartículas se encontraron fuertemente aglomeradas, formando cúmulos al momento de secarse sobre el sustrato de silicio, aparentemente rodeados por una cubierta de citrato, dentro de los cuales, se distinguen las estructuras cuasi esféricas de las partículas de plata. Las nanoestrellas de plata sintetizadas a partir de $AgNO_3$ 0.25mM y L-AA 0.5mM (AA-AgNSs 0.25mM) no se mostraron aglomeradas y presentaron un diámetro de 298.25nm. Exhibieron semi desarrollo de picos, así como una capa traslúcida de L-AA. Finalmente, las nanoestrellas de plata sintetizadas con $AgNO_3$ 0.7mM y L-AA 100mM (AA-AgNSs 0.7mM), presentaron cubierta de L-AA y abundante crecimiento de picos, con lo que se observa claramente la morfología que evoca a una estrella.

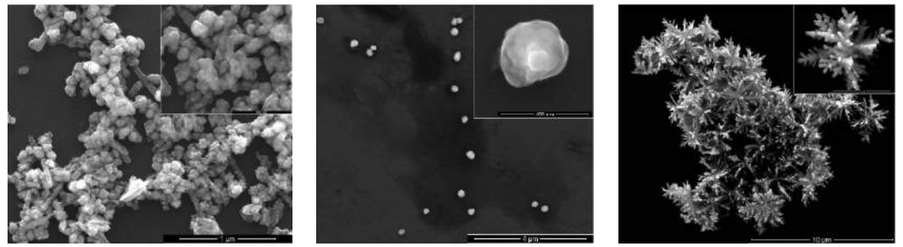


Figura 2. Imágenes SEM: A) Vista panorámica de Cit-AgNPs 2.5mM, diámetro promedio 30.38nm; a) acercamiento a las nanopartículas aglomeradas, con cubierta de citrato, donde se distingue su forma cuasi esférica, B) Vista panorámica de AA-AgNSs 0.25mM, diámetro promedio 298.25nm; b) Nanoestrella individual, se aprecia el semi crecimiento de picos y su cubierta de L-AA, C) Vista panorámica de AA-AgNSs 0.7mM; c) Acercamiento a una nanoestrella, donde se observa el abundante crecimiento de picos y su cubierta de L-AA.

En la figura 3, se muestran los espectros SERS, medidos en sustrato de Cit-AgNPs, en presencia de diferentes concentraciones de Neu5Ac. La comparación de los espectros, arrojó bandas de intensidad representativas localizadas en 976, 1347 y 1598 cm^{-1}. Es notable, el realce en la intensidad de estos picos, en los espectros tomados a mayores concentraciones de Neu5Ac, lo que se demuestra con el ajuste lineal de los mismos (Figura 4). Dado de que el primer espectro (Fig. 3.A), es solo una referencia para observar el comportamiento en cada sistema, el ajuste de las bandas seleccionadas, se realizó en base a los medidos en presencia de Neu5Ac. En las líneas resultantes, se aprecia claramente la tendencia de aumento de la intensidad, en dirección al aumento de la cantidad de Neu5Ac.

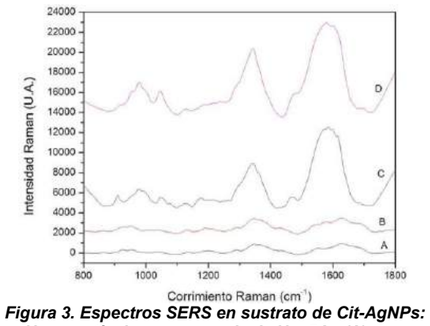


Figura 3. Espectros SERS en sustrato de Cit-AgNPs: Nanopartículas en ausencia de Neu5Ac (A), con Neu5Ac 20 (B), 100 (C) y 200mg/dL (D).

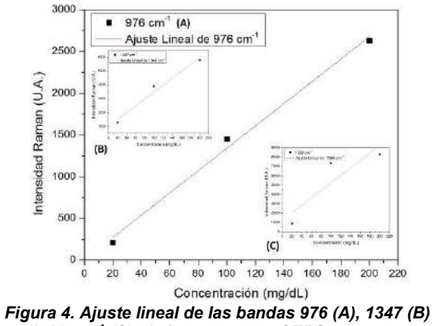


Figura 4. Ajuste lineal de las bandas 976 (A), 1347 (B) y 1598 cm^{-1} (C), de los espectros SERS en sustrato Cit-AgNPs, en presencia de Neu5Ac a diferentes concentraciones.

En los espectros SERS en sustrato AA-AgNSs 0.25mM, presentados en la figura 5, se observó que picos característicos localizados en 1212, 1323 y 1549 cm^{-1}, tienen una intensidad mayor, conforme el análisis se corre ante mayor cantidad de Neu5Ac. De igual manera que en el caso de las Cit-AgNPs, se hizo un ajuste lineal, de cada una las 3 bandas características, las resultantes también muestran, que existe una tendencia a aumentar su intensidad, en relación con el incremento de Neu5Ac (Figura 6). Sin embargo, las intensidades Raman de las bandas en estos espectros, son significativamente menores, a las alcanzadas con Cit-AgNPs.

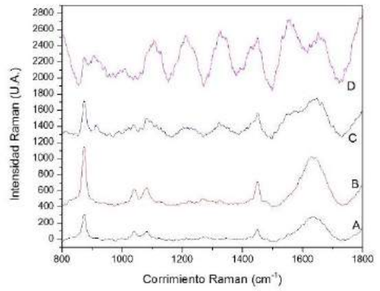


Figura 5. Espectros SERS en sustrato de AA-AgNSs 0.25mM: Nanoestrellas en ausencia de Neu5Ac (A), con Neu5Ac 20 (B), 100 (C) y 200 mg/dL (D).

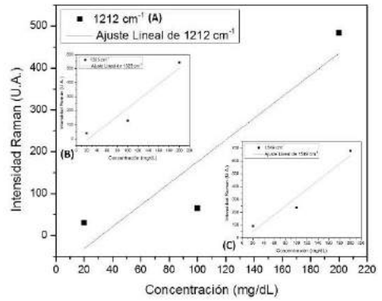


Figura 6. Ajuste lineal de las bandas 1212 (A), 1323 (B) y 1549 cm^{-1} (C), de los espectros SERS en sustrato AA-AgNSs 0.25mM, en presencia de Neu5Ac a diferentes concentraciones.

La utilización de diferente tipo de nanoestrellas, AA-AgNSs 0.7mM, generó los espectros SERS mostrados en la figura 7, a partir de los cuales, se encontraron picos característicos ubicados en 873 y 1448 cm^{-1}. Los espectros en general muestran algunas bandas que incrementan su intensidad, por aumento del Neu5Ac, de manera similar a lo ocurrido con las Cit-AgNPs y AA-NSs 0.25mM, tal es el caso de la banda en 1448 cm^{-1} que muestra dicha tendencia (Figura 8.B). Pero además, se detectó un comportamiento opuesto, particular de la banda en 873 cm^{-1}, es decir, la existencia de grandes concentraciones de Neu5Ac, disminuyen la intensidad de este pico del espectro. Lo último se ve reflejado, en la línea de tendencia con pendiente negativa mostrada en la figura 8.A.

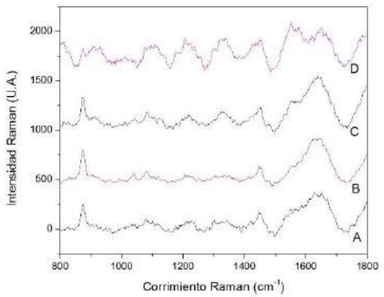


Figura 7. Espectros SERS en sustrato de AA-AgNSs 0.7mM: Nanoestrellas en ausencia de Neu5Ac (A), con Neu5Ac 20 (B), 100 (C) y 200mg/dL (D).

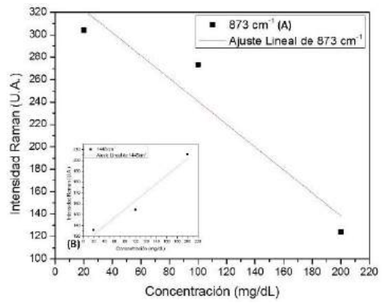


Figura 8. Ajuste lineal de las bandas 873 (A), y 1448 cm^{-1} (B), de los espectros SERS en sustrato AA-AgNSs 0.7mM, en presencia de Neu5Ac a diferentes concentraciones.

Es de gran interés recalcar que, las mayores intensidades de la señal Raman, se percibieron en las mediciones SERS con Cit-AgNPs, ya que, por el contrario, se esperaba un mejor realce con el uso de partículas con diferente topografía superficial. En literatura, basada en la experimentación con nanopartículas (sintetizadas a partir metodologías afines a las de este proyecto), ya se ha comprobado copiosamente, que la mayor amplificación de la emisión Raman, *se obtiene en agregados de nanopartículas, en la intersección de dos o más nanoestructuras y bifurcaciones, construidas sobre el sustrato SERS, ya que se puede producir un efecto de acoplamiento plasmónico que, conduce a plasmones localizados resonantes de superficie (LSPR),* (Cheng L., *et al*, 2014). Sin embargo, el realce

Raman no solo depende de las características de la partícula metálica, sino más bien, del sistema coloidal completo: cubierta-nanopartícula- molécula orgánica en estudio. Los resultados parecen indicar, que la molécula orgánica ensayada, Neu5Ac, no favorece el efecto SERS en sustrato de AA-AgNSs, comportamiento demostrado significativamente por el decremento de la intensidad de la banda 873cm^{-1}, del espectro SERS en AA-AgNSs 0.7mM, siendo contraproducente y por tanto, poco conveniente, para la detección altamente sensible que se desea conseguir. Por otra parte, *el campo dispersado por la partícula metálica resulta ser muchísimo más grande cuando la frecuencia incidente, se hace coincidir con la frecuencia de resonancia de los plasmones superficiales del metal,* (García J., 2004), entonces, también se debe señalar, la importancia de la frecuencia de la radiación que se incide en el sistema, durante la espectroscopia. Debido a que la energía de resonancia de los pasmones de superficie, se ve desplazada, comúnmente hacia la región infrarroja, por el cambio en la morfología de la nanopartícula, habrá que estudiarse el uso de una fuente de luz distinta, para el análisis de Neu5Ac en sustrato AA-AgNSs.

CONCLUSIONES

- Se observó que las Nanopartículas esféricas de plata cubiertas con citrato (Cit-AgNPs), son las más convenientes para intensificación de la dispersión Raman, en la medición SERS de N - ácido acetilneuramínico (Neu5Ac).
- Se comprobó que la técnica espectroscópica SERS, es un método viable para la detección temprana, no invasiva, altamente sensible y especifica de Neu5Ac.
- El uso de nanoestrellas de plata cubiertas con ácido ascórbico (AA-AgNSs) no es conveniente como sustrato SERS, en las condiciones aplicadas en este trabajo, para la medición de Neu5Ac.
- Queda abierto el estudio, de la técnica espectroscópica en sustrato de AA-AgNSs, para la medición de Neu5Ac, utilizando una fuente de radiación de la región infrarroja.

BIBLIOGRAFIA

AROCA, F., CAMPOS, M., y GARCÍA, J. (2014). *Amplificación plasmónica de espectros Raman y de fluorescencia: SERS y SEF sobre nanoestructuras metálicas*. España: Editorial CSIC Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

CHENG, L., MA, C., YANG, G., YOU, H. and FANG, J. (2014). "Hierarchical silver mesoparticles with tunable Surface topographies for highly sensitive Surface enhanced Raman spectroscopy" en *Journal of Materials Chemistry A*, Núm. 13, Vol. II, Enero – Diciembre, [pp. 4459-4828].

GARCÍA, J. (2014). *Las moléculas: cuando la luz te ayuda a vibrar*. España: Editorial CSIC Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

GARCÍA J. (2004). "Mecanismo Electromagnético del efecto SERS" en *Óptica pura y aplicada,* Núm. 2, Vol. 37, Enero – Diciembre, [pp. 17-22].

LIU, J., ZHOU, J., TANG, B., ZENG, T., LI, Y., LI, J. YE, Y. y WANG X. (2016). "Surface enhanced Raman scattering (SERS) fabrics for trace analysis" en *Applied Surface Science*, Vol. 386, pp. 296–302. Consultada en http://www.sciencedirect.com.dibpxy.uaa.mx/science/article/pii/S0169433216311801?np=y (fecha de consulta 26-06-2016).

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. (2004). "Cáncer de mama: Prevención y control". Consultado en http://www.who.int/topics/cancer/breastcancer/es/ (fecha de consulta 28-06-2016)

USKOKOVIĆ, S., KUNTIĆ, V., BAJUK, D. y HOLCLAJTNER, I. (2016). "Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Biochemical Applications" en *ELSEVIER*. Consultada en http://www.sciencedirect.com.dibpxy.uaa.mx/science/article/pii/B9780124095472121638?np=y (fecha de consulta 26-06-2016)

VINOGRADOVA, E., TLAHUICE, A., VELAZQUEZ, J., LARIOS, E. and YACAMAN, M. (2014). "Surface-enhanced Raman scattering of Nacetylneuraminic acid on silver nanoparticle Surface" en *Journal of Raman Spectroscopy*, Núm. 45, Enero – Diciembre, [pp. 730–735].

ALTERACIONES EN EL MICROCIRCUITO DEL ESTRIADO EN UN MODELO DE AUTISMO EN LA RATA

Said López de Olmos Sánchez[1] y Osvaldo Ibañez Sandoval[2]

RESUMEN

Estudios recientes mostraron, que en un modelo de autismo en la rata mediante la exposición de ácido valproico en los animales a los 12.5 días de gestación, disminuye significativamente el número de interneuronas colinérgicas (InCs) en el estriado. Estas interneuronas participan tanto en procesos cognitivos, en la toma de decisiones, así como en el comportamiento hedónico. Por lo que es interesante saber, si en este modelo de autismo en donde se observa una disminución de las InCs del estriado, existe una afectación en la conducta hedónica de los animales expuestos al ácido valproico. Por lo que, es imperativo realizar pruebas piloto que nos ayuden a estandarizar un prueba conductual que nos permita evaluar la conducta hedónica en estos animales.

ABSTRACT

Recent studies showed that in an autism model in the rat by exposing of valproic acid in these animals at 12.5 days of gestation, significantly reduces the number of cholinergic interneurons (CIns) in the striatum. These interneurons are involved in cognitive processes, decision-making as well as the hedonic behavior. Thus it is interesting to know, if in this autism model where the number of CIns decreased in the striatum there is involvement in hedonic behavior in animals exposed to valproic acid. Therefore, it is imperative to conduct pilot tests that help us standardize a test of behavior that allows us to evaluate the hedonic behavior in these animals.

Palabras clave: InCs, autismo, ácido valpróico, hedónica.

INTRODUCCIÓN

El Trastorno del Espectro Autista (ASD, por sus siglas en inglés) es un problema del neurodesarrollo caracterizado por impedimentos en las habilidades sociales de comunicación, así como de movimientos estereotipados y restringidos intereses (American Psychiatric Association, 2013), dicho trastorno ha cobrado mucha importancia últimamente debido a que hoy en día se desconoce su etología y patogenia, y los trabajos realizados en dicho tema se han enfocado principalmente en anomalías en las conexiones sinápticas dentro del sistema nervioso (Markran & Markran, 2010), la variedad y severidad de los síntomas en el ASD se cree que es causado por múltiples factores ambientales, genéticos y prenatales (Guglielmi et al., 2015).

Diversos investigadores han sugerido la participación de los ganglios basales (Fucillo et al, 2016) ya que dichos núcleos se encuentran involucrados en el control y planeación de los movimientos voluntarios y en aspectos cognitivos (Albin, R. L. et al, 1989; DeLong M.R. et al, 2006), por lo que pueden estar involucrados en las conductas repetitivas y en la rigidez cognitiva que se observa en los pacientes con ASD. El cuerpo estriado es el módulo de entrada a los ganglios basales, un circuito neuronal necesario para el control de los movimientos voluntarios (Hikosaka et al., 2000), y se compone del caudado putamen y el núcleo accumbens (NAcc). Las aferencias estriatales llegan de 3 principales fuentes: la

[1] Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Manuel Nava No. 6, Col. Universitaria, C.P. 78260, 1San Luis Potosí, S.L.P. sasoolmos23@hotmail.com
[2] Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Venustiano Carranza No. 2405, Col. Universitaria, C.P. 78210, San Luis Potosí, S.L.P. osobanez@gmail.com

corteza, el mescencéfalo y el tálamo (Haber, 2003). Además, el estriado tiene dos vías principales eferentes, directa e indirecta (Parent et al, 1984;. Gerfen et al, 1990;. Kawaguchi et al ., 1990; Chuhma et al, 2011), a través de las neuronas de proyección espinosas medianas (EMs), que componen al estriado casi en su totalidad (~ 95%) y el resto (5%) son diferentes tipos de interneuronas, como son las interneuronas colinérgicas (InCs; ~1-2%) y el resto son diversos tipos de interneuronas GABAérgicas que se han dividido de acuerdo a sus propiedades electrofisiológicas, anatómicas y neuroquímicas (Ibáñez-Sandoval et al., 2010, 2011; Kawaguchi, 1993; Tepper et al., 2010).

Estudios recientes, muestran un novedoso microcircuito del estriado que participa en la reorientación de la atención ante un estímulo externo (English et al., 2011), el cual involucra a las InCs, a un nuevo tipo de interneurona NPY y a las EMs. En este sentido, hemos observado que en el modelo autista de la rata se encuentra una disminución importante en el número de InCs, lo que sugiere una alteración en la conducta de reorientación de la atención o un incremento exacerbado de la atención en estos animales (Ibáñez-Sandoval, 2016; Tesis de Maestría). Así mismo, se sabe que las InCs en el estriado ventral participan en la conducta hedónica, por lo que es interesante explorar en este mismo modelo si existe una alteración de esta. Por lo anterior, es importante estandarizar una prueba que nos permita evaluar la conducta hedónica, en este modelo de autismo en la rata. Los resultados hasta ahora muestran, que se tienen mejores resultados al emplear gelatina para poder evaluar la conducta hedónica en las ratas.

METODOLOGÍA

Pruebas piloto para el comportamiento hedónico, se realizó con 2 variantes:

1. *Prueba Hedónica primer variante:* En una caja de dimensiones 84 cm de largo x 35 cm de ancho x 25 cm de alto con 3 subdivisiones formando 3 compartimentos A, B y C, se colocará la rata en el centro (***ver Figura 3***) mientras que en uno de los extremos (en este experimento en la cabina A) de la caja, se colocarán 2 alimentos, el primero es el común para las ratas llamado "Pellet" y el segundo es un alimento el cual es llamativo y rico en azucares, se trata de las galletas marca "Chokis" (***ver Figura 1***) y se monitorea la actividad de la rata por 10 minutos.

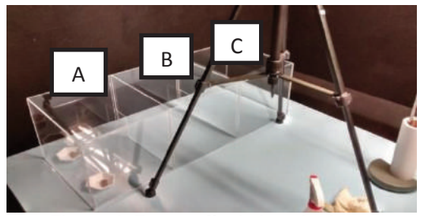


Figura 1. Fotografía de la caja de pruebas, nótese en el extremo izquierdo de la caja están colocados paralelamente los alimentos en sus respectivas charolas.

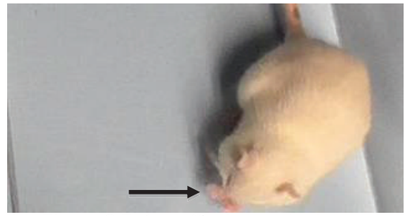


Figura 2 Fotografía de la caja de pruebas con una rata macho de experimentación, obsérvese como opta por una posición encorvada con las dos patas delanteras posicionadas sobre el rostro del animal.

En este experimento de utilizaron 4 ratas control de la cepa ***Sprague Dawley*** de las cuales 2 son machos y 2 hembras. A las ratas se les privó de alimento 24 horas previas al experimento aumentando las posibilidades de que las ratas consuman el pellet o la galleta. Tanto las galletas como el pellet se pesaron previo y después del experimento en una balanza analítica para obtener un Δ del peso (ω inicial – ω final) indicando que tanto consumió el animal, se obtuvo el tiempo en el cual la rata estuvo en contacto con el pellet o con la galleta, el número de mordidas a los alimentos y se tomó nota sobre la realización de

"Grooming" (***ver Figura 2***) la cual es la acción en que las ratas con sus dos patas delanteras comienza a frotarse la cara denotando posible estrés o ansiedad.

2. *Prueba Hedónica segunda variante:* De la misma manera que la anterior prueba, se colocarán 2 alimentos, ambos son gelatinas pero la única variante es que el primero es sin sabor y el segundo con sabor, colorido y con frutas en su interior (***ver Figura 4***) y se monitorea la actividad de la rata por 20 minutos.

En este experimento de utilizaron las mismas 4 ratas del experimento anterior, dichas ratas en esta ocasión se les privó de alimento y bebida desde 24 horas previas al experimento, aumentando las posibilidades de que las ratas consuman el alimento. Se tomaron los mismos parámetros y medidas de prevención de la primer variante.

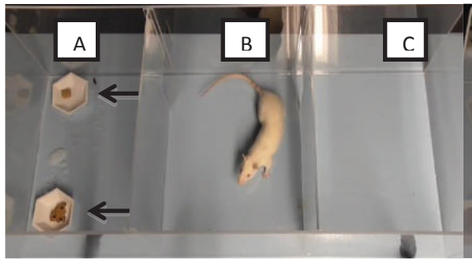


Figura 3 Caja de pruebas dividida en 3 partes, en la parte izquierda de la foto se encuentra el pellet (superior izquierda) y la fracción de la galleta (inferior izquierda).

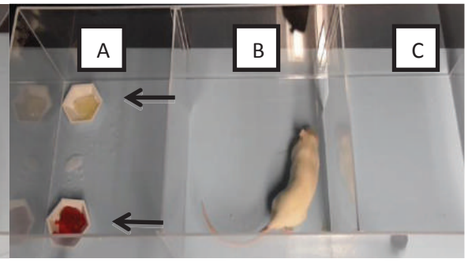


Figura 4 Caja de pruebas dividida en 3 partes, en la parte izquierda de la foto se encuentra la gelatina s/sabor (color amarillo pálido) y c/sabor (color rojo).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

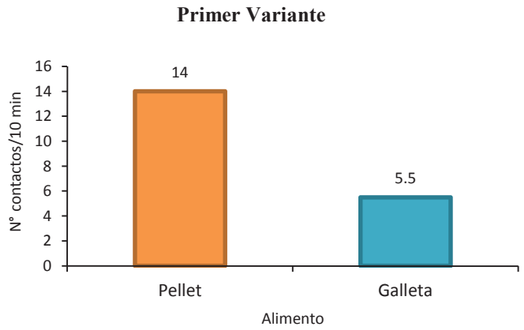


Figura 5 Gráfica que muestra el <u>número de contactos promedio</u> que tuvieron las ratas con el pellet o la galleta durante los 10 minutos del experimento.

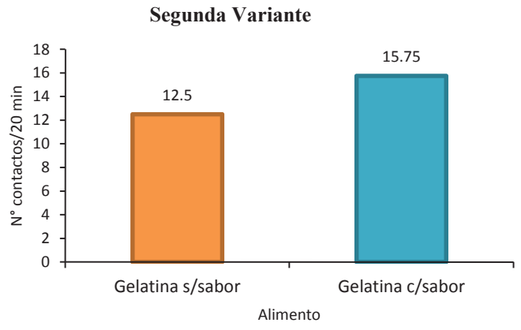


Figura 6 Gráfica que muestra el <u>número de contactos promedio</u> que tuvieron las ratas con la Gelatina s/sabor o c/sabor durante los 20 minutos del experimento.

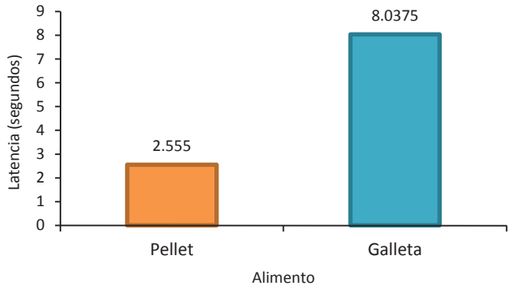


Figura 7 Gráfica que muestra el <u>tiempo promedio</u> que tardan las ratas en tener el primer contacto con el pellet o la galleta durante los 10 minutos del experimento.

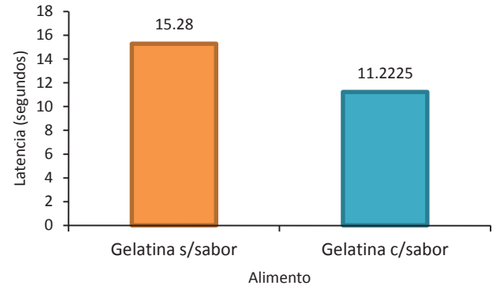


Figura 8 Gráfica que muestra el <u>tiempo promedio</u> que tardan las ratas en tener el primer contacto con la Gelatina s/sabor o c/sabor durante los 20 minutos del experimento.

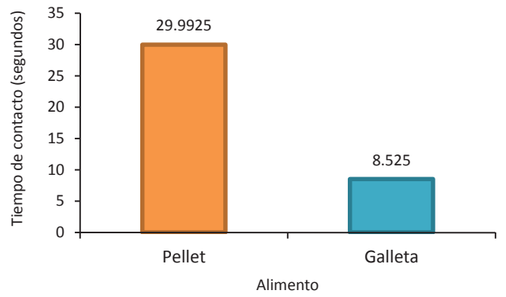


Figura 9 Gráfica que muestra el <u>tiempo promedio</u> en el cual están en contacto las ratas con el pellet o la galleta durante los 10 minutos del experimento

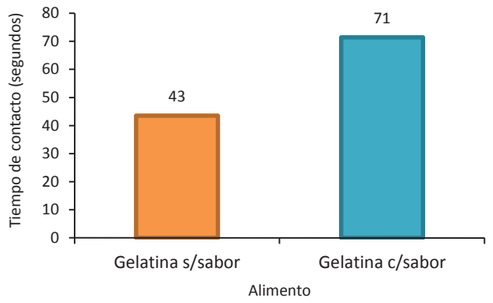


Figura 10 Gráfica que muestra el <u>tiempo promedio</u> en el cual están en contacto las ratas con la Gelatina s/sabor o c/sabor durante los 20 minutos del experimento.

En los resultados anteriores, se logra apreciar notablemente que la segunda variante en la prueba hedónica se obtuvieron los resultados más idóneos con las ratas de la cepa **Sprague Dawley,** las modificaciones relevantes para el éxito del experimento fueron el tiempo y el alimento, se supo esto debido a que en la revisión de los videos de la primer variante, las ratas tenían primero que adaptarse al nuevo entorno por lo cual 10 minutos resultaban insuficientes para que dichas ratas pudieran comer en calma en un ambiente conocido por lo que se decidió incrementar el tiempo a 20 minutos, además de que durante la realización de la primer variante las ratas se encontraban más estresadas y en cuanto a la alimentación se optó por privar de agua y comida aumentando las posibilidades de que consumieran gelatina con fruta (rica en azúcares y agua) que una galleta (solamente es rica en azúcares).

Comparando la ***Figura 5*** y ***Figura 6*** se observa una notable diferencia en el número de contactos que las ratas tuvieron en presencia de un alimento no apetitoso para las ratas, en la primer variante el resultado no mostró lo que se queriamos ver ya que las ratas tuvieron un mayor contacto con el pellet que con la galleta, caso contrario que se observa que hubo más contactos con la gelatina con sabor y fruta que la de sin sabor, obteniéndose un resultado idóneo (ver ***Figura 7*** y ***Figura 8)***, de igual forma hay una diferencia sobresaliente ya que en la primer variante se tardó más tiempo en tener el primer contacto con la galleta que con el pellet (denotando menor importancia), en comparación con la segunda variante, que la latencia

fue mucho menor con la gelatina con sabor demostrando que capta mayormente su atención. Por último en la ***Figura 9*** y ***figura 10***, nuevamente en la primer variante, el pellet fue el más deseado por las ratas obteniendo más tiempo con respecto a la galleta y en cuanto a la gelatina con sabor captó por mucho más tiempo la atención de la rata con respecto a su contraparte de la gelatina sin sabor, todo estos resultados están igualmente respaldado por número de mordidas y el contenido neto del alimento neto consumido que fue favorable para la gelatina con sabor.

CONCLUSIONES

Partiendo de la idea de una rata sana, éstas por su instinto buscan algo más llamativo, más degustable y/o más placentero, dicho esto es exactamente lo que se evaluó, para ello se modificaron distintas variables cuyo fin era obtener resultados claros y diferenciables que denoten una conducta hedónica normal y satisfactoriamente se obtuvo un prueba que cumpliera los requisitos previamente mencionados, el uso de ratas control de la cepa **Sprague Dawley** demostró tener un comportamiento hedónico normal bajo las rigurosas condiciones de trabajo así como el empleo del alimento que probó tener el mayor gusto sobre las ratas con las que se trabajaron, con esto se concluye que la segunda variante de la prueba que tiene por uso de dos gelatinas (sin sabor y con sabor) posicionados en un extremo de la caja de pruebas con tres subdivisiones mientras se coloca en medio a la rata en experimentación que estuvo en ayuno 24 horas previas mientras es monitoreada con cámara de video por 20 minutos, puede usarse como un método de evaluación en ratas autistas para entender el comportamiento hedónico que poseen y con ello permitan esclarecer más el panorama sobre trastorno del espectro autista, obteniendo información valiosa que ayude a realizar en estudios posteriores métodos para el combate del mismo ya en humanos.

BIBLIOGRAFÍA

1. ALBIN, R.L. et al. (1989) The functional anatomy of basal ganglia disorders. Trends Neuroscience. 12, 366–375.
2. CHUHMA, N., TANAKA, K. F., Hen, R., Rayport, S. (2011). Functional connec-tome of the striatal medium spiny neuron. J. Neuroscience. 31, 1183–1192.doi: 10.1523/JNEUROSCIENCE.3833-10.2011
3. DELONG, M. R and WICHMANN T. (2006) Circuits and circuit disorders of the basal ganglia. Arch Neurol. 64:20-24.
4. FATEMI, S. H., ALDINGER, K. A., ASHWOOD, P., BAUMAN, M. L., BLAHA, C. D., BLATT, G. J., et al. (2012). Consensus paper: pathological role of the cerebellum in autism. Cerebellum
5. FUCILLO, M. V. (2016) Striatal circuits as a common node for autism pathophysiology. Front Neuroscience. 10:27. Doi:10.3389/fnins.2016.00027.
6. GERFEN, C. R., BAIMBRIDGE, K. G., MILLER, J. J. (1985). The neostriatal mosaic: compartmental distribution of calcium-binding protein and parvalbumin in the basal ganglia of the rat and monkey. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 8780–8784.
7. GERFEN, C. R., ENGBER, T. M., MAHAN, L. C., SUSEL, Z., CHASE, T. N., MONSMA, F. J., et al. (1990). D1 and D2 dopamine receptor regulated gene expres on of striatonigral and striatopallidal neurons. Science 250, 1429–1432.doi: 10.1126/science.2147780.
8. GRAVELAND, G. A., DIFIGLIA, M. (1985). The frequency and distribution of medium-sized neurons with indented nuclei in the primate and rodent neostriatum. Brain Res. ELSEVIER.327, 307–311. ELSEVIER
9. GROFOVA, I. (1979). Types of striatonigral neurons labeled by retrograde transport of horseradish peroxidase. Appl. Neurophysiology PUBMED. 42, 25–28.
10. GÜL DÖLEN & MUSTAFA SHAIN. (2016). Essential Pathways and Circuits of Autism Pathogenesis. Frontiers in Neuroscience, 10(182), 1-2.
11. HABER, S.N. (2003).The primate basal ganglia: parallel and integrative networks. J. Chem.Neuroanat. 26, 317–330.doi:10.1016/j.jchemneu.2003.10.003

12. HIKOSAKA, O., TAKIKAWA, Y., KAWAGOE, R. (2000).Role of the basal ganglia in the control of purposive saccadic eye movements. Physiol.Rev. 80, 953–978.
13. IBAÑEZ SANDOVAL, D. N. (2016). “Alteraciones en el sistema colinérgico del estriado en un modelo de autismo en rata”. Tesis de maestría. Posgrado en Ciencias Biomédicas Básicas, Facultad de Medicina de la UASLP, San Luis Potosí, S. L. P., México.
14. IBAÑEZ SANDIOVAL, O., TECUAPETLA, F., UNAL, B., SHAH, F., KOÓS, T. & TEPPER J.M. (2011). A Novel Functionally Distinct Subtype of Striatal Neuropeptide Y Interneuron. The Journal of Neuroscience, 31(46):16757–69.
15. KAWAGUCHI, Y., WILSON, C. J., EMSON, P.C. (1990). Projection subtypes of rat neostriatal matrix cells revealed by intracellular rinjection of biocytin. J.Neuroscience. 10, 3421–3438.
16. KIMURA, H., MCGEER, P. L., PENG, F., and MCGEER, E. G. (1980). Choline acetyltransferase-containing neurons in rodent brain demonstrated by immunohistochemistry. Science. 208,1057–1059.
17. MARKRAM, K & MARKRAM, H. (2010). The Intense World Theory - a unifying theoryof the neurobiology of autism. Frontiers in HUMAN NEUROSCIENCE, 4(224), 1-2.
18. PARENT, A., BOUCHARD, C., SMITH, Y. (1984). The striatopallidal and striatonigral projections: two distinct fiber systems in primate. BrainRes. 303, 385–390.doi: 10.1016/0006-8993(84)91224-1.
19. QIU, A., ADLER, M., CROCETTI, D., MILLER, M. I. and MOSTOFSKY, S. H. (2010) Basal ganglia shapes predict social, communication, and motor dysfunctions in boys with autism spectrum disorder. Trends in Neuroscience 12:366-375.
20. RINALDI, T., PERRODIN, C., MARKRAM, H. (2008) Hyper-connectivity and hyper-plasticity in the medial prefrontal cortex in the valporic acid animal model of autism. Front. Neural Circuits 2, 4.
21. STEINER, H. & TSENG, K. (2010). Handbook of Basal Ganglia Structure and Function, Volume 24 (Handbook of Behavioral Neuroscience). USA, Elsevier Inc.
22. TEPPER, J.M., TECUAPETLA, F., KOÓS, T., IBAÑEZ-SANDOVAL, O. (2010). Heterogeneity and diversity of striatal GABAergic interneurons. Frontiers in Neuroanatomy, 4(150), 1-3.
23. VADEMECUM, V. (2016). Valproico ácido. Retrieved 28 august, 2016, from http://www.vademecum.es/principios-activos-valproico+acido-n03ag01
24. WILSON, C. J., KAWAGUCHI, Y. (1996). The origins of two-state spontaneous membrane potential fluctuations of neostriatal spiny neurons. J. Neuroscience. 16, 2397–2410.

WHY DO ONLY SOME RADIO GALAXIES ACQUIRE GIANT SIZES?

Elizabeth López Vázquez[1] and Heinz Andernach[2]

RESUMEN

Se presenta un estudio de la morfología de la radioemisión de radiogalaxias *gigantes* (GRGs), una especie muy rara de galaxias activas, para encontrar nuevos indicios de las razones de su gran tamaño. En base a imágenes de dos rastreos del cielo a 1.4 GHz para cuantificar su radiomorfología, medimos la geometría (simetría, ángulo de distorsión, etc.) y la razón entre flujos de cada lóbulo, en 58 de tales objetos. Un análisis preliminar sugiere que la simetría de las radiofuentes no difiere entre galaxias y cuásares, además no hay una tendencia entre tamaño lineal y corrimiento al rojo, y sólo una tendencia marginal para mayor simetría con mayor tamaño. Integrando datos disponibles de otros objetos se espera obtener nuevos indicios sobre las razones de su gran tamaño. Además, en estos rastreos inspeccionamos alrededor de 1059 galaxias y cuásares, en búsqueda de posibles nuevos ejemplos de radiocuásares gigantes y se presenta una muestra preliminar de seis de los mismos.

ABSTRACT

We study the morphology of the radio emission of *giant radio galaxies* (GRGs), a rare type of active galaxies, in order to find new clues for the reasons of their large size. Using radio images from two sky surveys at 1.4 GHz we quantified their radio morphology by measuring the geometry (armlength, bending angle, etc.) and flux symmetry for 58 such objects. Preliminary analysis suggests that radio source symmetry does not differ between galaxies and quasars, that there is no evidence for a decrease in linear size with redshift, and only a marginal trend for increasing symmetry with larger size. A merging with data available for other such objects is expected to yield new clues on the possible reasons for their large size. We also searched these radio surveys around the positions of 1059 galaxies and quasars for further giant radio sources, and present a preliminary sample of six of these.

Palabras Clave: astrofísica extragaláctica, galaxias, radiogalaxias, cuásares.

INTRODUCTION

Giant Radio Galaxies (GRGs) or quasars (GRQs) are those whose radio emission extends over a (projected) largest linear size (LLS) of at least 1 Mpc (or 3.09×10^{22} m). They are a small subsample of radio-emitting *active galactic nuclei* (AGN) with a supermassive black hole (SMBH) at their center. Since 2012, when only about 100 GRGs were known, our research group (e.g. Andernach et al., 2012), together with volunteers of the citizen science project *Radio Galaxy Zoo* (http://radio.galaxyzoo.org), more than quadrupled this number. In order to study the possible relation between the optical activity of the galaxy nuclei with the size and shape of their radio emission, Andernach et al. (2015) had used a preliminary sample of 193 GRGs with optical spectra available from the *Sloan Digital Sky Survey* (SDSS, Alam et al., 2015) to conclude that GRGs can have any activity type, but that the activity changes from dominantly quasars at high redshift ($z > 0.4$) to dominantly low-luminosity AGNs at low redshift ($z < 0.4$).

For these GRGs some radio-morphological parameters like armlength ratio (of the distance between central object and the radio sources on each side), bending angle (the orientation difference between the

[1] Universidad de Guanajuato, Departamento de Letras Hispánicas, DCSyH; Ex-Convento de Valenciana s/n; Col. Valenciana, C.P. 36240, Guanajuato, Gto. n_imbruglia@hotmail.com
[2] Universidad de Guanajuato, Departamento de Astronomía, DCNE; Cjón. de Jalisco s/n, Col. Valenciana, C.P: 36240, Guanajuato, Gto., heinz@astro.ugto.mx

vectors from the central object to the radio source), the fluxes and sizes of each lobe, etc., had been measured by Jiménez Andrade (2015), but had not been included in his analysis. In the meantime, another 58 GRGs with spectra from SDSS had been found, for which radio parameters were measured in the present work. In an attempt to search for further GRGs, we also inspected two samples of altogether 1123 quasars or quasar candidates for the presence of extended radio emission. To convert the largest angular size (LAS) to physical sizes (LLS), and to derive radio luminosities, we use standard cosmological parameters of $H_0 = 70$ km s^{-1} Mpc^{-1}, Ω_m=0.3, and Ω_Λ =0.7.

METHODS AND MATERIALS

Radio images at 1.4 GHz from the *NRAO VLA Sky Survey* (NVSS; Condon, Cotton, Greisen et al., 1996) and from the *Faint Images of the Radio Sky* (FIRST; Becker, White & Helfand, 1995), with angular resolutions or *beam widths* of 45" and 5.4", respectively, were displayed side-by-side within the *Aladin* software (Bonnarel, Fernique, Bienaymé et al., 2000). The angular distance from the host galaxy or quasar to the outer extremes of the radio lobes on both sides, as well as the position angle of these vectors, were measured with *Aladin*'s dist option, such that the bending (or misalignment) angle between the lobes could be derived as the complement of the difference of these angles. Whenever a compact bright emission (a so-called *hotspot*) was seen at the end of a lobe in the FIRST image, it was used to measure the armlength, unless the lobe or hotspot was resolved out due FIRST's much higher angular resolution. In the latter case the armlength of the lobe was measured in the NVSS image, drawing a vector from the core to the apparent end of the lobe, which we assumed at a brightness of about five times the noise level, but well below the peak of the lobe emission, so as to avoid overestimation of size due to the smearing effect of the telescope beam. In the NVSS image the radio core was often blended with the lobe emission, in which case the vector was drawn from the image center, which, by definition, was chosen at the position of the host galaxy or quasar.

Total flux densities for radio cores and lobes were measured by integration of the radio images over a contiguous area, hand-drawn using the draw option in *Aladin*. This area was chosen typically so as to include an area that exceeded the area of significant lobe emission in NVSS by at least half a beam width. Whenever the radio core was blended with lobe emission in NVSS, the integration area was divided between the lobes by a line through the radio core perpendicular to the source major axis, and from each NVSS lobe flux half of the flux of the radio core, taken from FIRST, was subtracted. Whenever the radio core was well separated from the lobes in either NVSS or FIRST, its flux was measured in both, such that a difference between them may indicate the presence of either a weak jet, or variability of the core itself (since NVSS and FIRST were observed at different epochs). Often, an extended lobe was partially or completely resolved out in FIRST in which case we only integrated the flux over the area with emission noticeably above the noise level. If no such regions were seen in FIRST, we assigned zero flux to that lobe.

An example of our use of *Aladin* is shown in Fig. 1. The NVSS image of GRG J0107+0246 at redshift z=0.196 and with LAS=7.6', corresponding to LLS=1.4 Mpc, is shown in grey scale in the left panel, while the right panel shows the same sky area in the FIRST survey. Both images are centered on the host galaxy, which features a faint radio core in the FIRST image, but it is blended with lobe emission (or possibly faint jets) in the NVSS image. Since the northern lobe is resolved out in the FIRST image we measure its length (of 3.59' from the core to the end of the lobe) in NVSS. The southern lobe has a compact hotspot in the FIRST image, which we consider the end of the lobe. To measure the integrated flux, e.g. of the south lobe, we drew by hand the red curve around its extent in NVSS, which is automatically reproduced in the FIRST image. The flux in Jansky (1 Jy = 10^{-26} W m^{-2} Hz^{-1}) is then the product of the value of "**Sum"** (as listed in each panel of Fig. 1), times the ratio of pixel-to-beam area (0.098 here).

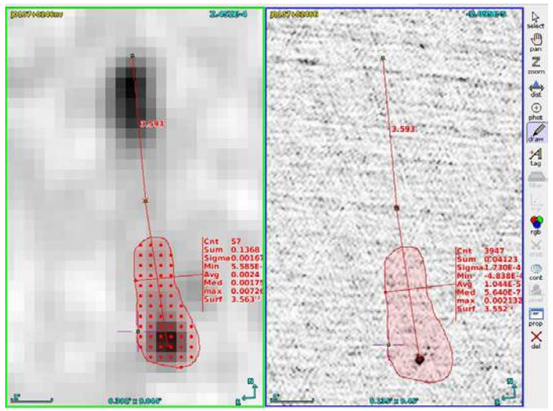


Fig. 1. Example of using Aladin to determine parameters for giant radio sources (see text for details)

All of the above parameters were logged in a table, such that the bending angle could be derived from the individual armlength vectors, and the flux ratios between the lobes and the flux ratio between FIRST and NVSS for each lobe. The lower the latter ratio, the more diffuse the emission is, with a ratio of zero corresponding to “genuinely diffuse”.

In addition, we pursued two exploratory attempts to find more GRGs. The first sample was drawn from table 9 of Kimball et al. (2011) which lists 719 quasar candidates, selected by these authors to have a radio core that coincides with an SDSS object fainter than *i*=19.1 mag, no available redshift in SDSS DR6, and two FIRST sources within 2' from the core, with a bending angle of at most 60°. Since only very few of these objects had measured redshifts, which are required to obtain linear sizes for their radio structures, we culled photometric redshifts (z_{phot}) from various sources like Alam et al. (2015), Brescia, Cavuoti, Longo, & DeStefano (2014), DiPompeo, Bovy, Myers, & Lang (2015), and Bilicki, Peacock, Jarrett, et al. (2016). We obtained values of z_{phot} from at least one of these references for 643 (~89%) objects. However, while Kimball et al. (2009) claimed that the 719 objects are ``excellent candidates for optical quasars'', only 253 (or 35%) were found by us among quasar candidates in DiPompeo et al. (2015).

The second sample was drawn from a list of revised redshifts published by Yuan, Strauss & Zakamska (2016) for 482 quasars, which these authors found to be erroneous in SDSS, implying that many of them actually lie at larger distances than previously thought. To investigate whether any of these qualified as a GRG, we searched NVSS images for diffuse emission, and FIRST images to determine the positions of compact sources in the lobes suspected in NVSS. The latter positions were then inspected for the presence of optical objects in SDSS DR12 (http://skyserver.sdss.org/dr12/en/tools/search/radial.aspx), and if the latter was the case, were discarded as GRGs.

RESULTS

From NVSS and FIRST images of the 58 new GRGs with SDSS spectra, we recorded (where possible) the armlength of each lobe, its position angle, the maximum angular width of each lobe, their integrated fluxes and the integration areas used (in order to determine their average surface brightness), as well as the flux of the radio core, when present. Each lobe was classified for its so-called FR type, being I if the peak brightness occurred within half the lobe length as measured from the core, and II otherwise,

regardless of the core flux (Fanaroff & Riley 1974). In the left panel of Fig. 2 we show the armlength ratio (longer-to-shorter lobe) as function of LLS (in Mpc) of the 58 radio galaxies (33 Gs, red) and quasars (25 Qs, blue), while in the right panel we show the bending angle between the two lobes as function of LLS. Clearly, Gs and Qs do not segregate in these plots, implying a similar amount of symmetry for both. Only the left panel shows a trend for larger sources being more symmetric in armlength ratio.

The median redshift of Gs and Qs is 0.45 and 0.91, respectively. The distribution of LLS for Gs and Qs, with medians of 1.23 and 1.10 Mpc, respectively, is statistically indistinguishable, as is that of the bending angles (with a median of 5° for both), and that of the FR class distribution (88% for Gs and 84% FRII for Qs). Only 3 of the 58 sources (5%) were found to be of type FRI, and another five cases with different FR types between one lobe and the other (so-called hybrid sources, or HyMORs). Of these latter, four had the *longer* lobe of type FRI. Curiously, there is no trend of LLS with redshift z, despite the fact that at higher z the Universe was denser and should have impeded the growth of radio lobes more than at lower z. It will be interesting to analyze our data with respect to the lobes' surface brightness, since modern cosmology predicts a *surface brightness dimming* proportional to $(1+z)^4$. For the higher-redshift sources (7 of our 58 objects have a z>1) this effect should be noticeable.

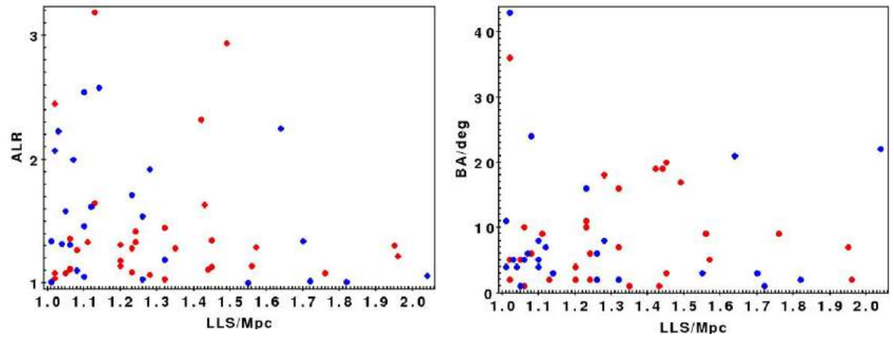


Fig. 2. Geometrical parameters for the 58 new giant radio galaxies (see text for details).

Of the 719 objects in table 9 of Kimball et al. (2009), 142 were already listed as extended radio sources in a compilation maintained by one of us (HA). The remaining 577 quasar candidates were searched by us for extended radio structures emanating from these objects in NVSS images of 15’ x 15’, and, when found, their total angular size was logged. Only those 23 objects with LAS > 3’, and with a value for z_{phot} available and suggesting an LLS > 1 Mpc, were inspected on FIRST images, while objects with too asymmetric radio structures, as well as those with optical objects coinciding with the suspected radio lobes, were discarded. As a result, five new giant radio galaxies were found, two of them are shown in Fig. 3.

All images are oriented with north up and east to the left, and NVSS contour plots mark the optical host positions as a central cross. The left two panels show the NVSS and FIRST images of 2’ x 6’ of GRG J1341+0625, hosted by SDSS J134122.39+062504.9 with z_{phot}=0.45, LAS=3.78’, thus LLS=1.31 Mpc. The right two panels show NVSS and FIRST images of 2.5’ x 7’ of GRG J1357+6009, hosted by the galaxy SDSS J135732.72+600929.5 with z_{phot}=0.35 and LAS=5.35’, thus LLS=1.59 Mpc. Both sources are core-dominated with neither of the outer hotspots having an optical or infrared counterpart, and their armlength ratios of 1.09 and 1.8, and bending angles of 10.9° and 7.4°, respectively, are rather typical for GRGs (see e.g. Fig. 2). Three other examples of giants were found: the galaxy SDSS J235804.24-

110241.6 with z_{phot}=0.49 and LLS=1.37 Mpc, as well as two distant quasars, namely SDSS J154221.45+633741.3, with z_{phot}=0.84 and LLS=1.48 Mpc, and SDSS J123824.94+422836.0 with z_{phot}=2.86 and LLS=1.45 Mpc. Several dozen more candidates remain to be inspected.

Inspection of NVSS and FIRST images of the 482 quasars from Yuan et al. (2016) yielded over 100 preliminary candidates. Again, the positions of potential outer lobes or hotspots were checked in SDSS DR12 and were discarded when found to coincide with an optical object within ~2". Only a single GRG candidate was found, hosted by SDSS J005504.42+273036.7 with z_{spec}=0.576, LAS=3.6', thus LLS = 1.42 Mpc. Unfortunately this object is not covered by the FIRST survey, and is too faint to be detected in the recent TGSS-ADR1 survey at 150 MHz (Intema et al., 2016). The GRG nature of this object thus needs further confirmation from deeper radio imaging.

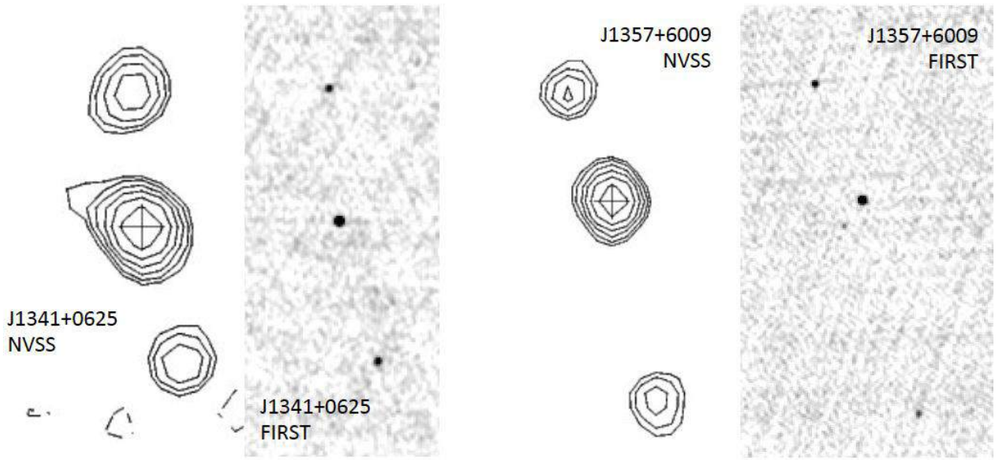


Fig. 3. Examples of newly discovered giant radio galaxies from Kimball et al. (2009), see text for details.

CONCLUSIONS

We measured radio morphological parameters like armlength ratio, bending angle, flux density ratio between longer and shorter lobe, radio luminosity, radio core flux fraction and diffuseness of the lobes, for a new sample of 58 giant radio galaxies (33 galaxies and 25 quasars) which also have an optical spectrum in the SDSS database. We did not find significant differences in radio morphology or size between galaxies and quasars. However, the fact that quasars have a median redshift twice that of the galaxies, implies there is no trend for the size to decrease with redshift.

NVSS and FIRST radio images for 577 quasar candidates from Kimball et al. (2009) and 482 quasars with revised redshifts from Yuan et al. (2016) were searched for extended sources. In the 5 weeks available we could only follow up the most promising cases, finding five convincing GRGs larger than 1 Mpc from the former reference, and one from the latter. The results of this project will be merged with an existing compilation of GRGs by one of us (HA) and will contribute to find the reasons why only a small fraction of radio galaxies reach these enormous sizes.

BIBLIOGRAPHY

ALAM, S., ALBARETI, F.D., ALLENDE PRIETO, C., ANDERS, F., ANDERSON, S.F., ANDERTON, T., ANDREWS, B.H., ARMENGAUD, E., AUBOURG, É., and 296 coauthors (2015). "The Eleventh and Twelfth Data Releases of the Sloan Digital Sky Survey: Final Data from SDSS-III" in *Astrophys. J. Suppl. Ser.* 219, Art.12.

ANDERNACH, H., JIMÉNEZ ANDRADE, E.F., MALDONADO SÁNCHEZ R.F., VÁSQUEZ BÁEZ, I.R., (2012). "Finding Giant Radio Galaxies in Imaging Radio Surveys". Poster presented at *Science from the Next Generation Imaging and Spectroscopic Surveys*, Garching, Germany, October 2012. Available at http://adsabs.harvard.edu/abs/2012sngi.confP...1A

ANDERNACH, H., JIMÉNEZ ANDRADE E.F., COZIOL R. (2015). "Giants towards the Edge of the Universe: Mpc-scale radio galaxies at low and high redshift". Poster presented at the meeting *Back at the Edge of the Universe,* Sintra, Portugal, March 2015, available at http://adsabs.harvard.edu/abs/2015baeu.confP...2A

BECKER, R.H., WHITE, R.L., HELFAND, D.J. (1995). "The FIRST Survey: Faint Images of the Radio Sky at Twenty Centimeters" in *Astrophys. J.,* 450, 559-577

BILICKI, M., PEACOCK, J.A., JARRETT, T.H., CLUVER, M.E., MADDOX, N., BROWN, M.J.I., TAYLOR, E.N., HAMBLY, N.C., SOLARZ, A., HOLWERDA, B.W., BALDRY, I., LOVEDAY, J., MOFFETT, A., HOPKINS, A.M., DRIVER, S.P., ALPASLAN, M., BLAND-hAWTHORN, J. (2016). "WISE x SuperCOSMOS Photometric Redshift Catalog: 20 Million Galaxies over 3 pi Steradians" in *Astrophys. J. Suppl. Ser.* 225, Art. 5

BONNAREL, F., FERNIQUE, P., BIENAYMÉ, O., EGRET, D., GENOVA, F., LOUYS, M., OCHSENBEIN, F. WENGER, M., BARTLETT, J.G. (2000). "The ALADIN interactive sky atlas. A reference tool for identification of astronomical sources" in *Astron. Astrophys. Suppl. Ser.*. 143, 33-40, cf. also http://aladin.u-strasbg.fr/aladin.gml

BRESCIA, M., CAVUOTI, S., LONGO, G., De STEFANO, V. (2014). "A catalogue of photometric redshifts for the SDSS-DR9 galaxies" in *Astron. Astrophys*., 568, Art. A126

CONDON, J.J., COTTON, W.D., GREISEN, E.W., YIN, Q.F., PERLEY, R.A., TAYLOR, G.B., BRODERICK, J.J. (1998). "The NRAO VLA Sky Survey" in *Astron. J.*, 115, 1693-1716

DIPOMPEO, M.A., BOVY, J., MYERS, A.D., LANG, D., (2015). "Quasar probabilities and redshifts from WISE mid-IR through GALEX UV photometry" in *Mon.Not.Roy.astron.Soc.,* 452, 3124-3138

FANAROFF, B. L., RILEY, J. M. (1974). "The morphology of extragalactic radio sources of high and low luminosity" in Mon. Not. Roy. astron. Soc., 167, 31P-36P

INTEMA, H.T., JAGANNATHAN, P., MOOLEY, K.P., FRAIL, D.A. (2016). "GMRT 150 MHz All-sky Radio Survey. First Alternative Data Release ADR1" in *Astron. Astrophys*., in press (http://arXiv.org/abs/1603.04368)

JIMÉNEZ ANDRADE, E. F. (2015). "A study of optical and radio properties of radio-loud AGN", MSc Thesis, Inst. Nacional de Óptica y Electrónica, Tonantzintla, Mexico.

KIMBALL, A.E., IVEZIĆ, Ž., WIITA, P. J., SCHNEIDER, D. P. (2011). "Correlations of Quasar Optical Spectra with Radio Morphology" in *Astron. J.*, 141, Art. 182.

YUAN, S., STRAUSS, M.A., ZAKAMSKA, N. L. (2016). "Spectroscopic Identification of Type 2 Quasars at z<1 in SDSS-III/BOSS" in *Mon.Not.Roy.astron.Soc.,* in press (http://arXiv.org/abs/1606.04976)

CUANTIFICACIÓN DE LA CAPACIDAD SOLUBILIZADORA DE FÓSFORO DE MICROORGANISMOS AISLADOS DE ÁREAS NATURALES PROTEGIDAS

Ramón Luna Calzada[1] y Maria Azucena Márquez Lucio[3]

RESUMEN

Nutricionalmente, el fósforo es el segundo elemento más importante para el crecimiento y desarrollo vegetal, después del nitrógeno. La combinación de fuentes de fósforo y microorganismos solubilizadores y/o estimuladores del crecimiento abre un nuevo espacio de investigación en el campo de la biofertilización, por tal motivo, constituye una alternativa para reducir la contaminación ambiental y mejorar la productividad de los cultivos. En este trabajo se realizaron las cinéticas de crecimiento microbiano, se analizó la capacidad de ciertos microorganismos de solubilizar el fósforo por un método colorimétrico, así como observar la capacidad de solubilización de fósforo realizando confrontaciones entre: bacteria-bacteria, hongo-hongo y hongo-bacteria. Los resultados mostraron la detección cualitativa en cuanto a la capacidad de solubilización de fósforo en medio N-Brip.

ABSTRACT

Nutritionally, phosphorus is the most important element for growth and development plant, after nitrogen. The combination of sources phosphorus and solubilizing microorganisms and/or growth stimulators opens a new research area in the field of biofertilization, for this reason, is an alternative to reduce environmental pollution and improve crop productivity. In this work they were performed microbial growth kinetics, the ability of certain microorganisms to solubilize the phosphorus is analyzed by a colorimetric method, and observe solubilization capacity of phosphorus making confrontations between: bacteria-bacteria, fungus-fungus and fungus-bacteria. The results showed the qualitative detection of phosphorus solubilizing capacity in N-Brip medium.

Palabras Clave: microorganismos solubilizadores, fósforo solubilizado, confrontaciones microbianas, cinéticas de crecimiento.

INTRODUCCIÓN

El crecimiento y desarrollo de los seres vivos depende de la incorporación de varios elementos a sus procesos biológicos y estructuras. El fósforo es el segundo macronutriente más importante en el desarrollo y crecimiento de plantas y microorganismos, después de nitrógeno (Morales, 2012). Este elemento lo podemos encontrar de cuatro formas en el suelo: asimilable (en la solución del suelo), fijado como arcillo húmico (cambiable o lábil), formando parte de la materia orgánica (precipitado como fosfato cálcico y adsorbido en geles de aluminio y hierro) y finalmente formando parte de la roca madre (no asimilable) (Vargas, 2012), además de ser un nutriente esencial para la vida vegetal, animal y de microorganismos. Su importancia radica en la formación de moléculas orgánicas (ácidos nucleicos, ATP, fosfolípidos) y en reacciones de transferencia de energía (Huilcapi, 2007). El suelo es un sistema dinámico y un nicho ecológico de constante actividad biológica. Los suelos agrícolas contienen buenas reservas de fósforo como consecuencia de la aplicación regular de fertilizantes, pero su disponibilidad para la planta es escasa debido a los procesos químicos que "fijan" el fósforo soluble de los fertilizantes en formas insolubles no aptas para la nutrición vegetal.(Fernández, 2005).

[1] Instituto Tecnológico Superior de Irapuato, estudiante de Ingeniería Bioquímica. Carr. Irap. – Silao km 12.5. Irapuato, Gto. ramon.luna.931012@gmail.com
[3] Instituto Tecnológico Superior de Irapuato, profesor de Ingeniería Bioquímica. Carr. Irap. – Silao km 12.5. Irapuato, Gto. mamarquez@itesi.edu.mx

En el suelo existen diferentes fuentes de fósforo que pueden ser categorizados como fósforo inorgánico y orgánico. La distribución de las diferentes formas depende de varios factores como son el tipo de suelo, pH, tipo de vegetación, actividad microbiana y entradas de fertilizantes. (Beltrán, 2014).

Existe una gran variedad de microorganismos en el suelo asociados al proceso de solubilización de fósforo (Martínez, 1996). La comunidad microbiana es el componente funcional más importante de la biota del suelo, ya que juega un papel importante en el flujo de energía, la transformación de nutrientes y el ciclaje de elementos en el ambiente (Moratto, 2005). Los microorganismos pueden relacionarse entre sí, dando lugar, en muchos casos a interacciones sinérgicas que favorecen el crecimiento de la planta (Fernández, 2005), estas interrelaciones entre microorganismos inciden en la interacción suelo-planta-microorganismos-ambiente y repercuten, de forma directa, en el crecimiento y en el desarrollo de las especies vegetales (Cano, 2011), además uno de los mecanismos más usado por las poblaciones microbianas para solubilizar el fósforo es a través de la producción de ácidos orgánicos, los cuales actúan sobre las formas insolubles.

Los objetivos de este trabajo fueron la realización de las cinéticas de crecimiento microbiano, analizar la capacidad de ciertas bacterias de solubilizar el fósforo por un método colorimétrico, así como observar la capacidad de solubilización de fósforo realizando interacciones entre bacteria-bacteria, hongo-hongo y hongo-bacteria.

MÉTODOS Y MATERIALES

La totalidad de los análisis fueron realizados en el Laboratorio de Bioquímica y Microbiología del Instituto Tecnológico Superior de Irapuato (ITESI) ubicado en la ciudad de Irapuato, Guanajuato.

Para analizar la cantidad de fósforo solubilizado se utilizó el método del ácido ascórbico, el cual es un método netamente colorimétrico, en el espectrofotómetro carry 50, a una longitud de onda de 424 nm.

La cinética del crecimiento bacteriano se realizó por dos métodos a la par, los cuales fueron, el conteo de UFC/mL en cámara de Neubauer y absorbancia de luz en espectrofotómetro carry 50, éstos se realizaron cada hora en un periodo de 24 horas. Para la cinética de crecimiento en hongos se realizó por la técnica de peso, el cual consiste en la filtración del cultivo a través de una membrana que retenga las células y su posterior desecación hasta peso constante.

Las fermentaciones de los microorganismos se realizaron en condiciones rotatorias (150 rpm y 30°C de temperatura, durante 48 horas), en el medio N-Brip adicionada con fosfato de calcio tribásico como fuente de fosforo insoluble.

Los microorganismos trabajados en el proyecto fueron reactivados de trabajos anteriores, los cuales son Arizona spp, Proteus spp y Pseudomonas spp y los hongos aún sin identificar y para mayor factibilidad se llamaran B2, B3, B4, H1, H2 y H3 respectivamente.

RESULTADOS

En las curvas de calibración realizadas para la cuantificación de fósforo solubilizado, se obtuvieron regresiones de 0.97, 0.99 y 0.99 respectivamente y se observaron las concentraciones de los medios inoculados con tiempos de 3, 6 y 9 días las cuales se muestran en la Tabla 1.

En relación con las confrontaciones, estas primero se realizaron en Placas Petri para observar si en alguna existía inhibición, de las cuales resultaron 9 confrontaciones exitosas, entre hongos y bacterias. En las curvas de calibración realizadas se obtuvieron regresiones de 0.97, 0.99 y 0.97 respectivamente y se observaron concentraciones que se muestran en la Tabla 2.

Tabla 1. Concentración de los microorganismos a los 3, 6 y 9 días

Concentración (ppm)	B 2	B 3	B4	H1	H2	H3
Con. 3 días	2.45	2.70	3.07	3.26	4.10	3.17
Con. 6 días	4.87	3.98	4.33	6.11	4.99	4.91
Con. 9 días	6.16	5.93	5.33	8.81	7.12	6.85

Tabla 2. Concentración de las confrontaciones a los 3, 6 y 9 días

Concentración (ppm)	**B2-B3**	**B2-B4**	**B4-B3**	**H3-B2**	**H1-B2**	**H1-B4**	**H2-B2**	**H2-H3**	**H2-B4**
Con. 3 días	3.23	3.16	3.06	6.78	8.71	7.73	6.72	7.13	7.19
Con. 6 días	7.70	8.18	3.50	9.24	8.54	10.24	7.77	8.79	8.47
Con. 9 días	9.44	*4.07	9.38	12.41	9.15	11.50	*3.56	10.35	8.67

*Observamos que las confrontaciones B2-B4 y H2-B2 a los 9 días de incubación reduce drásticamente la solubilización.

Se puede observar que con todas las cepas es posible solubilizar el fósforo para volverlo más disponible para plantas, siendo la confrontación H3-B2 y por separado el denominado H1, los que muestran mayor solubilidad del fósforo, pero aun así todas solubilizan este elemento en una capacidad considerable.
Según los valores obtenidos en las cinéticas bacterianas se puede considerar que cerca de la hora 17 comienza la fase de muerte como se muestran en la Figura 1.

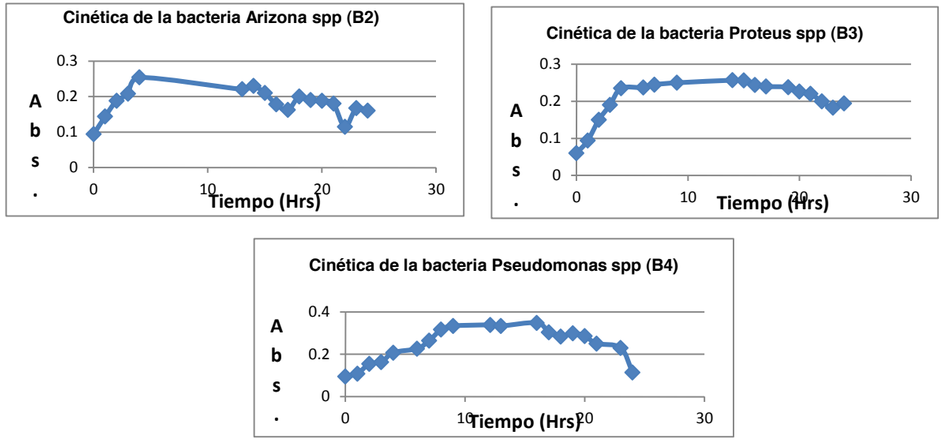
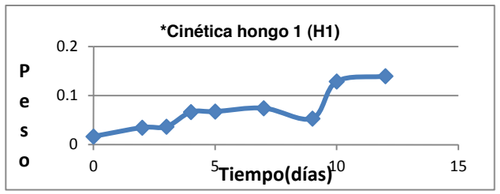
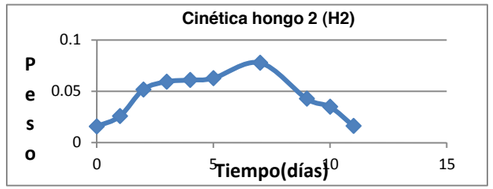


Figura 1. Comportamiento de las bacterias en sus etapas de crecimiento con una fuente de fósforo insoluble.

Las cinéticas para hongo fueron realizadas en un medio con una fuente de fósforo insoluble por un periodo de 7 días. Cabe mencionar que dos hongos (H1 y H3) muestran tener de nuevo etapa exponencial después de cierto tiempo de incubación como se muestra en la Figura 2.





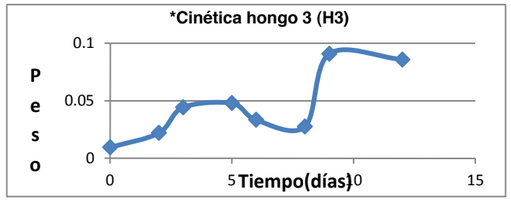


Figura 2. Cinéticas de crecimiento para hongos.

CONCLUSIONES

Se comprobó que las cepas utilizadas en esta investigación son buenos solubilizadores de fósforo aunque las cepas bacterianas solubilizan una mayor cantidad de este elemento cuando se encuentran interaccionando con un hongo solubilizador de fósforo.

El conocimiento de estas bacterias aisladas de un área natural protegida representa un potencial en la mejora de zonas con escases forestal.

BIBLIOGRAFIA

Morales Torres Claudio. (2012). “Aislamiento y caracterización de fosfobacterias”. (Tesis de licenciatura). Universidad Autónoma de Querétaro, México, [pp. 2-8].

Vargas Ramírez Silvia. (2012). “Microorganismos solubilizadores de fosfato en suelos”. (Monografía para especialización en química ambiental). Universidad Industrial de Santander, Facultad de ciencias, Bucaramanga, [pp. 17-48].

Huilcapi Salazar Jenniffer Verónica. (2007). “Aislamiento e identificación de bacterias fosfato solubilizadoras a partir de muestras de suelo y raíz de diferentes cultivos de rosas de la provincia de Pichincha”. (Tesis para licenciatura). Escuela Politécnica del Ejército, Ecuador, [pp. 6- 26].

Fernández Maria Teresa. (2005). “El papel de la solubilización del fósforo en los biofertilizantes microbianos”, en ICIDCA, Núm. 3I, Vol. 39, Septiembre-Diciembre, [pp. 27-34].

Beltrán Pineda Mayra Eleonora. (2014). “La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal”, en Corpoica ciencia tecnológica agropecuaria, Núm. 15, Vol. 1, Enero-Junio, [pp. 101-113].

Moratto C., Martínez J., Valencia H., Sánchez J. (2005). “Efecto del uso del suelo sobre hongos solubilizadores de fosfato y bacterias diazotróficas en el páramo de Guerrero (Cundinamarca)”, en Agronomía colombiana, Núm. 23, Vol. 2, Julio-Noviembre, [pp. 299-309].

Cano Mario Alejandro. (2011). “Interacción de microorganismos benéficos en plantas: Micorrizas, *Trichoderma spp. y Pseudomonas spp*”, en U.D.C.A Actualidad y Divulgación Científica, Núm. , Vol. 2, [pp. 15-31].

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO DE PLANTAS DE ZONAS NATURALES PROTEGIDAS DEL ESTADO DE GUANAJUATO

Viviana Luna Rangel[1] y Blanca Estela Gómez Luna[2]

RESUMEN

Las bacterias promotoras de crecimiento en plantas conocidas por sus siglas PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacterias) pueden ser una herramienta biotecnológica sostenible como biofertilizante y biocontrolador. En este trabajo se realizó el aislamiento de rizobacterias en suelo de árboles nativos de la región de Guanajuato, dentro de las Zonas Naturales Protegidas del estado. Se obtuvieron 100 cepas con actividad de ACC (1- acido carboxílico, -1- aminociclopropano) desaminasa, de las cuales se seleccionaron 50 aislados para pruebas de caracterización, confrontación de hongos fitopatógenos, germinación de semillas en rábano (*Rabhanus sativus*), y lenteja (*Lens culinaris*). Las cepas A1-112, A1-255, C1-258 y D1-303 obtuvieron resultados muy favorables en todas las pruebas.

ABSTRACT

The Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) can be a sustainable biotechnological tool as biofertilizers and biocontrolers. In this work was carried out the isolation of PGPR in the soil of native trees in the region of Guanajuato, into the Natural Protected Areas of the state. 100 strains were obtained with activity of ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid) desaminase, 50 of these were selected for caracterization test, confrontation of phytopatology fungus, seed germination on radish *(Rabhanus sativus)* and lentil (*Lens culinaris*). The strains A1-112, A1-255, C1-258 and D1-303 obtained very favorable results in all tests.

Palabras Clave: Rizobacterias, suelo, Áreas naturales protegidas.

INTRODUCCIÓN

En el estado de Guanajuato existen actualmente 23 áreas naturales protegidas que tienen en total una extensión de 63,611 hectáreas. Las Áreas Naturales Protegidas son las zonas del territorio nacional y aquellas sobre las que la nación ejerce su soberanía y jurisdicción, en donde los ambientes originales no han sido significativamente alterados por la actividad del ser humano o que requieren ser preservadas y restauradas (CONANP, 2014).

La biotecnología ofrece diversas herramientas para el desarrollo sostenible, y en el suelo agrícola, como en el de las zonas de áreas naturales protegidas, existe una gran diversidad de microorganismos, entre ellos diversos microorganismos benéficos para el desarrollo y producción de las plantas. Las rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas PGPR por su acrónico en inglés "Plant Growth Promoting Rhizobacteria" (Kloepper et al., 1978; Glick, 1995; Glick, 1999), constituyen excelentes alternativas biotecnológicas para mejorar el rendimiento de los cultivos de interés agronómico, permitiendo una mayor producción y calidad en los productos de las plantas.

Las rizobacterias ejercen efectos benéficos a través de mecanismos directos e indirectos para la promoción del crecimiento vegetal. La promoción directa ocurre cuando las bacterias sintetizan metabolitos que facilita a las plantas, la toma de ciertos nutrimentos a partir del ambiente, estos

[1]Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Química; Cerro de las campanas s/n, La campanas, C.P: 76010, Querétaro, Queretaro, vivisyo94@hotmail.com
[2] Universidad de Guanajuato, Campus celaya-salvatierra, Departamento de Ingeniería Agroindustrial; Prolongación Río Lerma s/n, C.P. 38060,Guanajuato, Celaya, be.gomez@ugto.mx

mecanismos son: fijación de nitrógeno; síntesis de fitohormonas (auxinas, giberelinas, citocininas), vitaminas y enzimas; solubilización de fósforo inorgánico y mineralización de fosfato orgánico; oxidación de sulfuros; incremento en la permeabilidad de la raíz; producción de nitritos; acumulación de nitratos; reducción de la toxicidad por metales pesados y de la actividad de la enzima ACC desaminasa (Glick 1995; Glick, 1999; Jiménez-Delgadillo, 2004 Dobbelaere *et al*., 2003); mientras que el mecanismo indirecto se lleva a cabo cuando las PGPR disminuyen o previenen el efecto deletéreo de organismos fitopatógenos (hongos, bacterias y nemátodos), ya sea a través de la producción de sustancias antimicrobianas, de sideróforos, de enzimas líticas, o una combinación de éstas (Glick, 1995; Glick, 1999).

Las rizobacterias han sido ampliamente utilizadas en algunos cultivos de importancia agrícola donde se ha demostrado que incrementan el rendimiento y la calidad de frutos (Pulido et al., 2003) como lo es la guayaba (Gomez-Luna et al., 2013); así como la vida de anaquel como en el caso del tomate (Mena-Violante, 2007).

El estudio de las rizobacterias como herramienta biotecnológica en hortalizas y legumbres se ha favorecido mucho, por lo cual en dicho estudio se vio el beneficio de aplicarlas en hortalizas y legumbres como lo fue el rábano (*Raphanus sativus)* y la lenteja (*Lens culinaris*). En el caso de estudio y aplicación de bacterias promotoras de crecimiento en zonas naturales protegidas, aún se encuentra muy limitado el número de investigaciones y se desconoce la diversidad de bacterias rizosféricas y sus efectos benéficos para la recuperación y preservación de estos sitios.

MÉTODOS Y MATERIALES

Muestreo
Se seleccionaron dos árboles mezquite (*Prosopis laevigata*) y encino (*Quercus rugosa*) para la toma de muestra de suelo de la rizósfera, ubicada en la comunidad "Las Cruces" en el cerro de Culiacan, con coordenadas geográficas, 200º 55' 5" latitud Norte, 100º 58' 38" longitud Oeste, con una altura promedio sobre el nivel del mar de 2160 metros, en Salvatierra, Guanajuato. En cada uno de los árboles se tomaron 2 muestras de suelo

Aislamiento de Bacterias promotoras de crecimiento
Se tamizaron las cuatro muestras de suelo y se pesó 20 g de cada muestra, posteriormente se agregaron las muestras a 90 ml de agua estéril y se agitaron por 90 min en un agitador orbital. Las muestras se dejaron reposar por 30 min para la posterior siembra de 50 µL en placas de medio sólido mínimo de sales Dworkin y Foster, 1958 modificado por Penrose y Glick, 2003; composición/litro: glucosa 0.2%, ácido glucónico 0.2%, ácido cítrico 0.2%, agar bacteriológico 2%, ACC 3mM (Sigma). Se empleó el equipo Spiral Plater Interscience en modo de siembra exponencial. Se dejaron incubar las placas por 48 horas a 28°C. Las bacterias obtenidas se aislaron del medio ACC y se seleccionaron 25 cepas de cada muestra, las 100 cepas se sembraron por estría simple en placas con medio PDA (Papa Dextrosa Agar); composición/litro: 200g de papa, 20 g dextrosa y 20 g agar bacteriológico (Bioxon). Las palcas se dejaron encubar de 24-48 hrs a 28 °C.

Caracterización.
Se caracterizaron mediante Tinción de Gram con cristal violeta, lugol, alcohol al 96% y safranina. Las muestras se analizaron mediante el microscopio con el objetivo de inmersión.

Pruebas de germinación.
Se probaron 50 cepas de los 100 aislados obtenidos, dichas cepas se inocularon en tubos falcon con 10 ml de medio PDB (Caldo Dextrosa Papa) y se mantuvieron en agitación contante por 4hrs, se llevaron a incubación a 28 °C durante 24 hrs. Se colocaron 25 semillas de lenteja (*Lens culinaris*) y rábano (*Raphanus sativus)* en cada tuvo y se agitaron por 15 min. Las semillas se colocaron en cajas Petri con papel estéril humedecido, se encubaron a 28 ° C por 72 hrs, después del tiempo transcurrido se calculó el porcentaje de germinación, y se midió la radícula

Pruebas de antagonismo con hongos fitopatógenos.
En cajas Petri con medio PDA se sembró en el centro los hongos *Bipolaris sp, Fusarium oxisporum* y *Alternaria sp.* Se dejaron incubar por 48 horas y posteriormente se inocularon por estría a aproximadamente 3 cm del centro cuatro cepas distintas simulando un cuadrado, confrontando un total del 50 cepas que se dejaron incubar a 28°C por 48 hrs.

Pruebas de producción de sideróforos.
Para la preparación del medio CAS se prepararán 4 soluciones:
La solución 1, o solución indicadora Fe-CAS se preparará mezclando 10 ml de una solución 1 mM de FeCl3.6H2O (en HCl 10mM) con 50 ml de una solución acuosa de CAS (Cromo azurol S; Sigma ChemicalCompany) con una concentración de 1.21 mg/ml. La mezcla se adiciona a 40 ml (1.82 mg/ml) de una solución acuosa de HDTMA (Bromuro de Hexadecil-trimetil-amonio, Fluka). La solución resultante se esteriliza.

La solución 2, o solución reguladora se preparó disolviendo 30.24 g de PIPES (piperazina-N,N´-bis[2-ácido etanosulfónico] Sigma, en 800 ml de una solución salina (0.3 g KH2PO4, 0.5 g NaCl, 1.0 g de NH4Cl, pH 6.8). Se adicionan 15 g de agar y se esteriliza.

La solución 3, 70 ml de agua se adicionaron 2 g de glucosa, 2 g de manitol, 493 mg de MgSO4.7H2O, 11 mg de CaCl2, 1.17 mg MnSO4.H2O, 1.4 mg H3BO3, 0.04 mg CuSO4.5H2O, 1.2 mg ZnSO4.7H2O y 1.0 mg Na2MoO4.2H2O y se esteriliza.

La solución 4, consiste de 30 ml de casaminoácidos al 10% (p/v) Difco, esterilizados por filtración. La solución 3 se adiciona a la solución reguladora junto con la solución de casaminoácidos. La solución indicadora se adiciona al final.

Para la detección de producción de sideróforos los aislados bacterianos se inoculan en el medio y se incuban a 28°C por 48 hrs. Se detectan halos naranjas alrededor de las colonias. Según las indicaciones de Alexander y Zuberer 1991.

RESULTADOS

Se obtuvieron 100 aislados con actividad de ACC (1- ácido carboxílico, -1- aminociclopropano) desaminasa en medio selectivo, de los cuales se seleccionaron 50 cepas para las pruebas, obteniéndose 4 cepas Gram (-) y 46 cepas Gram (+).

Pruebas de germinación
El porcentaje de germinación obtenido de las semillas de lenteja (*Lens culinaris*) que fueron inoculadas por las cepas seleccionadas, en su mayoría fue mayor que el control, que solo se utilizó agua estéril. A las 48 hrs se obtuvieron hasta un 92% de germinación en las semillas con las cepas probadas. El control obtuvo tan solo un 64% de germinación. En dichas semillas germinadas, también se midió la radícula, presentando una diferencia significativa respecto a la longitud en las radículas del control. En la figura 1, se muestra una comparación de 10 semillas del control, respecto a la longitud de la radícula con las cepas A1-103 y A1-112.

Figura 1. Comparación del tamaño de la radícula en las semillas de lenteja (Lens culinaris).

Los resultados obtenidos en la germinación de las semillas de rábano (*Raphanus sativus)* que se inocularon por las cepas seleccionadas, fueron muy favorables, ya que 8 de las cepas obtuvieron el 100% de germinación, y en la mayoría de las semillas germinadas inoculadas con las cepas, presentaron una diferencia mayor en la longitud y la formación de vellosidades en la radícula, a comparación del control a las 48 hrs. En la figura 2, se muestra la fotografía vista desde un macroscópio de una de las semillas geminadas de la cepa A1-112, la cual se observó el desarrollo de muchas vellosidades radiculares.

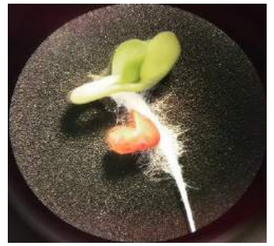


Figura 2. Fotografía de una semilla geminada de rábano (Raphanus sativus) con desarrollo de vellosidades en la radícula

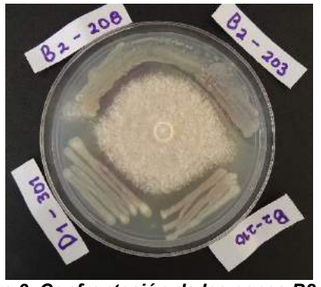


Figura 3. Confrontación de las cepas B2- 203, B2-208, B2-210 Y D1-301, contra el hongo fitopatógeno Fusarium oxisporum

Pruebas de antagonismo con hongos fitopatógenos.
Los resultados obtenidos en esta prueba nos demostraron que los aislados caracterizados presentaron actividad de control biolólogico contra los hongos fitopatógenos. De los cuales las cepas A1-109, A1-116, A1-119, B2-206, B2-207, B2-208, B2-210, D1-302, D1-303, D1-305, D1-308, D1-312 y D1-31 demostraron inhibición del hongo *Fusarium oxisporum,* las cepas A1-115. A1-116, A1-117, B2- 202, B2-203, B2-208, C1-258, D1-302, D1-303, D1-305, D1-306, D1-314 y d1-317 inhibicion de *Bipolaris sp* y en *Alternaria* las cepas A1-114, A1-123, B2-203, B2-205, C1-255, C1-258, D1-302, D1-303, D1-306, D1-313 y D1-314. En donde de las 50 cepas estudiadas, 4 cepas demostraron una eficiente actividad de control biológico para los 3 hongos probados.

Producción de sideróforos
Las rizobacterias con capacidad de producir sideróforos adquieren ventajas competitivas en la colonización de la raíz, competencia por el nicho ecológico e inhibición del crecimiento de hongos fitopatógenos por la baja concentración de Fe^{3+} disponible en suelos (Sunar *et al.*, 2013). En las pruebas

realizadas de producción de sideróforos, de las 50 cepas probadas 17 mostraron ser productores de sideróforos ya que mostraron la aparición de un halo anaranjado alrededor de las cepas crecidas en el medio CAS.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos de la caracterización de las rizobacterias aisladas, muestran que la cepa A1-112, A1-255, C1-258 y D1-303 fueron de las que demostraron tener las mejores capacidades como promotoras de crecimiento, debido a que dichas cepas presentaron, alto porcentaje de germinación, buena longitud de radícula, formación de vellosidades y productoras de metabolitos antagónicos contra los hongos fitopatógenos confrontados.

Dicho análisis nos sugiere que las rizobacterias son una estrategia biotecnológica aceptable como biofertilizante y biocontrolador para la utilización en las Áreas Naturales Protegidas, así como en leguminosas y hortalizas.

REFERENCIAS

ALEXANDER, D.B. & Zuberer, D.A.(1991). Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. Biol Fert Soils. Vol. 12. [pp. 39–45]

CONANP. (2014). “Áreas naturales protegidas”. Consultada en: http://www.conanp.gob.mx/regionales/ (Fecha de consulta: 18-07-2016).

DOBBELAERE, S., Vanderleyden, J., Okon, Y. (2003) Plant Growth-Promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. Crit. Rev. Plant Sci. Num. 2, Vol.22. [pp. 107-149].

DWORKIN, M., Foster, J. W. (1958). Experiments with some microorganisms which utilize ethane and hydrogen. Journal of Bacteriology, Núm. 5, Vol. 75, [pp.592–603].

GLICK, B.R., (1995). The enhancement plant growth free-living bacteria. Can. J. Microbiol. Núm. 41. [pp. 109-117].

GLICK, B.R., Patten, C.L., Holguin, O., Penrose, D.M. (1999). Biocontrol Mechanism. Chapter 7. In Biochemical and genetic mechanism used by plant growth promoting bacteria. Ontario Canada. Imperial Collagge Press [pp. 215-248].

GÓMEZ-Luna, B., Hernández, A., Herrera, C.,Arroyo, G.,Vargas, L., Olalde, V. (2013). Isolation of plant growth promoting rhizobacteria of guava plants (Psidium guajava). Ra Ximhai, Núm. 3, Vol. 8.[pp. 97-102].

JIMÉNEZ, R., Virgen, G., Tabares, S., Olalde, V. (2001) Bacterias promotoras del crecimiento de plantas: agro-biotecnología. *Avance y Perspectiva* Vol. 20. [pp. 395-400].
KLOEPPER JW, Schroth MN (1978). Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. *In* Angers (ed), *Proc. 4th Int. Conf. Plant Path. Bact.* Vol. 2. INRA, Gibert-Clarey, Tours, France. [pp. 879-82].

MENA, H.G, Olalde, V. (2007). Alteration of tomato fruit quality by root inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Bacillus subtilis BEB-13bs. Scientia Horticulturae, Num.1, Vol. 113. [pp.103–106].

PENROSE, D M., Glick, B R (2003) Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. Physiol. Plant. Vol. 118 [pp.10-15].

PULIDO, L.E., Medina, N., Cabrera, A. (2003). La biofertilización con rizobacterias y hongos micorrízicos arbusculares en la producción de posturas de tomate (Lycopersicon esculentum Mill) y Cebolla (Allium cepa L.). I. Crecimiento vegetativo. Cultivos Tropicales. Núm. 1, Vol. 24. [pp. 15-24].

SUNAR K, Dey P, Chkraborty U, Chakreborty B (2013) Biocontrol efficacy and plant growth promoting activity of *Bacillus altitudinis* isolated from Darjeeling hills. *J. Basic Microbiol.* Vol. 10. [pp. 1002-1014].

IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE AISLADOS BACTERIANOS METAL-RESISTENTES

Mariana Libertad Magaña Loyola[1] y Juan Armando Flores de la Torre[2]

RESUMEN

La minería es una de las actividades industriales y económicas más importantes a nivel global, que contribuyen al deterioro ambiental pudiendo ocasionar efectos nocivos a la salud (Flores J. y Albert L., 2004) debido a la diseminación de metales pesados de los cuales algunos son nutrientes traza esenciales para las bacterias pero concentraciones micro o milimolares resultan tóxicos por lo que algunos microorganismos que portan sistemas genéticos que contrarrestan los efectos tóxicos de los metales pesados tienen la capacidad de sobrevivir en ambientes con elevadas concentraciones de estos elementos, la importancia de este trabajo radica en el estudio del DNA metagenómico ya que nos permite conocer aspectos de las comunidades microbianas que habitan ambientes extremos así como los genes que codifican información para su adaptación.

ABSTRACT

Mining is one of the industrial and economic most important activities globally, contributing to environmental degradation causing harmful effects to health (Flores J. and Albert L., 2004) due to spread of heavy metals, some of wich are nutrientsessential for bacteria trace but concentrations micro of milimolares are toxic so some microorganisms that carry genetic systems that counteract the toxic effects of heavy metals have the ability of survive in evironments with high concentrations of these elements, the importance of this work lies in the study of DNA metagenocis since it allows us to know aspects of the microbial communities that inhabit extreme environments as well as the genes that encoding information for adaptation.

Palabras Clave: Jales, metales, bacterias, resistencia.

INTRODUCCIÓN

Existen zonas altamente contaminadas con metales y metaloides, producto de actividades antropogénicas como lo es la minería. Los jales mineros son residuos acumulados en zonas muy cercanas al sitio de extracción, en la actualidad algunas de estas zonas se encuentran rodeadas por sitios habitados, como es el caso de la zona de estudio del presente trabajo, la mina "El Bote" Zacatecas, de la cual se extraían metales preciosos, tales como oro y plata. Dentro de los jales mineros después de un determinado tiempo inicia el crecimiento de plantas, que por naturaleza debe ir acompañado de prolifereación bacteriana que apoya en la generación de un microambiente, para el otorgamiento de nutrientes necesarios para el desarrollo de sistemas biológicos. Las bacterias que se encuentran presentes pueden tener diversos mecanismos de resistencia a los metales tales como:

I. Exclusión de metales por barrera de permeabilidad
II. Eflujo de metales por transporte activo
III. Secuestro intracelular
IV. Secuestro extracelular

[1] Instituto Tecnológico de Celaya, Departamento de Ingeniería Bioquímica; Antonio García Cubas Pte #600 Av. Tecnológico, C.P: 38010, Celaya, Guanajuato. México. Teléfono: (461) 61 17575. 12030491@itcelaya.edu.mx
[2] Universidad Autónoma de Aguascalientes, Av. Universidad #940, Ciudad Universitaria, C.P: 20131, Aguascalientes, Aguascalientes. México. Teléfono: (449) 910 7400.

V. Detoxificación enzimática de metales a una forma menos tóxica
VI. Reducción de la sensibilidad de blancos celulares metales. (Silver S. y Phung L., 2005)

El objetivo del trabajo es realizar la identificación de aislados bacterianos, mediante la extracción de DNA, verificando la integridad, concentración y su posterior identificación molecular por medio de la subunidad 16S del RNA, además de realizar una curva de resistencia al plomo y zinc, en aislados bacterianos de la misma zona.

MARCO TEÓRICO

Bajo la denominación de metales pesados se incluye a un conjunto de aproximadamente 65 elementos de la Tabla Periódica, con una densidad mayor o igual a 5 g/cm3 en su forma elemental, comúnmente presentes en sus formas ionizadas. (Duffus JH, 2006). Los metales pesados pueden dividirse en tres grupos principales lo cuales son micronutrientes catiónicos (cobre, cobalto, níquel y zinc), cationes tóxicos (cadmio, plomo y mercurio) y oxi-aniones tóxicos (arsénico, cromo y selenio). (Aguilar-Barajas et al., 2010). La resistencia a metales pesados es el resultado de la intervención de múltiples sistemas con especificidad de sustrato diferentes, pero que comparten las mismas funciones. Algunos de estos sistemas están ampliamente distribuidos y contribuyen en la defensa elemental de la célula frente a metales potencialmente dañinos, así como frente a las especies que estos producen al interactuar con los componentes celulares. Otros están muy especializados y se encuentran solo en algunas especies bacterianas, confiriéndoles la capacidad de resistencia a metales pesados. (Nies, DH., 2003; Monchy S., et al. 2007)

En *Cupriavidus metallidurans* CH_{34} y *Serratia marcescens* C^{-1} se han identificado la inducción de genes y sobreexpresión de proteínas relacionadas con el estrés oxidativo, en respuesta a elevadas concentraciones de cobre y cobalto, respectivamente. Estos son hallazgos pioneros en relación con los mecanismos celulares requeridos para contrarrestar los efectos oxidativos de elevadas concentraciones de metales pesados en el interior celular en bacterias muy resistentes, por lo que constituye un campo aún por investigar (Silver S. y Phung L., 2005)

MÉTODOS Y MATERIALES

Se trabajó con aislados bacterianos extraídos de la mina "El Bote" Zacatecas (Tabla 1), los cuales fueron cultivados en medio de cultivo líquido Cerebro-Corazón a 27°C y con agitación controlada para evitar cúmulos bacterianos y obtener un crecimiento bacteriano adecuado para la extracción de DNA mediante el método Fenol-Cloroformo para el cual se centrifugaron 3.0 mL de medio de cultivo de la muestra de cada aislado bacteriano a 5000 rpm/ 25 min con el fin de obtener un paquete celular concentrado esto eliminando el sobrenadante, tras realizar esto se incuban las muestras con 1 mL de buffer de lisis a 37°C/30 min tras esto se añaden 100 µL de SDS al 10% , 5µL aprox de proteinasa K a una concentración final de 0.4 mg/mL y 100µL de NaCl 5 M incubando las muestras a 50°C durante 1 hora, después de esto se pasan 500 µL de muestra a microtubos de 1.5 mL y se colocan en hielo para así añadir a cada tubo 200 µL de fenol-cloroformo-alcohol isoamilíco mezclando vigorosamente con el vortex durante 10 segundos y se centrifuga a temperatura ambiente a 12,000 rpm/ 5 min y el sobrenadante pasa a otro tubo en el cual se añaden 200 µL de Acetato de Amonio 7.5 M, se mezcla y se agregan 450 µL de etanol absoluto se mezcla y se incuban a 4°C toda la noche. Al siguiente día se centrifugan a 12,000 rpm/ 5 min a 4°C, se elimina el sobrenadante y se lava la pastilla con 100 µL de etanol al 70%, se elimina el sobrenadante por inversión y se repite dos veces el lavado para así dejar secar la pastilla a temperatura ambiente y luego resuspender con con 50µL de H_2O destilada estéril.

Tras la extracción se procedió a la cuantificación de DNA mediante el uso de NanoDrop 2000c y para conocer la concentración se realizó un gel de electroforesis al 1%.

Se realizaron curvas de resistencia a partir de bacterias en placa las cuales fueron obtenidas de aislados bacterianos de la misma zona las cuales se pusieron a crecer en medio líquido Cerebro-Corazón con agitación para estandarizar la concentración adicionando concentraciones de metales como Pb a 50 ppm y 100 ppm, Zn a 200 ppm 500 ppm, se determino la turbidez de los crecimientos a 620 nm y se graficó la densidad óptica en función de la concentración.

Tabla. 1. Aislados bacterianos extraídos de la mina "El Bote", Zacatecas.

ID	Gram +/-	Características macroscópicas	ID	Gram +/-	Características macroscópicas	ID	Gram+/-	Características macroscópicas
1Z	Bacilos Gram (-)	Circular, amarillo, plana, brillante, bordes enteros, viscosa	1P	Cocos Gram (+)	Circular, amarilla, plana, brillante, borde entero, consistencia Cremosa	1 A	Cocos Gram (+)	Circular, salmón, cóncava, brillante, borde entero, consistencia cremosa
2Z	Bacilos Gram (-)	Beige, circular, cóncava, lisa, bordes enteros, cremosa	2P	Cocos Gram (-)	Puntiforme, crema, cóncava, rugosa, borde ondulados, consistencia viscosa	2 A	Cocos Gram (+)	Circular, anaranjada, cóncava , brillante, borde entero, consistencia viscosa
3Z	Bacilos Gram (+)	Beige, irregular, cóncava, rugosa, bordes ondulados, muy viscosa	3P	Cocos Gram (-)	Circular, blanca, cóncava, brillante, borde entero, consistencia Cremosa	3 A	Cocos Gram (+)	Circular, amarillo, cóncava, brillante, borde entero, consistencia cremosa
4Z	Bacilos Gram (+)	Amarillo claro, circular, cóncava, lisa, bordes enteros, cremosa	4P	Bacilos Gram (-)	Circular, crema, plana, lisa, borde ondulado, consistencia rugosa	4 A	Cocos Gram (+)	Irregular, transparente, plana, rugosa, , borde ondulado, consistencia viscosa
5Z	Bacilos Gram (-)	Beige, circular, plana, lisa, bordes enteros, viscosa	5P	Cocos Gram (-)	Irregular, rosa, cóncava, brillante, borde ondulado, consistencia Cremosa	5 A	Cocos Gram (-)	Irregular, transparente, plana, rugosa, borde ondulado, consistencia viscosa
6Z	Bacilos Gram (-)	Beige, circular, cóncava, brillante, bordes enteros, viscosa	6P	Cocos Gram (+)	Circular, amarilla, cóncava, brillante, borde entero, consistencia cremosa	6 A	Cocos Gram (+)	Irregular, blanca, cóncava, lisa, borde ondulado, consistencia viscosa
7Z	Bacilos Gram (-)	Beige, irregular, plana, brillante, bordes enteros, grumosa	7P	Cocos Gram (-)	Circular, beige, cóncava, brillante, borde entero, consistencia cremosa	7 A	Bacilos Gram (+)	Circular, blanca, plana, lisa, borde entero, consistencia cremosa
8Z	Cocos Gram (-)	Beige, circular, plana, lisa, bordes enteros, cremosa	8P	Cocos Gram (+)	Circular, blanca, cóncava, lisa, borde entero, consistencia rugosa	8 A	Bacilos Gram (+)	Circular pequeño, blanca, plana, lisa, borde entero, consistencia cremosa
9Z	Bacilos Gram (+)	Beige, circular, plana, lisa, bordes enteros, cremosa	9P	Bacilos Gram (+)	Circular, blanca, plana, brillante, borde ondulado, consistencia cremosa	9 A	Cocos Gram (+)	Circular, blanca, plana, lisa, borde entero, consistencia cremosa
10Z	Cocos Gram (+)	Beige, irregular, plana, lisa, bordes ondulados, cremosa.	10P	Cocos Gram (+)	Circular, amarilla, cóncava, brillante, borde entero, consistencia: cremosa	10 A	Cocos Gram (+)	Circular pequeño, amarillo, cóncava, brillante, borde entero, consistencia cremosa

*Z-Zinc, P-Plomo, A-Arsénico

RESULTADOS

Luego de la extracción del ADN, son necesarias la cuantificación y el análisis de la calidad de las moléculas obtenidas. La cuantificación se llevó a cabo en un espectrofotómetro NanoDrop 2000c empleado para cuantificar ácidos nucleicos y proteínas con muestras de 0.5 µL, que en este caso se trabajó con un microlitro obteniendo un amplio rango de lectura de concentración (2ng/µL – 15,000 ng/µL dsADN), que además de valores de concentración, también aporta valores de relación 260/280 (ADN/proteínas) y 260/230 (ADN y solventes orgánicos), obteniendo así información sobre la pureza del producto.

Tabla. 2. Cuantificación de DNA

ID	(ng/µL)	260/280	260/230	ID	(ng/µL)	260/280	260/230	ID	(ng/µL)	260/280	260/230

1Z	177.2	1.57	1.75	1P	410.4	1.65	1.76	1ª	98.1	1.36	1.29
2Z	107.6	1.54	1.79	2P	32.8	1.31	1.50	2ª	653	1.69	1.29
3Z	239.2	1.70	1.12	3P	60.8	1.38	1.40	3ª	62	1.5	1.56
4Z	93.9	1.57	1.39	4P	77.2	1.42	1.59	4ª	105.1	1.46	1.12
5Z	65.2	1.44	1.58	5P	113.1	1.42	1.10	5ª	48	1.35	1.25
6Z	108.2	1.44	1.67	6P	131.2	1.34	1.33	6ª	30.3	1.28	1.39
7Z	92.9	1.46	1.65	7P	23.4	1.49	1.80	7ª	100.7	2.014	1.535
8Z	997.1	1.85	1.76	8P-	231.5	1.76	1.82	8A	79.8	1.596	1.103
9Z	48.3	1.46	1.59	8P.	51.5	1.35	1.48	9A	83.4	1.61	1.84
10Z	111.1	1.47	1.51	9P	75.1	1.26	1.43	10A	92.2	1.33	1.80
				10P	30.3	1.40	1.15				

Con el fin de confirmar la resistencia a Pb y Zn de las cepas NF9, NF17 Y NF22, se estudió la capacidad de los microorganismos de crecer en medio con concentraciones crecientes de dichos metales pesados.

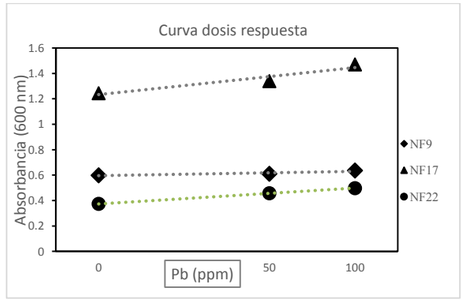


Figura 1. Tolerancia bacteriana a Pb, cepas NF9, NF17,NF22

Para la cepa NF9 se mantiene una línea de tendencia vertical lo que denota que la bacteria se puede mantener ante diferentes concentraciones de Pb sin presentar crecimiento o un deceso. En el caso de la cepa NF17 se observa una línea de tendencia a la alta para una concentración de 50 ppm y 100 ppm observando un comportamiento de crecimiento lo que podría indicar la activación de algún mecanismo de resistencia bacteriano al plomo; al igual que para la cepa NF22 se observa crecimiento leve a una concentración de 50 ppm y 100 ppm.

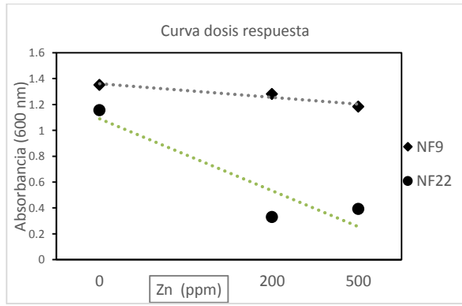


Figura 2. Tolerancia bacteriana a Zn, cepas NF9, NF22

Para el caso de la cepa NF22 se observa una línea de tendencia por debajo del control hasta una concentración de 200 ppm la absorbancia disminuye notablemente y a partir de una concentración de 500 ppmla absorbancia aumenta ligeramente pero sigue muy bajo en comparación al control.
En la cepa NF9 al igual que el caso anterior se observa una línea de tendencia a la baja donde la absorbancia disminuye con respecto al control.

CONCLUSIONES

Debido a la gran problemática asociada con la detección de altas concentraciones de metales pesados en suelos de sitios atropogénicos y sus efectos nocivos para la salud se han analizado los microorganismos existentes en dichos microambientes lo que ha dado lugar al surgimiento y dispersión de nuevos genotipos

microbianos que presentan resistencia abriendo así el camino al descubrimiento de nuevas tecnologías basadas en el empleo de microorganismos resistentes para el saneamiento ambiental.

Al realizar el estudio del microambiente bajo las condiciones mencionadas anteriormente se encontró útil priorizar las interacciones microorganismos - metal pues se ha encontrado que al estar en contacto con dicha interacción se logra un entendimiento de organismos superiores como plantas, utilizando como herramienta la metagenómica funcional se busca identificar los genes y mecanismos involucrados en la habilidad para adaptarse y sobrevivir a las condiciones adversas que les ofrece el medio encontrando en este trabajo un potencial para controlar, contener o reducir los contaminantes de un área determinada contribuyendo a la creación de estrategias de biorremediación.

BIBLIOGRAFIA

Aguilar-Barajas, E., Ramírez-Díaz, M.I., Riveros-Rosas, H. & Cervantes, C. (2010). Heavy Metal Resistance in Pseudomonas. Pseudomonas. [pp. 6, 255-282].

Cervantes C, Espino-Saldaña AE, Acevedo-Aguilar F, LeónRodríguez IL, Rivera- Cano ME, Avila-Rodríguez M, et al. (2006). Interacciones microbianas con metales pesados. Rev Lat Microbiol. [pp. 48(2):203-210].

Duffus JH. (2002). “Heavy metals”—a meaningless term? Pure Appl Chem.;[pp. 74(5): 793-807].

Flores De La Rorre J. A., Manzanares Acuña E., López Luna M. A., Sánchez Rodríguez S. H., Cuevas Flores M. R., “Presencia de plomo en suelo y plantas en Concepción del Oro, Zacatecas por energía dispersiva de fluorescencia de rayos X” en Memorias de Resúmenes 14º Seminario de Investigación, [pp. 262-269].

Monchy S, Benotmane MA, Janssen P, Vallaeys T, Taghavi S, van der Lelie D, et al. (2007). Plasmids pMOL28 and pMOL30 of Cupriavidus metallidurans Are Specialized in the Maximal Viable Response to Heavy Metals. J Bacteriol. [pp. 189(20) :7417-7425].

Nies DH. (2003). Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. FEMS Microbiol Rev. 27:[pp. 271-339]
Silver S, Phung LT. (2005) A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. J Ind Microbiol Biotechnol.;[pp. 325: 87-605].

Silver, S. and L.T. Phung. 2005. A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. J. Ind. Microbiol

Trajanovska S, Britz ML, Bhave M. (1997). Detection of heavy metal ion resistance genes in Gram-positive and Gramnegative bacteria isolated from a lead-contaminated site Biodegradation. [pp. 8(2):113-114].

SÍNTESIS DE COMPUESTOS ORGÁNICOS POTENCIALMENTE BIOACTIVOS MEDIANTE METODOLOGÍAS DE LA QUÍMICA VERDE

María del Pilar Marín Cortez[1] y Catalina María Pérez Berumen[2]

RESUMEN

Las recientes afecciones a la salud humana que han aparecido y evolucionado en los últimos años, tales como enfermedades crónico-degenerativas, conllevan a la necesidad de sintetizar e investigar compuestos que ayuden a prevenir, medicar y/o curar dichas enfermedades. De esta manera, el objetivo de este proyecto fue sintetizar compuestos orgánicos potencialmente bioactivos mediante metodologías de química verde, específicamente sintetizar una chalcona dihidroxi-sustituída: la 1-(2,4-dihidroxifenil)-3-fenil-1-propanona. Este compuesto fue obtenido mediante tres métodos de síntesis: mecanosíntesis (MechS), síntesis asistida por ultrasonido (SAU) y síntesis asistida por microondas (MAS). Los mejores resultados se obtuvieron utilizando ultrasonido, lo cual permite una buena cristalización sin impurezas.

ABSTRACT

Recent human health conditions that have appeared and evolved in recent years, such the wide spread of the chronic degenerative diseases, had conduced to search new compounds that could help to prevent, treat and/or curing these disorders. In this context, the main goal of this project was synthesize potentially bioactive organic compounds using green chemistry methodologies, specifically, we focused in the synthesis of an dihydroxy-substituted chalcone: the 1-(2,4-Dihydroxyphenyl)-3-phenyl-1-propanone. This compound was obtained by three different green methodologies: mechanosynthesis (MechS), ultrasound assisted synthesis (SAU) and microwave assisted synthesis (MAS). The best results were achieved using the SAU methodology.

Palabras Clave: Chalcona, Bioactivos, Química Verde.

INTRODUCCIÓN

El concepto de química verde está íntimamente asociado con la prevención de la contaminación ambiental mediante el diseño de procesos y productos químicos que no posean propiedades dañinas al medio ambiente. La misión de la química verde está definida como “promover el desarrollo y uso de tecnologías químicas innovadoras que reduzcan o eliminen el uso o generación de sustancias dañinas en el diseño, manufactura y uso de productos químicos”. Los objetivos de la química verde han sido definidos de manera más específica como “el establecimiento de los principios para la síntesis y aplicación de productos y procesos químicos que reduzcan o eliminen completamente el uso y producción de materiales que sean dañinos al medio ambiente” (Anastas, 2002).

La reciente ola de crecimiento y aparición de enfermedades crónico-degenerativas tales como el cáncer, enfermedades del corazón, hipertensión, etc. conlleva a la búsqueda de mejores métodos para la obtención de compuestos que ayuden a contrarrestar dichas enfermedades, por lo que la síntesis de nuevos compuestos orgánicos y productos con actividad biológica son de gran impacto en la creación de

[1] Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Ingeniera en Ciencia y Tecnología de Alimentos; Calzada Antonio Narro n°1923, Col. Buenavista. C.P: 25315, Saltillo, Coahuila, pili_saku10@hotmail.com
[2] Universidad Autónoma de Coahuila, Facultad de Ciencias Químicas; Departamento de Química Orgánica; Blvd. V. Carranza y J. Cárdenas s/n. C.P: 25265, Saltillo, Coahuila, catalinaperez@uadec.edu.mx

compuestos enfocados a la salud humana. Las chalconas provienen de la familia de los flavonoides, su estructura química está caracterizada por una cetona aromática y una enona. Pero lo más relevante e impactante son sus propiedades biológicas: actividad antimicrobiana, antifúngica, antiflamatoria, anticancerigena, antidepresiva, etc. De acuerdo con estas propiedades recientemente se ha vuelto muy atrayente para la investigación científica, principalmente con miras hacia los avances en el área de farmacéutica, alimentaria y demás aplicaciones. Ya que en la actualidad por tendencia se requieren productos de origen natural e innovadores que generen nulos efectos secundarios en la salud humana y ambiental. Con la filosofía de la química verde la cual tiene como principios fundamentales el generar un estado armonioso con el medio ambiente, podremos llevar a cabo la obtención de chalconas basándose en los doce principios de esta ciencia.

Estos principios desarrollados por Warner y Anastas nos permiten analizar procesos y establecer qué tan "verde" puede ser una reacción química, un proceso industrial o un producto: 1. Es preferible evitar la producción de un residuo que tratar de limpiarlo una vez que se haya formado; 2. Los métodos de síntesis deberán diseñarse de manera que incorporen al máximo en el producto final, todos los materiales usados durante el proceso; 3. Siempre que sea posible, los métodos de síntesis deberán diseñarse para utilizar y generar sustancias que tengan poca o ninguna toxicidad, tanto para el hombre como para el medio ambiente; 4. Los productos químicos deberán ser diseñados de manera que mantengan su eficacia a la vez que reduzcan su toxicidad; 5. Se evitará, en lo posible, el uso de sustancias auxiliares (disolventes, reactivos de separación, etc.), y en el caso de que se utilicen se procurará que sean lo más inocuas posible; 6. Los requerimientos energéticos serán catalogados por su impacto medioambiental y económico, reduciéndose todo lo posible, se intentará llevar a cabo los métodos de síntesis a temperatura y presión ambiente; 7.

La materia prima ha de ser preferiblemente renovable en vez de agotable, siempre que sea técnica y económicamente viable; 8. Se evitará en lo posible la formación de derivados (grupos de bloqueo, de protección/desprotección, modificación temporal de procesos físicos/químicos); 9. Se emplearán catalizadores (lo más selectivos posible) en vez de reactivos estequiométricos; 10. Los productos químicos se diseñarán de tal manera que al finalizar su función no persistan en el medio ambiente, sino que se transformen en productos de degradación inocuos; 11. Las metodologías analíticas serán desarrolladas posteriormente para permitir una monitorización y control en tiempo real del proceso, previo a la formación de sustancias peligrosas; 12. Se elegirán las sustancias empleadas en los procesos químicos de forma que se minimice el potencial de accidentes químicos, incluidas las emanaciones, explosiones e incendios; (Melendez y Camacho, 2008). Con todo lo anterior el objetivo del trabajo fue sintetizar compuestos orgánicos potencialmente bioactivos mediamente metodologías de química verde.

MÉTODOS Y MATERIALES

Para la elaboración y síntesisde chalconas se utilizaron diferentes métodos, pero estos se utilizó la reacción de Claisen-Schmidt, es un tipo de condensación aldolicaconsistente en la síntesis de cetonasinsaturadas por condensación de unaldehído aromático con una cetona. Esta reacción es la más utilizada comúnmente. En este proceso se hacen reaccionar cantidades equimoleculares del aldehído y cetona se requiere de una base por las condiciones para auto condensarse.

Mecanosíntesis: Es un término utilizado para la síntesis química, utilizando energía mecánica. La cual se da por activación mecánica y puede llevarse a cabo en el laboratorio con la ayuda de un mortero y un pistilo (Mitchenko, 2007; Fernández-Bertran, 1999). Dicho método fue utilizado en nuestro proceso y se describe detalladamente continuación. Se pesaron 0.5 g de 2,4-dihidroxiacetofenona y 0.4 g de hidróxido de sodio en una balanza analítica, en un mortero se colocaron los reactivos y se trituraron hasta quedar como un pasta bien molida, con una jeringa se agregó 0.334 ml de benzaldehído, esta mezcla a reaccionar se continuo moliendo con la ayuda del pistilo durante 20 minutos, tiempo que dura la reacción, se le agregaron 5ml de etanol con una probeta para disolver y recuperar el producto final de la reacción. Este

producto se extrajo con un embudo de separación utilizando acetato de etilo, ácido clorhídrico y agua destilada, se hicieron tres lavados con acetato de etilo y luego verificando que mantuvieran un pH de 6-7, se filtró la reacción y se evaporó el solvente en un equipo de rotavapor, por último se recristalizó con etanol.

Ultrasonido: El ultrasonido se define como todas aquellas ondas de sonido que presentan una frecuencia mayor a la que el oído humano puede responder. Se considera que el ultrasonido se encuentra en frecuencias que varían desde 20 kHz hasta más de 100 MHz (Mason, 2000). En este trabajo de investigación se utilizó el método de síntesis asistida por ultrasonido; se pesaron 0.5 g de 2,4-dihidroxiacetofenona y 0.4 g de hidróxido de sodio en una balanza analítica, en un mortero se colocaron los reactivos y se maceraron hasta triturar, se recuperó el producto del mortero agregando 5 ml de etanol para disolver, en un tubo de ensaye se colocó la mezcla y con una jeringa se agregó 0.334 ml de benzaldehído. La reacción se dejó en el baño del ultrasonido durante 3 horas con lapsos de 30 minutos a temperatura de 40 °C al finalizar el tiempo, este producto se deposita en un embudo de separación para su extracción y purificación con ayuda del acetato de etilo, ácido clorhídrico y agua destilada, se hicieron tres lavados con acetato de etilo y luego verificando que mantuvieran un pH de 6-7, se filtró la reacción y se evaporó el solvente en un equipo de rotavapor, por último se recristalizó con etanol. Para este método se hizo una segunda reacción la cual consistió únicamente en sustituir la 2,4-dihidroxiacetofenona por 2-dihidroxiacetofenona siguiendo el mismo procedimiento de la reacción anterior.

Microondas: Los equipos industriales de microondas utilizan una frecuencia de 2450 MHz, dicha frecuencia quiere decir que la polaridad en un campo de microondas cambia rápidamente el equivalente a 2.45 billones de veces por segundo, y también significa que presenta una longitud de onda de 12.24 cm. Lo cual le permite tener cierto grado de penetración, y en consecuencia esta longitud hace que salte objetos más pequeños y que no estén directamente en su trayectoria y esto se observe en ocasiones como un calentamiento desigual (Correa, 2011).

Aquí se utilizó este método de síntesis asistida por microondas: se pesa en una balanza analítica 0.4 g de hidróxido de sodio y se sitúa en el tubo de microondas, entonces se agrega 4ml de etanol, este se pone en una parrilla de agitación hasta disolver el hidróxido de sodio, se agrega 0.5 g de 2,4-dihidroxiacetofenona y por el último con la jeringa se vierte 0.334 ml benzaldehído, se somete al equipo de microondas focalizadas por dos lapsos de 5 min a 300 w, acabando este tiempo de espera el producto se colocó en un embudo de separación para la extracción y purificación con: acetato de etilo, ácido clorhídrico y agua destilada, se le hicieron tres lavados con acetato de etilo y se verificó que mantuviera un pH de 6-7, se filtró la reacción y se evaporó el solvente en un equipo de rotavapor, finalmente se recristalizó con etanol.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos de los espectros de infrarrojo se describen de la siguiente manera: (a) mecanosíntesis FTIR (ATR) (cm^{-1}): 3138 (OH), 1626 (C=C), 1600 (C=O). (b) SAU (Figura 3), FTIR (ATR) (cm^{-1}): 3327 (OH), 1550 (C=C), 1598 (C=O), 2973 (=CH), 1258 (C-H); de igual manera en el método de microondas plasmado en la Figura 5. Se encontró en el FTIR (ATR) (cm^{-1}): 3320 (OH), 1045 (C-O), como puede observarse en los espectros descritos previamente cada uno mostro diferentes resultados basados en la reacción mostrada en la Figura 1. Los cálculos para obtener la reacción se observan en la Tabla 1. En una segunda reacción realizada con el método de ultrasonido la cual se muestra en la Figura 2, y sus respectivos cálculos en la Tabla 2. Se obtuvo un rendimiento del 9%, un punto de fusión de 82°C. FTIR (ATR) (cm^{-1}): 3032 (OH), 1337 (C=O), 694 (aromático en posición orto), 737.59 (aromático disustituido en posición orto).

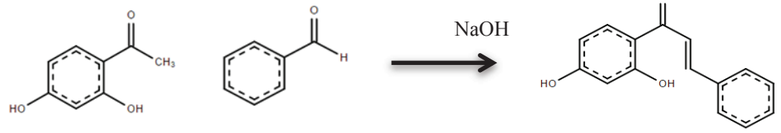


Figura 1. Reacción de síntesis de la 2,4-dihidroxichalcona.

Tabla 1. Cálculos para la reacción de 1-(2,4-dihidroxifenil)-3-fenil-1-propenona (2,4-DHch).

Compuesto	acetofenona	aldehído	catalizador	2,4-DHch
Peso molecular	152.15 g/mol	106.12 g/mol	40.0 g/mol	224.27 g/mol
Masa	1g	0.7003 g	0.584 g	1.4801 g
Mol	0.0066 mol	0.0066 mol	0.0146 mol	0.0066 mol

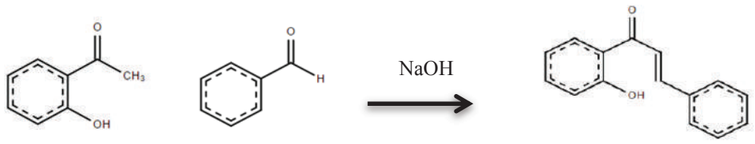


Figura 2. Reacción de síntesis de (2-chalcona.

Tabla 2. Cálculos para la reacción de 1-(2-hidroxifenil)-3-fenil-2-propen-1-ona (2-Hch).

Compuesto	acetofenona	aldehído	catalizador	2-Hch
Peso molecular	136.15 g/mol	106.12 g/mol	40.0 g/mol	224.27 g/mol
Masa	1g	0.7789 g	0.584 g	1.6372 g
Mol	0.0073 mol	0.0073 mol	0.0146 mol	0.0073 mol

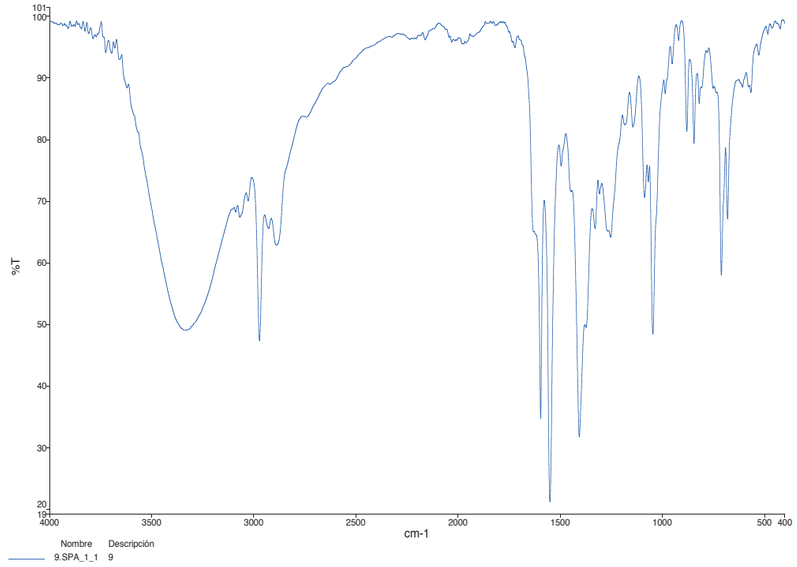


Figura 3. Espectro de infrarrojo de chalcona 2,4-DHch por SAU.

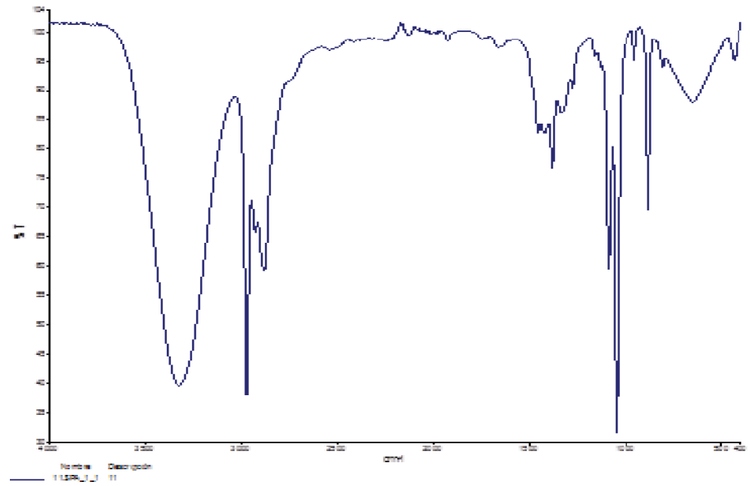


Figura 4. Espectro de infrarrojo de chalcona 2-Hch por SAU.

CONCLUSIONES

Con los métodos estudiados y puestos en práctica se concluye que el mejor método de química verde para la síntesis de compuestos organicos potencialmente bioactivos como las chalconas es el de ultrasonido, mediante la reacción numero dos que utiliza 2,dihidroxiacetofenona ya que fue el método más eficiente para la cristalización del producto.

Con la reacción uno y los métodos realizados, no fue posible sintetizar la chalcona ya que en la lectura de los espectros se muestran impurezas.

BIBLIOGRAFIA

Anastas, Paul T. y Mary M. Kirchhoff (2002) "Origins, Current Status, and Future Challenges of Green Chemistry",
Accounts of Chemical Research, 35, 686-694.

Correa Cuevas Laura P. y Hernández Baltazar Efrén (2011). "El uso de las microondas en la industria farmacéutica",
Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, 42, 4, 7.

Fernandez-Bertran, J. F. (1999) *Pure Applied Chemistry*, 71, 581-586.

Mason, T. J. (2000) *Chemistry Society Reviews*, 26, 223-451.

Meléndez Pizarro, Carmen O. y Camacho Dávila, Alejandro A. (2008) "Química Verde: la química del nuevo milenio",
Synthesis, 45, pp 3. Consultada en:
http://www.uach.mx/extension_y_difusion/synthesis/2008/10/21/quimica.pdf.

Mitchenko, S. A. (2007) *Theor. Experim. Chem.* 43, 211-228.

HELMINTOS DE *DIDELPHIS VIRGINIANA* (MAMMALIA: DIDELPHIDAE) EN ZACATECAS

Martínez-Flores Wendolyne[1] y Martínez-Salazar Elizabeth Aurelia[2]

RESUMEN

Durante el mes de julio del 2016, un ejemplar de un mamífero fue encontrado sin vida en un domicilio particular en el municipio de Zacatecas. Este ejemplar fue donado al Laboratorio de Colecciones Biológicas y Sistemática Molecular de la Unidad Académica de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Zacatecas para su estudio biológico. El marsupial didelfimorfo fue identificado como *Didelphis virginiana* y se procesó para un estudio helmintológico. Se encontró un total de 79 individuos nemátodos gastrointestinales que corresponden a dos especies de la familia Cruziidae y Physalopteridae, respectivamente. Posterior al procesamiento del material para su estudio taxonómico mediante microscopia óptica y revisión bibliográfica, se determinó que los especímenes corresponden a la morfología de *Cruzia americana* y *Turgida turgida*. Este es el primer reporte de helmintos parásitos para un marsupial didelfimorfo en el estado de Zacatecas.

ABSTRACT

During the month of July 2016, a specimen of a mammal was found lifeless in a private home in the city of Zacatecas. This specimen was donated to Laboratory Biological Collections and Molecular Systematics of the Academic Unit of Biological Sciences at the Autonomous University of Zacatecas for biological study. The didelphimorphian marsupial was identified as *Didelphis virginiana* and processed for helminthological study. A total of 79 individual gastrointestinal roundworms that corresponding to two species of Cruziidae and Physalopteridae family, respectively were found. After processing the material for taxonomic study by light microscopy and literature review, it was determined that the specimens correspond to the morphology of *Cruzia americana* and *Turgida turgida*. This is the first report of parasitic helminths for a didelphimorphian marsupial in the state of Zacatecas.

Palabras Clave: Nematoda, marsupial didelfimorfo, Biodiversidad taxonómica, Zacatecas.

INTRODUCCIÓN

México es considerado un país megadiverso, forma parte del pequeño grupo de países que poseen la mayor cantidad de diversidad de animales y plantas, en conjunto representan el 70 % de la diversidad mundial de especies. El estudio de la biodiversidad engloba todas las formas de vida (especies) que habitan el planeta, su variabilidad genética y ecosistémica de los que forman parte. Así mismo, incluye los procesos ecológicos y evolutivos que mantienen a las especies y ecosistemas (CONABIO, 2000). Los mamíferos son uno de los grupos más carismáticos y su diversidad taxonómica asciende a 564 especies de mamíferos silvestres en México lo cual representa el 10% de la diversidad mundial (Sánchez-Cordero *et al.,* 2014).

El género *Didelphis* (Mammalia: Didelphidae) o las llamadas zarigüeya son marsupiales del Nuevo Mundo con una amplia distribución geográfica que se extiende desde el sur de Canadá hasta el centro de

1 Unidad Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Zacatecas. Av. Preparatoria S/N, Campus Universitario II, Col. Agronómica, C.P. 98066. Zacatecas, Zacatecas. Matz_wen@hotmail.com

2 Laboratorio de Colecciones Biológicas y Sistemática Molecular, Unidad Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Zacatecas. Av. Preparatoria S/N, Campus Universitario II, Col. Agronómica, C.P. 98066. Zacatecas, Zacatecas. eamsuaz@gmail.com; eamsuaz@uaz.edu.mx

Argentina, desde el nivel del mar hasta por encima de los 3000m (Cervantes et al., 2010). En particular, la zarigüeya sudamericana (*Didelphis marsupialis*) y la zarigüeya norteamericana (*Didelphis virginiana*) son de las especies más reconocidas del género por su amplia distribución geográfica en el continente americano. Estas especies son consideras generalistas y oportunistas, con un comportamiento eurieco, e inclusive se presentan en áreas antropogénicas (Ceballos y Oliva, 2005), los individuos de estas especies pueden dispararse a través de grandes distancias en corto tiempo y pueden tener una dieta amplia, estas características le han permitido ser un grupo exitoso que se ubica en grandes áreas de su distribución geográfica (Cruz-Salazar *et al.,* 2014).

Didelphis virginiana se distribuye geográficamente desde el sur Canadá a través de los Estados Unidos y México, hasta Costa Rica (Gardner, 1982) y debido a sus características biológicas está especie ha sido objeto de estudios helmintológicos en América del Norte (Ej. Alden, 1995) y en México (Ej. Monet-Mendoza et al., 2005). De la fauna helmintológica registrada en *Didelphis* destaca la presencia de los nemátodos (García-Prieto et al. 2012).

Los helmintos son un grupo de invertebrados no relacionados filogenéticamente pero mantienen una forma de vida en común, el parasitismo (Marcogliese, 2004). Estos organismos parásitos de forma vermiformes son abundantes en la naturaleza y están representados por cuatro phyla: Platyhelminthes, Acanthocephala, Nematoda y Annelida (Pérez-Ponce y García-Prieto, 2001).

En el phylum Nematoda es uno de los grupos más diversificados que pueden alojarse en vertebrados (habitan casi cualquier órgano), invertebrados y plantas, así como especies de vida libre (Hugot *et al.,* 2001). Estos organismos son triploblásticos, protostomados, blastocelomados, bilaterales y cilíndricos de tamaño variable (milímetros hasta más de 8 metros) (Hugot *et al.,* 2001; García-Prieto, et al., 2014).

Un ejemplar de un mamífero fue encontrado sin vida en un domicilio particular en el municipio de Zacatecas, y este fue donado al Laboratorio de Colecciones Biológicas y Sistemática Molecular de la Unidad Académica de Ciencias Biológicas (UACB) de la Universidad Autónoma de Zacatecas (UAZ) para su estudio biológico. El objetivo de este trabajo en particular, fue a partir de un estudio parasitológico de rutina conocer la diversidad taxonómica de helmintos parásitos gastrointestinales encontrados en el ejemplar mencionado y contribuir con el conocimiento helmintológico de vertebrados silvestres en el estado de Zacatecas.

MÉTODOS Y MATERIALES

El estado de Zacatecas (=*Zacatl* 'junco, hierba' y *co* 'lugar': 'Donde abunda el zacate'), se localiza en la parte centro-norte de la República Mexicana, el municipio de Zacatecas presenta un clima seco y semiseco, con una precipitación media estatal es de 510 mm anuales, las lluvias se presentan en verano en los meses de junio a septiembre y con presencia de matorrales (INEGI, 2016).

Durante el mes de julio del 2016, un ejemplar de un mamífero marsupial didelfimorfo fue encontrado sin vida en un domicilio particular en el municipio de Zacatecas. Este ejemplar fue donado por un particular al Laboratorio de Colecciones Biológicas y Sistemática Molecular de la Unidad Académica de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Zacatecas para su estudio biológico. El espécimen se mantuvo en refrigeración hasta su estudio helmintológico.

Se realizó la disección del organismo y se revisó todos los órganos internos, los helmintos se procesaron siguiendo los protocolos descritos por Lamothe (1997) y depositaron en viales con alcohol al 70%, hasta su montaje y análisis morfológico.

Para el análisis morfológico, los helmintos se montaron en preparaciones semi-permitentes en Glicerina marca Karal, posterior a su aclarado, se observaron mediante microscopia de luz. Para la identificación

morfológica se obtuvo datos morfométricos de los individuos, se utilizó microscopio óptico binocular equipado con un ocular micrométrico Labomed CZM6, se usó claves taxonómicas y literatura especializada para su correspondiente identificación (Anderson, 2000).

El mamífero fue procesado e identificado como *Didelphis virginiana* (Figura 1), este se depositó en la Colección de Vertebrados en la sección de mamíferos (CVZ) que se encuentran albergadas en el Laboratorio de Colecciones Biológicas y Sistemática Molecular de la Unidad Académica de Ciencias Biológicas (UACB) de esta institución. Mientras que los helmintos se depositaron en la Colección de invertebrados no Artrópodos respectivamente (CINZ), de esta misma institución.

Finalmente, se tomaron fotomicrografías a través de un microscopio estereoscópico marca labomed LUXEO 4.0 con cámara integrada y se contabilizaron los helmintos recolectados acorde la especie previamente identificada para su análisis ecológico (Margolis *et al.,* 1982).

Figura 1. *Didelphis virginiana*, vista dorsal. Depositado en la Colección de Vertebrados (CVZ), albergada en la UACB-UAZ (Foto: Elizabeth A. Martínez-Salazar).

RESULTADOS

Se recolectó un total de 79 especímenes encontradas en el tracto gastrointestinal de un *Didelphis marsupialis*. Posterior al análisis morfológico y contrastación con la bibliografía, se determinó que el material biológico corresponde a un grupo taxonómico de helmintos parásitos de la clase Nematoda pertenecientes a dos especies de la familia Cruziidae con *Cruzia americana* y Physalopteridae con *Turgida turgida*, respectivamente (Figura 2). De las dos especies de nematodos gastrointestinales, *T. turgida* es la especie más abundante (Tabla 1).

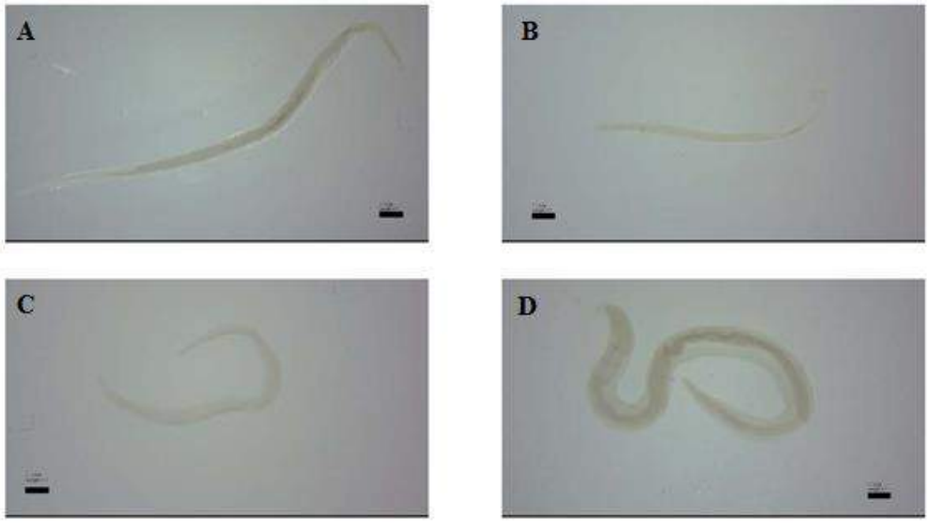


Figura 2. Helmintos de Didelphis virginiana. A y B. Cruzia americana: Hembra (superior izquierda) y Macho (superior derecha). C y D. Turgida turgida Hembra (inferior izquierda) y Macho (inferior derecha). Se muestra la escala en cada figura que equivale a 1 mm (Foto: Wendolyne Martínez-Flores).

Tabla 1. Caracterización de la infección del ejemplar Didelphis virginiana.

Helminto	Prevalencia (%)	Abundancia	Ciclo de vida (Anderson, 2000)
C. americana	100	23	Directo
T. turgida	100	56	Indirecto

Los ejemplares que corresponden con la morfología de *C. americana* se caracterizan por ser gusanos rectos, de cuerpo blando y grueso, la boca está rodeada por tres labios triangulares, y presenta once pares de papilas caudales; tres pre-cloacal, tres cloacales y cinco pares de post-cloacales, los post-cloacales están dispuestos dos laterales y tres pares ventrales (Crites, 1956). Mientras que *T. turgida* se caracteriza por ser un gusano grande, el ancho del cuerpo se ensancha gradualmente, la apertura oral está formada por dos labios y un pseudolabio compuesto por tres labios fusionados que son aplanados internamente, posee una cutícula estriada y presentan 22 papilas caudales (Humberg *et al*, 2011).

Cruzia americana se encuentra en el ciego pero puede desplazarse a otras secciones del tracto intestinal y *T. turgida* es un parásito del estómago. Se conoce poco sobre los ciclos de vida de estas especies, basado en la literatura *C. americana* es de ciclo de vida directo (no requiere de algún hospedero intermediario para llegar a su hospedero definitivo, y se ha reportado como parásito de género *Didelphis* (Adnet et al., 2009). Mientras que *T. turgida* se ha reportado en varias especies de mamíferos como huésped definitivo (Ej. especies de los géneros *Didelphis* y *Philander*) en el que los adultos viven unidos a la pared del estómago, los insectos del orden Orthoptera y Coleoptera son los huéspedes intermediarios de este nemátodo (Anderson, 2000; Gray y Anderson, 1982).

Ambas especies de helmintos se han registrado previamente como parásitos de *Didelphis virginiana*; *C. americana* se ha reportado previamente en los estados de Colima, Guerrero y Oaxaca, mientras que *T. turgida* es un nemátodo distribuido en Campeche, Colima, Chiapas, Ciudad de México, Estado de México, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Tabasco, y Veracruz (Acosta-Virgen et al., 2015; García-Prieto et al., 2012). El conocimiento de la fauna helmintológica de *D. virginiana* en México asciende a 28 especies, donde en su mayoría predomina la fauna Nematoda, y hasta este estudio, no se tenía conocimiento de trabajos científicos publicados de helmintos de marsupiales en Zacatecas.

CONCLUSIONES

Como resultado de la investigación, se recobran dos especies de nemátodos característicos del género *Didelphis*, de los cuales *T. turgida* es la especie más abundante. Se adicionan nuevos registros de esta fauna para el estado y de nuevo registro de localidad para cada especie. Este es el primer estudio helmintos parásitos para un marsupial didelfimorfo en el estado de Zacatecas.

BIBLIOGRAFÍA

ACOSTA-VIRGEN, K., LÓPEZ-CABALLERO, J., GARCÍA-PRIETO, L., Y MATA-LÓPEZ, R. (2015). “Helminths of three species of opossums (Mammalia, Didelphidae) from Mexico” en *ZooKeys*, Núm 511 [pp. 131-152].

ADNET, F., ANJOS D., MENEZES-OLIVEIRA, A. Y LANFREDI, R. (2009). *Further description of Cruzia tentaculata* (Rudolphi, 1819)

ALDEN, K. J. 1995. “Helminths of the opossum, *Didelphis virginiana*, in Southern Illinois, with a compilation of all helminths reported from this host in North America” en *Journal of the Helminthological Society of Washington*. Núm 62, [pp. 197-208].

ANDERSON, R.C. (2000) *Nematode Parasites of Vertebrates. Their Development and Transmission*. CABI Publishing, Wallingford, UK, 650 pp.

CEBALLOS, G. Y OLIVA, G. (2005). *Los mamíferos silvestres de México*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad: Fondo de Cultura Económica. México, D. F. 986 p.

CERVANTES, A. F., ARCANGELI, J., HORTELANO-MONCADA, Y. Y. BORINSEKO, A. V. (2010). “DNA barcodes effectively indentify in the morphologically similar Common Opossum (*Didelphis marsupialis*) and Virginia Opossum (*Didelphis virginiana*) from area of sympatry in Mexico” en *Mitochondrial DNA*. S1, Vol. 21 [pp. 44-50].

CONABIO. (2000). Estrategia nacional sobre biodiversidad de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, D.F.

CRITES, J. L. (1956). “A redescription of *Cruzia americana,* a nematode parasitic in the opossum, *Didelphis marsupialis virginiana*” en *Journal of Parasitology*, Núm. 42, Vol. 1, [pp. 68-72].

CRUZ-SALAZAR, B., RUIZ-MONTOYA, L., NAVARRETE-GUTIÉRREZ, D., ESPINOZA-MEDINILLA, E. E., VÁZQUEZ-DOMÍNGUEZ, E., Y L.B VÁZQUEZ. (2014). “Diversidad genética y abundancia relativa de *Didelphis marsupialis* y *Didelphis virginiana* en Chiapas, México” en *Revista mexicana de biodiversidad*, Núm. 85, Vol. 1, [pp. 251-261].

GARCÍA-PRIETO, L., FALCÓN-ORDAZ, J., Y GUZMÁN-CORNEJO, C. (2012). "Helminth parasites of wild Mexican mammals: list of species, host and geographical records" en Zootaxa. Núm. 3290, [pp. 1-92].

GARCÍA-PRIETO, L., OSORIO-SARABIA, D., Y LAMOTHE-ARGUMEDO, M. R. (2014). "Biodiversidad de Nematoda parásitos de vertebrados en México" en *Revista mexicana de biodiversidad*. Núm. 85, [pp. 171-176].

GARDNER, A. L. (1982). "Virginia opossum (*Didelphis virginiana*)" en J. A. Chapman and G. A. Feldhamer (eds.). *Wild mammals of North America*, John Hopkins University Press, Baltimore, Maryland, [pp. 3-36].

GRAY, J. B., Y ANDERSON, R. C. (1982). "Observations on *Turgida* (Rudolphi, 1819) (Nematoda: Physalopteroidea) in the american opossum (*Didelphis virginiana*)" en *Journal of wildlife diseases*. Núm. 18, Vol. 3, [pp. 279-285].

HUMBERG, R. M., TAVARES, L. E. R., PAIVA, F., OSHIRO, E. T., BONAMIGO, R. A., T JÚNIOR, N., Y OLIVEIRA, A. G. (2011). "*Turgida turgida* (Nematoda: Physalopteridae) parasitic in white-bellied opossum, *Didelphis albiventris* (Marsupialia: Didelphidae), state of Mato Grosso do Sul, Brazil" en *Pesquisa Veterinária Brasileira*. Num 31, Vol. 1, [pp. 78-152].

HUGOT, J. P., BAUJARD, P., Y MORAND, S. (2001). "Biodiversity in helminths and nematodes as a field of study: an overview" en Nematodology. Núm. 3, [pp. 199-208].

LAMOTHE-ARGUMEDO, R. (1997). Manual de técnicas para preparar y estudiar los parásitos de animales silvestres. A.G.T. Editor, México D.F., 43 pp.

MARCOGLIESE, D. J. (2004). "Parasites: small players with crucial role in the ecological heater" en *EcoHealth*. Núm. 1, [pp. 151-154].

MARGOLIS, L., ESCH, G. W., HOLMES, J. C., KURIS, A. M,. Y SCHAD G. A. (1982). "The use of ecological terms in parasitology (report on an ad hoc committee of the American Society of Parasitologists)" en *The Journal of Parasitology*. Núm. 68, Vol. I, [pp. 131-133].

MONET-MENDOZA, A, OSORIO-SARABIA, D., Y GARCÍA-PRIETO, L. (2005). "Helminths of the Virginia Opossum *Didelphis virginiana* (Mammalia: Didelphidae) in Mexico" en *Journal of Parasitology*. Núm. 91, [pp. 213-219].

PÉREZ-PONCE DE LEÓN, G., Y GARCÍA-PRIETO, L. (2001). "Diversidad de helmintos parásitos de vertebrados silvestres de México" en *Biodiversitas*, Núm. 37, [pp. 7-11].
SÁNCHEZ-CORDERO, V., BOTELLO, F., FLORES-MARTÍNEZ, J. J., GÓMEZ-RODRÍGUEZ, R. A., GUEVARA, L., GUTIÉRREZ-GRANADOS, G. Y RODRÍGUEZ-MORENO, A. (2014). "Biodiversidad de Chordata (Mammalia) en México" en *Revista Mexicana de Biodiversidad*. Supl. 85, [pp. 496-504].

AISLAMIENTO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS CON POTENCIAL BACTERIOCINOGÉNICO A PARTIR DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN DE AGUAMIEL

Luis Arturo Medina Abrego[1] y Adriana Carolina Flores Gallegos[2]

RESUMEN

En México, así como en el resto del mundo, el interés por el tema de inocuidad de los alimentos ha ido creciendo de manera importante debido al impacto que tiene sobre la salud de la población. Esta situación, en conjunto con la preocupación del consumidor sobre el efecto de la dieta en su salud ha incrementado la demanda de alimentos mínimamente procesados con la menor cantidad de aditivos químicos y con un elevado valor nutricional. Como una tecnología innovadora para la conservación de la inocuidad y la calidad alimentaria, en la presente propuesta se planteó el uso de sistemas biológicos antimicrobianos, específicamente bacterias ácido-lácticas (BAL) aisladas a partir del aguamiel, para el control de dos patógenos transmitidos por alimentos (*E.coli* y *Salmonella enterica*) empleando el método de difusión en agar.

ABSTRACT

In Mexico, as on the rest of the world, the interest infood safety has increased on a significant way, because of its impact in the sector of public health. This situation together with the consumer concern about the effect on their diet, has increased the demand of minimally processed food with the minimalquantity of chemical additives and a higher nutritional value. As an innovative technology for the conservation of food safety and in a way to preserve their good quality, in this approach theuse of a biological antimicrobial systemwas proposed, specifically lactic-acidbacteria (LAB) isolated from aguamiel,for the control of two pathogenstransmitted in aliments (*E.coli* and *Salmonella enteric*) using the method of agar diffusion.

Palabras clave: bacteriocinas, inhibición, aguamiel, bacterias ácido-lácticas, patógenos.

INTRODUCCIÓN

El aguamiel es una savia obtenida a partir del maguey pulquero, una planta de origen mexicano perteneciente al género *Agave.* Esta savia puede emplearse para consumo pues es rica en carbohidratos, minerales, proteínas y gomas (Ortiz-Basurto y col*.,* 2008) y además es el ambiente natural de un gran número de microorganismos, principalmente levaduras y bacterias (Lappe-Oliveras y col*.,* 2008). Esta bebida es un recurso poco valorado y conocido en México, siendo su principal uso como materia prima para la obtención del pulque a través de un proceso de fermentación espontánea. En contraste, el pulque es una bebida artesanal mexicana mayormente conocida ya que ha sido empleada desde épocas prehispánicas como bebida medicinal, ritual o simplemente como bebida alcohólica (Godoy y col*.,* 2003).

A la fecha existen algunos estudios de la microbiología del aguamiel, encontrando la presencia de un gran número de bacterias principalmente de los géneros *Lactobacillus, Leuconostoc, Sarcina, Bacillus,*

[1] Universidad Autónoma de Zacatecas, Unidad Académica de Ciencias Químicas; Campus UAZ siglo XXI, carr. Guadalajara Km 6, Ejido la Escondida, C.P. 98160, Zacatecas, Zac., luart70@gmail.com
[2] Universidad Autónoma de Coahuila, Facultad de Ciencias Químicas Unidad Saltillo, Departamento de Investigación en Alimentos; Blvd. Venustiano Carranza y José Cárdenas, Col. República Oriente, C.P. 25280, Saltillo, Coahuila., carolinaflores@uadec.edu.mx

Acetobacter, entre otros (García-Garibay y col., 2004). Es por ello, que en la presente propuesta se plantea explorar el potencial biotecnológico de las bacterias ácido-lácticas aisladas del aguamiel.Las bacterias ácido lácticas (BAL)se definen comouna clase funcional que designa un grupo heterogéneode bacterias Gram positivas, no patógenas, notoxigénicas, fermentadoras, caracterizadas por producirácido láctico a partir de carbohidratos, lo que las hace útiles como cultivos iniciadores para la fermentaciónde alimentos. Comparten otros rasgos comunescomo son que no forman esporas, no reducenel nitrato y no producen pigmentos.

La industria alimentaria ha desarrollado la aplicación de **bacteriocinas**, producto del metabolismo secundario de algunas BAL en la conservación de los alimentos. Las bacteriocinas son moléculas que tienen estructura tipo péptido o proteína biológicamente activas, las cuales presentan acción bactericida sobre receptores específicos de las células; además, la composición química de estas sustancias es muy variada y su modo de acción específico (Vázquez y col., 2009; Stoyanova y col., 2012).Las bacteriocinas que producen las BAL han sido ampliamente estudiadas por su actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas tales como *Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Clostridium botulinum y Salmonella,* entre otras (Holo y col., 2001; Vázquez y col., 2009).

Éstas presentan distintas ventajas: 1) se encuentran fácilmente en BAL comerciales (lactococos, lactobacilos, pediococos), 2) son consideradas seguras para su consumo, 3) no son tóxicas para las células eucariotas y 4) presentan un espectro de inhibición más amplio en comparación con los espectros de las bacteriocinas sintetizadas por bacterias Gram negtaivas (Nes y col., 2007). Debido a estas razones, las bacteriocinas se han convertido en un campo importante de investigación y estudio en los últimos 25 años y las hasta ahora reportadas sólo representan una pequeña fracción de la diversidad existente, por lo que la continua investigación conducirá a la obtención de antimicrobianos diversos, de un amplio espectro que puedan ser incorporadas como ingredientes seguros en alimentos para asegurar la inocuidad y calidad alimentaria (Snyder y Worobo, 2013). Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, en el presente proyecto se evaluó la capacidad de BAL aisladas del aguamiel para inhibir el crecimiento y desarrollo de agentes patógenos que son transmitidos por alimentos.

MÉTODOS Y MATERIALES

1.- Aislamiento e identificación de bacterias del ácido láctico procedentes del aguamiel.

Se aislaron bacterias ácido-lácticas provenientes de la fermentación del aguamiel del Ejido Las Mangas, municipio de Saltillo; dicho producto fue proporcionado por el Departamento de Investigación en Alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas de la UAdeC. El aislamiento se realizó homogenizando la muestra y se tomaron 20 µL para ser inoculado en agar Man Rogosa Shape o MRS que se encontraba esterilizado previamente. Se incubó a 30 °C por 24 horas a 150 rpm. Se realizó la observación macroscópica y microscópica de las colonias crecidas, donde se trató de identificar todas sus características principales como respuesta a tinción de Gram, forma, su tipo de agrupación, tamaño y si era formadora o no de esporas.

2.- Capacidad antimicrobiana de las bacterias ácido-lácticas contra patógenos transmitidos por alimentos.

Según lo descrito por Todorov y Dicks (2005) se determinó la actividad antimicrobiana por el método de difusión en agar. Los aislamientos obtenidos anteriormente se crecieron en caldo MRS y se incubaronpor 18 horas a 30 °C y 150 rpm; posteriormente setomó una muestra de 300 µLy se midióla densidad óptica (DO) a una longitud de onda de 600 nm, en microplaca.De éstos, se tomaron alícuotas de 50 µL para inocular en caldo MRS (inóculo=1 % v/v) para incubar nuevamente por 24 h, bajo las mismas condiciones. Al término de dicho tiempo, se tomaron 2 mL por triplicado de cada muestra y se pasaron a tubos Ependorf de 2 mL para luego ser centrifugados a 4 °C y a 10, 000 x g durante 15 minutos. El

sobrenadante fue recuperado en 8 tubos Falcon estériles, debido a que fueron 8 las diferentes muestras de BAL que se utilizaron para ver su comportamiento ante la inhibición del patógeno (ver tabla 1). Los sobrenadantes fueron tratados con NaOH 1 N estéril para ajustar el pH a 6.0.

Por otro lado, se prepararon cultivos de dos patógenos transmitidos por alimentos: *E. coli*(6) y *Salmonella entérica* (9). Estos cultivos se ajustaron a 1 x 10^6 células/mL para inocular las placas en las que se realizarían las pruebas de inhibición. Se prepararon placas de agar nutritivo en las que se cortaron pozos de aproximadamente 5 mm de diámetro (tres por caja), en las cuales se sembraron los patógenos correspondientes. En cada uno de los pozos se colocaron 50 µL del extracto libre de células de las diferentes cepas bacterianas a evaluar y se incubó por 18 h a 37 °C. Al término de este tiempo, se procedió a medir los halos de inhibición. Las pruebas se realizaron por duplicado y se empleó medio MRS como control del experimento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.- Aislamiento e identificación de bacterias del ácido láctico procedentes del aguamiel.

Se evaluó la morfología macro y microscópica de los microorganismos corroborando su previa identificación, como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Bacterias Ácido Lácticas utilizadas para inhibir crecimiento de patógeno.

Clave	Nombre de la bacteria	Descripción microscópica
2M3	*Lactobacillus plantarum*	Bacilos gram positivos
2M7	*Leuconostoc fallax*	Cocobacilos gram positivos
2M2	*Lactobacillus casei/paracasei/rhamnosus*	Bacilos gram positivos
2M10	*Acetobacter syzygii/ghanensis*	Bacilos gram negativos
3M3	*Bacillus cereus*	Bacilos gram positivos
3M8	*Lactococcus lactis*	Cocos gram positivos en cadenas cortas
4A4	*Bacillus sp.*	Bacilos gram positivos
Calabaza	*Enterococcus faecium*	Cocos gram positivos en cadena

2.- Capacidad antimicrobiana de las bacterias ácido-lácticas contra patógenos transmitidos por alimentos.

Los cultivos de las BAL en el medio MRS mostraron una disminución del pH inicial (pH 6.0) hasta valores de 3-4. Esta disminución en el pH es resultante del metabolismo de estos microorganismos, los cuales emplean los azúcares presentes en el medio para la producción de ácidos grasos de cadena corta tales como el ácido láctico, fórmico, butírico, entre otros. Debido a que esta disminución en el pH de los extractos podría ser la responsable de la inhibición del patógeno, el pH fue ajustado a 6.0.

Tabla 2) Cambios de pH en los medios de las diferentes BAL.

Muestra	pH
2M3	3-4
2M7	4-5
3M3	3-4
3M8	5-6
2M2	3-4

2M10	5-6
4A4	5-6
Calabaza	5-6

- *Selección de los patógenos a utilizar para inhibirlos por las bacteriocinas.*

Se emplearon dos bacterias patógenas transmitidas por alimentos: *Escherichia coli (6)* y *Salmonella entérica* (9), para evaluar su inhibición empleando extractos crudos de bacteriocinas producidas por las BAL evaluadas obteniendo que existieron algunos halos de inhibición en las placas marcadas con el número 9, que corresponde a *Salmonella enterica*, siendo las cepas de calabaza y 4A4 las que pudieron haber inhibido el crecimiento del patógeno. Sin embargo, en un experimento realizado previamente en donde los halos de inhibición fueron evaluados no a 18 horas, sino a 12 horas, las cepas con las claves calabaza, 4A4, 3M3 y 2M2 inhibieron el crecimiento del patógeno. Estos resultados se compararon con los reportes existentes en la base de datos BACTIBASE respecto a la producción de bacteriocinas por las BAL empleadas (Tabla 3).

Tabla 3.Inhibición de patógenos por BAL evaluadas y posibles bacteriocinas producidas, según los reportes de BACTIBASE.

Clave	Nombre del microorganismo	Posibles bacteriocinas producidas	Organismos objetivos reportados	Inhibición de *Salmonella enterica*		Inhibición de *E. coli*	
				R1	R2	R1	R2
2M2	*Lactobacillus casei / paracasei / rhamnosus*	Plantaricinas K, F, W α, W β	*Lactobacillus casei Lactobacillus sp.*	1.0 cm	-	0.7 cm	1.0 cm
2M3	*Lactobacillus plantarum*	Plantaricinas A, E, F, J, S α, S β, C19, NC8 α, NC8 β, 423, W α, W β, 1.25 β, ASM1, 163 y Glycocin F	Especies de *Lactobacillus*	-	1.0 cm	1.2 cm	1.0 cm
2M7	*Leuconostoc fallax*	-	-	0.8 cm	Irregular	0.6 cm	0.7 cm
Calabaza	*Enterococcus faecium*	-	-	0.1 cm	0.7 cm	-	-
3M8	*Lactococcus lactis*	-	-	-	-	Irregular	0.7 cm
4A4	*Bacillus sp.*	-	-	1.2 cm	1.0 cm	0.9 cm	1.5 cm
3M3	*Bacillus cereus*	-	-	1.3 cm	Irregular	1.1 cm	1.5 cm

CONCLUSIÓN

Con base en los resultados obtenidos, se observó que a las 12 h se logró la inhibición de *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* previo al ajuste del pH a 6.0por cepas de *Lactobacillus, Bacillus* y *Enterococcus faecium*. En contraste, a las 18 h no se presentaron halos de inhibición en ninguna de las placas, aunque se observó un halo con menor crecimiento en contraste con el resto de la placa inoculada. Por lo tanto, se sugiere una lectura anticipada a las 12 horas así como la revisión del tamaño del inóculo empleado en las pruebas para comprobar la inhibición de estos patógenos por las BAL empleadas.Un mayor conocimiento de los mecanismos responsables de esta inhibición permitirá el desarrollo de nuevas metodologías de bioconservación de alimentos, que aseguren su calidad e inocuidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Artículos de libros

Fernández Villa K. J., Chanci Echeverri I. C., Wilches López L., Cardona Arias J. A.; *"Caracterización de los metabolitos de bacterias ácido lácticas y efecto inhibidor de las bacteriocinas en microorganismos patógenos en alimentos: Revisión sistemática de la literatura, 2008-2012"*. Biosalud, Vol. 13 No. 1, enero-junio 2014, págs. 47-63, Colombia.

Paula M O'Connor, R Paul Ross, Colin Hill and Paul D Cotter; *"Antimicrobial antagonists against food pathogens: a bacteriocin perspective"*, 2015, Ireland.

Todorov, S.D., Dicks, L.M.T. 2005a. *Lactobacillus plantarum* isolated from molasses produces bacteriocins active against Gram-negative bacteria. Enzyme and Microbial Technology. 36: 318-326.

Todorov, S.D., Dicks, L.M.T. 2005b. Characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from spoiled black olives. J. Basic Microbiol. 45 (4): 312-322. DOI: 10.1002/jobm.200410532

Xiraphi, N., Georgalaki, M., Rantsiou, K., Cocolin, L., Tsakalidou, E., Drosinos, E.H. 2008. Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* E131. Meat Science, 80: 194-203.

Joshi, V.K., Sharma, S., Rana, N.S. 2006.Production, Purification, Stability and Efficacy of Bacteriocin from Isolates of Natural Lactic Acid Fermentation of Vegetables. *Food Technology* and *Biotechnology.*44 (3): 435-439.

Artículos de revistas

Ramírez Ramírez J. C., Rosas Ulloa P., Velázquez González M. Y., Armando Ulloa J., Arce Romero F.; *"Bacterias lácticas: importancia en alimentos y sus efectos en la salud"*.

Beristain-Bauza, Palou E., López-Malo A.; *"Bacteriocinas: antimicrobianos naturales y su aplicación en los alimentos"*. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos 6-2 (2012): 64-78, Universidad de las Américas Puebla, México.

Sánchez Lilian, Tromps Jeannette; *"Caracterización in vitro de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico"*.Rev. Salud Animal Vol. 36 No. 2 (2014): 124-129, Venezuela.

LISTADO PRELIMINAR DE AVIFAUNA EN LA COMUNIDAD DE EL GARBANZO, CUENCA BAJA DEL RÍO TEMASCATÍO, IRAPUATO, GUANAJUATO, MÉXICO

Karen Neftalí Méndez González[1] y Efrén Martín Hernández Navarro[2]

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue realizar un listado preliminar de la avifauna en la comunidad "El Garbanzo", municipio de Irapuato, Guanajuato, para reflejar el valor ecológico y conservación de la zona. El registro se llevo a cabo mediante dos técnicas, observación directa y captura en redes de niebla en un estudio prospectivo. Se registraron 32 especies, de las cuales dos especies son semiendémicas de México (*Cynanthus latirostris y Phainopepla nitens),* a *(Anas platyrhynchos diazi)* registrada en la NOM-059- SEMARNAT-2010, como amenazada y seis especies consideradas de importancia económica en el país. Los resultados muestran el potencial ecológico del sitio, sin embargo es necesario completar el listado para poder influir en la toma de decisiones futuras enfocadas a la conservación.

ABSTRACT

The objective of this study was to perform a preliminary list of bird life in the community "El Garbanzo" in the city of Irapuato, Guanajuato in order to reflect the ecological value and the conservation state of the area. The registration was carried out through the use of two techniques, direct observation and capture using mist nets in a prospective study. 32 species were reported, of which two species are semi endemic of México (Cynanthus latirostris and Phainopepla nitens), a (Anas platyrhynchos diazi) registered in the NOM-059- SEMARNAT-2010 as a threatened and six species considered of economic importance in the country. The results show ecological potential of the site, however it's necessary to complete the listing in order to influence future descision making focused on conservation.

Palabras clave: Avifauna, Listado de especies, riqueza.

INTRODUCCIÓN

Los estudios avifaunístico en regiones especificas son fundamentales al contribuir en la comprensión de patrones de distribución espacial y temporal de las aves, por lo que las listas de especies generadas de estos estudios reflejan el valor ecológico y sirven de comparación entre diferentes sitios (Balmer, 2002). En México residen un total de entre 1123 y 1150 especies de aves, colocando al país en el onceavo lugar por su riqueza avifaunística entre los países megadiversos y el cuarto en proporción de especies endémicas (Navarro-Sigüenza *el al.* 2014). La biodiversidad avifaunística en México se debe a su posición entre dos regiones biogeografías Neárticas y Neotropical (Halffter *et al.* 2008) y su compleja orografía que producen un mosaico de condiciones ecológicas y geografías, donde distintos procesos de especiación han originado la existencia de un vasto número de especies totales y endémicas (Navarro-Sigüenza et al. 2014).

En Guanajuato se cuenta con 366 especies de aves, ubicándose en la posición veintidós en cuanto a la riqueza de especies del país (Gurrola *et al*., 2012). En el estado la perturbación de hábitats se ha presentado principalmente por acciones antropogenicas, reflejando una pérdida próximada al 75% de

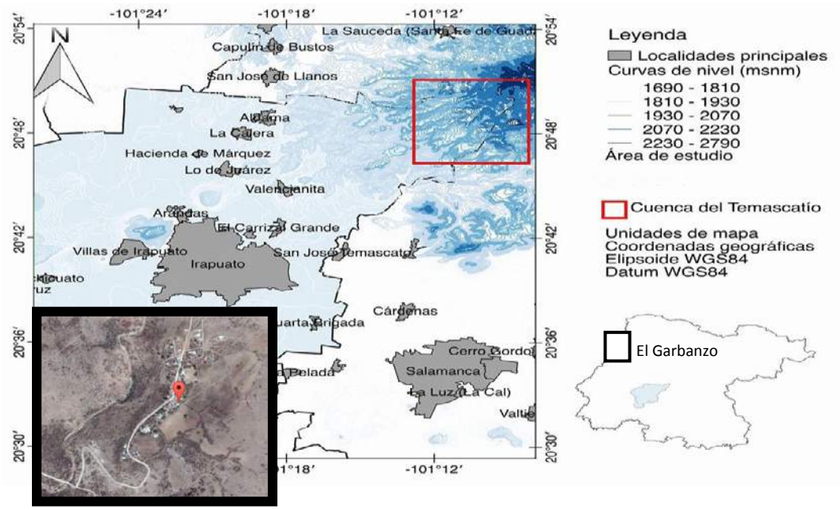
[1] Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Facultad de Medicina. Avenida Venustiano Carranza 2405, Los Filtros. C.P. 78210, San Luis Potosí, S.L.P. Correo electrónico: nefpocas@gmail.com
[2] Estación Biológica. Instituto Tecnológico Superior de Irapuato col. El copal C.P. 36821, Irapuato Guanajuato. México. Correo electrónico: efhernandez@itesi.edu.mx

vegetación nativa (Lozoya y Uriarte 2012) que contribuye en la fragmentación de hábitats, resultando en una pérdida de especies (Martínez-Morales 2005). Situación que podría empeorar por el crecimiento acelerado de la ciudad, por ello es imprescindible llevar a cabo acciones orientadas a la conservación de la biodiversidad en aquellas zonas donde aun se aprecian rasgos de la vegetación original (Escobedo *et al.,* 2015) y aunque fragmentadas, las pequeñas áreas podrían contener una amplia diversidad (Bodin et al.2006). El objetivo de este estudio es realizar un listado preliminar de avifauna en la comunidad "El Garbanzo", municipio de Irapuato, Guanajuato, que pueda evaluar que tan conservada esta la zona, como un paso inicial de monitoreo dentro de planes futuros de manejo que permitan detectar cambios con respecto a riqueza y abundancia y probar que pequeñas áreas pueden albergar diversidad importante.

Área de estudio

La comunidad "El Garbanzo" (Figura 1) se encuentra dentro de la Cuenca baja del Río Temascatío en el municipio de Irapuato, Guanajuato (20° 47'59.8"N, 101° 10'27.5") a 2030 msnm. En la región el clima es sub-húmedo, que hacia el poniente pasa a semi-cálido y hacia el norte a semi-seco (INAFED 2003). Los principales tipos de vegetación son: bosque de encino (*Quercus)*, bosque tropical caducifolio, matorral xerófilo y pastizal, con enclaves de bosques mésofilo de montaña y bosques de galería (Rzedowski 1978).

Figura 1. Ubicación de la cominidad "El Garbanzo" dentro de la Cuenca Baja del Río Temascatío en Irapuato, Guanajuato



MÉTODOS Y MATERIALES

Registro de aves

En este estudio se realizó una salida prospectiva con duración de 4 días en el mes de junio del 2016. Las técnicas de registro fueron la observación directa y captura en redes de niebla (Ralph et al. 1996). Los muestreos se realizaron durante el amanecer y antes del crepúsculo en horarios variados a paso lento, en espacios de vegetación cerrada y abierta. Para las observaciones directas se utilizaron binoculares (10 x 50) y una cámara para el registro digital, para corroborar su correcta identificación, y se utilizó la guía de Howell y Webb 1995, se consideraron 2 estaciones principales para los registros (la laguna y la zona

habitada de la comunidad) y partes del trayecto de estación a estación. El registro se complemento con 4 redes de niebla de 6 x 2.5 m, colocadas en diferentes estaciones por dos días cerca de la "Laguna del Galgo", se revisaron gradualmente para evitar daños en las aves capturadas, de las cuales se evaluó su estado reproductivo y físico y posteriormente se liberaron. Para verificar y ampliar la información, posterior a la salida de campo se siguió el orden taxonómico de American Ornitologists' Union (AOU 2010), los nombres comunes y tipos de endemismo, así como la distribución para Guanajuato, se tomaron principalmente de CONABIO 2013 y Escalante et al. 2014.

RESULTADOS

Se registraron 8 órdenes, 24 familias, 32 géneros y 32 especies de las cuales 4 fueron capturadas: chivirín saltapared (*Tryomanes bewickii),* colibrí pico ancho *(Cynanthus latirostri)s,* zafiro oreja blanca *(Hylocharis leucotis)* y picogordo tigrillo (*Pheucticus melanocephalus),*identificadas con parche reproductivo. Se identificaron 4 aves por vocalización: búho cornudo (*Bubo virginianus*), jilguero dominico (Spinus psaltria), gorrión barba negra (Spizella atrogularis) y matraca del desierto (C*ampylorhynchus brunneicapillus)* y 24 fueron observaciones directas, también se encontraron 2 nidos activos con huevos de toquí pardo (*Melozone fusca)* ambos en pingüica (*Ehretia tinifolia),* uno a 80 cm del suelo con 2 huevos y el otro con un huevo a 70 cm del suelo.

Se encontraron dos especies semiendémicas de México (*Cynanthus latirostris y Phainopepla nitens)* y a *(Anas platyrhynchos diazi)* registrada en la NOM-059- SEMARNAT-2010 (DOF 2010) como amenazada y seis especies consideradas de importancia económica en el país (CONABIO1996) Paloma ala blanca (*Zenaida asiática),* Paloma Huilota *(Zenaida macroura),* Tórtola coquita (*Columbina passerina), cuervo común (Corvus corax),* Cenzontle norteño (*Mimus polyglottos)* y Cuitlacoche pico curvo *(Toxostoma curvirostre)*.

Tabla 2. Avifauna registrada en la cuenca Baja del Río Temascatío, comunidad "El garbanzo", Municipio de Irapuato, Guanajuato y comparación de registros en el municipio.

Taxón	Nombre común	Estacionalidad	Endemismo	Estatus NOM-059	UL	H&M	IV
ANSERIFORMES							
ANATIDAE							
Anas platyrhynchos diazi	Pato de collar	R		A	X	X	X
COLUMBIFORMES							
COLUMBIDAE							
Columbina inca	Tórtola cola larga	R			**X**	**X**	**X**
Columbina passerina	Tórtola coquita	R			**X**	**X**	**X**
Zenaida asiática	Paloma ala blanca	R			**X**	**X**	**X**
Zenaida macroura	Paloma Huilota	R			**X**	**X**	**X**
CUCULIFORMES							
CUCULIDAE							
Geococcyx californianus	Correcaminos norteño	R			**X**	-	**X**
APODIFORMES							
TROCHILIDAE							
Cynanthus latirostris	Colibrí pico ancho	R	**S**		-	-	**X**
Hylocharis leucotis	Zafiro oreja blanca	R			**X**	**X**	**X**
ACCIPITRIFORMES							
ACCIPITRIDAE							
Accipiter cooperii	Gavilán de Cooper	M			-	-	-
Buteo jamaincensis	Aguililla cola roja	R			**X**	**X**	**X**
CATHARTIDAE							
Cathartes aura	Zopilote aura	R			**X**	**X**	**X**
STRIGIFORMES							
STRIGIDAE							
Bubo virginianus	Búho cornudo	R			**X**	-	**X**
PICIFORMES							

PICIDAE							
Picoides scalaris	Carpintero mexicano	R			**X**	**X**	**X**
PASSERIFORMES							
CTYRANNIDAE							
Pyrocephalus rubinus	Papamoscas cardenalito	R			**X**	**X**	**X**
CORVIDAE							
Aphelocoma wollweberi	Chara pecho gris	R			-	-	-
Corvus cora x	Cuervo común	R			**X**	**X**	**X**
HIRUNDINIDAE							
Hirundo rustica	Golondrina tijereta	R			**X**	**X**	**X**
AEGITHALIDAE							
Psaltriparus minimus	Sastrecillo	R			-	-	-
TROGLODITIDAE							
Troglodytes aedon	Chivirín saltapared	R			**X**	**X**	**X**
Thryomanes bewickii	Chivirín cola oscura	R			**X**	**X**	**X**
Campylorhynchus brunneicapillus	Matraca del desierto	R			**X**	**X**	**X**
MIMIDAE							
Toxostoma curvirostre	Cuitlacoche pico curvo	R			**X**	**X**	**X**
MINUS							
Mimus polyglottos	Cenzontle norteño	R			**X**	-	**X**
FRINGILLIDAE							
Haemorhous mexicanus	Pinzón mexicano	R			**X**	**X**	**X**
Spinus psaltria	Jilguero dominico	R			**X**	**X**	**X**
EMBERIZIDAE							
Melozone fusca	Toquí pardo	R			-	**X**	**X**
Spizella atrogularis	Gorrión barba negra	R			-	-	-
CARDINALIDAE							
Piranga flava	Tángara encinera	R			-	-	-
Pheucticus melanocephalus	Picogordo trigrillo	R	**S**		**X**	-	**X**
Passerina caerulera	Picogordo azul	R			**X**	**X**	**X**
ICTERIDAE							
Icterus waglerii	Bolsero de Wagler	R			-	-	**X**
PTILGONATIDAE							
Phainopepla nitens	Capulinero negro	R			-	**X**	**X**

(E) Endémico de México, (S) Semiendémico de México; (R) Residente todo el año, (M) Migratorio únicamente en época de no reproducción. (UL)=Especies registradas en el municipio de Irapuato ANP Cerro de Arandas, registros de aves en Uriarte y Lozoya (2009), Lozoya y Uriarte (2012), (H&M)= Registros de aves en Hernández-Navarro y Moreno (2009), (IV)= Inventario de vertebrados (Escobedo *et al* 2015).

DISCUSIÓN

En este estudio se comparó la presencia de las especies encontradas en el área de estudio con tres de los registros más actuales en Irapuato (Uriarte y Lozoya 2009, Lozoya y Uriarte 2012), (Hernández y Moreno 2009), (Escobedo *et al.* 2015) (Tabla 2), donde se encontró que un 12% de las aves de la comunidad de " El Garbanzo" no tienen registro en los trabajos anteriores, 59.4% se encuentran en los tres registros mencionados y el 38.6% está presente en al menos uno de ellos. Por lo que se agrega al registro local, la presencia de cuatro especies, Tángara encinera (*Piranga flava),* gorrión barba negra *(Spizella atrogularis), chara pecho gris (Aphelocoma wollweberi)* y sastrecillo *(Psaltriparus minimus),* a causa probable de los diferentes grados de perturbación, variaciones del clima o la heterogeneidad del paisaje, ya que estos factores influyen estrechamente con la presencia de diferentes especies (Gillespie y Walter, 2001).

La presencia de seis especies de importancia económica en el área de estudio podría convertir a "El Garbanzo" en una zona vulnerable a la extracción legal e ilegal que podría resultar en desequilibrios ecológicos.

CONCLUSIONES

El listado mostró una riqueza de 32 especies, el cual refleja a primera instancia el valor y carácter ecológico de la comunidad de "El Garbanzo" contribuyendo al conocimiento local del municipio de

Irapuato, sin embargo es necesario completar el listado aumentando el esfuerzo del muestreo, ya que al no realizarse en épocas de migración disminuyo la riqueza del registro. Los resultados de un listado completo y fundamentado son necesarios para poder detectar cambios en la riqueza y abundancia, y con ello contribuir a futuro en la toma de decisiones para monitoreos y acciones de conservación y manejo.

La observación de los nidos de (*Melozone fusca)* a poca altura y la presencia del (*Bubo virginianus)* dentro de la zona habitacional de la comunidad podría indicar una zona de poco disturbio por el hombre o la ausencia de depredadores en la estación de la laguna del Galgo. Las aves registradas en su mayoría son residentes, muchas de las cuales potencialmente se pueden reproducir en el área de estudio, asociadas principalmente a zonas con amplia cobertura vegetal y recursos para alimentarse.

BIBLIOGRAFÍA

AOU (American Ornithologists' Union) 2010. Check-list of North American birds. 7a ed. American Ornithologists' Union. Consultado en http://www.aou.org/cheklist/north/full (fecha de consulta 20-07-2016).

BALMER, O. (2002). Species lists in ecology and conservation: abundances matter. *Conservation Biology*, 16: 1160-1161.
BODIN, Ö., M. Tengö, A. Norman, J. Lundberg y T. Elmqvist. (2006). The value of small size: loss of forest patches and ecological thresholds in southern Madagascar. Ecological Applications 16:440-451.

CONABIO (Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad) (1996). *Guía de aves cantoras y de ornato.* Instituto Nacional de Ecología. México. Pp. 5

CONABIO (Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la biodiversidad) (2013). Enciclo vida, Biodiversidad Mexicana. Consultado en http://bios.conabio.gob.mx/especies/8013342 . (Fecha de consulta 16-07-16)

DOF (Diario Oficial de la Federación) (2010). Norma Oficial Mexicana NOM-059 SEMARNAT-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.

ESCALANTE P., M. Sada A., Robles G. J. (2014) Listado de nombres comunes de las aves de México. Universidad Nacional Autónoma de México Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, C.P. 04510 México, Distrito Federal. Instituto de Biología, UNAM.

ESCOBEDO, L.A., Hernández, E., Leyte, A. (2015). Inventario de los vertebrados terrestres del área natural protegida Cerro de Arandas, Irapuato, Guanajuato. *ITESI e IMPLAN*. Pp-32-67

GILLESPIE, T. W. y H. Walter. (2001). Distribution of bird species richness at a regional scale in tropical dry forest of Central America. Journal of Biogeography 28:651-662.

GURROLA, M.A., Escalante, B.P., López, A.S., Sanabria, F. T. (2012). "Aves". *La Biodiversidad en Guanajuato: Estudio de Estado vol. II. México*. *In La Revista Mexicana de Biodiversidad,* Supl. 85: S476-S495, 2014 DOI: 10.7550/rmb.41882 Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad/Instituto de Ecología del Estado de Guanajuato. México, D.F. Pp. 244-254.

HALFFTER G., Llorente B., J., Morrone, J.J. (2008). La perspectiva biogeográfica histórica. *Capital Natural de México, Vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad.* Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, D.F. Pp. 67-86.

HERNÁNDEZ-NAVARRO, E. M., Moreno, P. E. (2009). Estudio de la avifauna del Área Natural Protegida Cerro de Arandas, Irapuato, Guanajuato. *Memorias del VII Congreso Nacional sobre Áreas Naturales Protegidas de México*. San Luis Potosí, S.L.P., CONANP.

HOWELL, S.N.G. & S. Webb. (1995). *A guide to the birds of Mexico and Northern Central America*. Oxford University Press. New York. 851 p.

INAFED (2003). Enciclopedia de los municipios y delegaciones de México: Estado de Guanajuato, Irapuato. Consultada en http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM11guanajuato/municipios/11017a.html (fecha de consulta 07-07-2012)

LOZOYA G. E. y Uriarte G. (2012). Fauna del Área Natural Protegida Cerro de Arandas, Irapuato. Pp. 395-405, en La Biodiversidad en Guanajuato: Estudio de Estado vol. II. México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO)/ Instituto de Ecología del Estado de Guanajuato (IEE).

MARTINEZ Morales, MA. (2005). Landscape pattern sin fluencing bird as semblages in a fragmented neotropical cloud forest. *Biological Conservation.*121: 117–126

MARTI C., Bechard M. and Jacksic F. (2007) Food habits. En: BIRD David and BILDSTEIN Keith (eds) Raptor research and management techniques. Hancock House, Blaine. 2007, p. 129–152. Consultado en: http://raptors.hancockwildlife.org/filemgmt_data/files/Raptor_Research_all.pdf

NAVARRO–SIGÜENZA, A. G., Rebón-Gallardo, Ma., Gordillo-Martínez, A., Townsend, A., Berlarga-García H., Sánchez-Gonzáles, L. A. (2014). Biodiversidad de aves en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad.*

RALPH, C.J., Geupel,G.R.,Pyle,P., Martin, T.E., De Sante, D.F.,Milá, B. (1996). *Manual de Fauna silvestre de México: uso, manejo y legislación 115 todos de campo para el monitoreo de aves terrestres.*

RZEDOWSKI C. (1987). "El bosque tropical caducifolio de la región mexicana del Bajío", *Trace* **12**: 12-21.

URIARTE G., P. y E. Lozoya G. (2009). Manual del inventario de la fauna del Área Natural Protegida Cerro de Arandas, Irapuato, Guanajuato. Parque Ecológico de Irapuato, A.C.

ESTUDIO DE EQUILIBRIO DE FORMACION DE COMPLEJOS DE FIERRO (II)-DIAMINAS

María Guadalupe Mendoza Manríquez[1] y José de Jesús Nezahualcóyotl Segoviano Garfias[2]

RESUMEN

El hidrógeno molecular no está disponible en la Tierra en forma pura. Sin embargo, se han desarrollado métodos para su producción. La búsqueda de nuevas fuentes de energía alternativa ha llevado al estudio de posibles métodos para la generación de hidrógeno. Uno de los que se cree que se pueden utilizar es el rompimiento fotocatalitico del agua, mediante la imitación complejo oxigénico presente en la naturaleza, al utilizar una teoria denominada fotosíntesis artificial. En el presente trabajo se pretende imitar el comportamiento espectral de $[Ru(bpy)_3]_2$, el cual es un catalizador en las reacciones del rompimiento fototacalítico del agua. Se pretende que al utilizar un complejo de Fe y diaminas, pueda sustituir al complejo de rutenio. En el presente trabajo se emplea un método espectrofotométrico para el estudio de la estabililidad de disolución de los complejos de fierro diaminas. La determinación de las constantes de formación se realizó con ayuda del programa HypSpec mediante el procesamiento y refinamiento de los datos espectrofotométricos obtenidos. El intervalo de espectro estudiado fue de 200 a 350 nm, el refinamiento de los datos aún esta en proceso.

ABSTRACT

Molecular hydrogen is not available on Earth in pure form. However, methods have been developed for its production. The search for new alternative energy sources has led to the study of possible methods for generate hydrogen. One is believed that can be used is the photocatalytic water spplitting through the imitation of the oxygen evolving complex in nature, using a theory called artificial photosynthesis. In this work the purpose is to mimic the spectral behavior of $[Ru(bpy)_3]_2$, which is a catalyst in the reactions in the photocatalytic water splitting. The intention is that using a complex of Fe and diamines, can replace the complex ruthenium complex. In this work a spectrophotometric method for the study of the stability in solution of the iron complexes using diamines as ligands, is presented. The determination of formation constants was performed using the program HypSpec through processing and refinement of spectrophotometric data obtained. The spectrum range studied was from 200 to 350 nm, refinement of the data is still in process.

Palabras Clave: Fotosíntesis artificial, Complejos, Energías alternativas.

INTRODUCCIÓN

El proceso de fotosíntesis consiste en la absorción de luz, agua y CO_2 para generar alimento en forma de azúcares, como glucosa, que favorecen el crecimiento y sobrevivencia de las plantas. La fotosíntesis se lleva a cabo en la membrana tilacoidal, esta membrana contiene sistemas de enzimas altamente organizados. Estos sistemas se denominan fotosistema I (PSI) y fotosistema II (PSII) (Audesirk, Audesirk et al. 2003). El PSI utiliza los protones y electrones para el ciclo de la coenzima NADP+, que se convierte en NADPH y la energía de la luz es absorbida inicialmente por el PSII (Alberts, Bray et al. 2006), la cual es una enzima fotosintética, que cataliza la reacción donde se lleva a cabo el rompimiento del agua (Barber 2008). En este sitio, la energía de luz divide dos moléculas de agua en cuatro iones

[1] Instituto Tecnológico Superior de Irapuato Departamento de Biologia; Carretera Irapuato-Silao km 12.5, C.P: 36821, Irapuato, Gto, Tel (462)6067900. manriquezmg217@gmail.com
[2] Universidad de Guanajuato Campus Irapuato-Salamanca, Departamento de Ciencias Ambientales, Division de Ciencias de la Vida (DICIVA); Ex. Hacienda El Copal km 9. Carretera Irapuato-Silao. C.P: 36500, Irapuato Gto., Mexico. segoviano@ugto.mx

hidronio, cuatro electrones y una molécula de oxígeno. La separación fotocatalítica del agua en hidrógeno y oxígeno molecular es una de las reacciones con mayor importancia para los seres vivos. Es potencialmente una de las maneras más prometedoras para la conversión fotoquímica y almacenamiento de energía solar para una economía basada en la generación sustentable de hidrogeno.

Actualmente, solo una reducida cantidad de H_2 está siendo producida, principalmente a partir de conversiones basadas en combustibles fósiles [Navarro, R. M. et al. 2007] [Palo, D. R. et al. 2007]. Para una economía del hidrógeno sostenible, éste tendría que ser producido a partir de la hidrólisis del agua empleando fuentes renovables de energía. El hidrógeno molecular no está disponible en la Tierra en forma pura, sin embargo, existen métodos para su producción. Se cree que se puede utilizarse el rompimiento fotocatalítico del agua, mediante una imitación de la tecnología de la naturaleza denominada fotosíntesis artificial. La imitación de la fotosíntesis se lleva a cabo por medio del desarrollo de complejos que imiten la estructura del clúster OEC (Arifin, Majlan et al. 2012).

En la biosfera, el H_2 ha sido una forma de transporte de energía desde hace millones de años. Es producido y consumido de un modo eficiente por microorganismos, en reacciones de transferencia electrónica catalizadas por las hidrogenasa, contienen centros metálicos de Fe o Fe/Ni capaces de reaccionar o producir H_2. Cabe destacar que la naturaleza ha sido capaz de producir unos catalizadores altamente eficaces, empleando metales de gran disponibilidad en la litosfera, como son el hierro y el níquel. Estas enzimas catalizan la oxidación y la producción de hidrógeno a velocidades comparables a las de metales como el platino[Jones, A. K.et al.2002c]. Las hidrogenasas combinadas con la fotosíntesis, ofrecen una potencial forma de producción de H2, libre de emisiones de gases de efecto invernadero, a partir de una fuente renovable. [Benemann, J. R. et al.1973]. En 1980, un complejo fue investigado ampliamente, por su posible aplicación potencial en la reacción del rompimiento del agua, el complejo es el $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ (Kobayashi, Masaoka et al. 2010). En el presente trabajo se prentende imitar el comportamiento del $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ en el rompimiento fotocatalítico del agua por medio de un complejo de Fe y diaminas el cual pretende que este funcione en imitación $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ en el rompimiento del agua.

MÉTODOS Y MATERIALES

Materiales. Metanol grado HPLC (Tecsiquim, Mexico), se utilizó como disolvente para la determinación de constantes de formación, $Fe(III)(NO_3)_3.9H_2O$, 1,2 etilendiamina, 1,3 propanodiamina, 1,4 butanodiamina (Sigma-Aldrich) fueron de grado analítico los cuales se utilizaron sin purificación posterior. Para las mediciones espectrales se utilizó un espectrofotómetro Shimadzu UV-Vis 1800.

Estudios de equilibrio espectrofotométricos. Todas las mediciones espectrales se realizaron en una celda estándar de cuarzo con 1 cm de longitud óptica y 3 ml de volumen. La determinación de las constantes de formación se realiza mediante el refinamiento de los datos espectrofotométricos utilizando el programa HypSpec (Gans and Sabatini 2014). El intervalo de espectro estudiado es de 200 a 350 nm.

Estudios de equilibrio de fierro (III) 1,2 etilendiamina. Se realizan dos disoluciones, una de fierro (III) con concentración de 0.00099 M y una de 1,2-etilendiamina con una concentración de 0.00015 M, en matraces de 25 ml. En un matraz de 10 ml, se toma un volumen de 1 ml de fierro (III) en el cual la concentración se mantiene constante para cada una de las 11 soluciones stock y un volumen de 0.1, 0.3, 0.7, 0.9, 1.2, 1.5, 1.8, 2.1, 2.3 ml de 1,2 etilendiamina.

Estudios de equilibrio de fierro (III) 1,3 propanodiamina. Se realizan dos disoluciones, una de fierro (III) con concentración de 0.00099 M y una de 1,3 propanodiamina con una concentración de 0.00012 M, en matraces de 25 ml. En un matraz de 10 ml, se toma un volumen de 1 ml de fierro (III) en el cual la concentración se mantiene constante para cada una de las 11 soluciones stock y un volumen de 0.1, 0.3, 0.7, 0.9, 1.2, 1.5, 1.8, 2.1,2.3 ml de 1,2 propanodiamina.

Estudios de equilibrio de fierro (III) 1,4 butanodiamina. Se realizan dos disoluciones, una de fierro (III) con concentración de 0.00099 M y una de 1,4 butanodiamina con una concentración de 0.001 M, en matraces de 25 ml. En un matraz de 10 ml, se toma un volumen de 1 ml de fierro (III) en el cual la concentración se mantiene constante para cada una de las 11 soluciones stock y un volumen de 0.1, 0.3, 0.7, 0.9, 1.2, 1.5, 1.8, 2.1,2.3 ml de 1,4 butanodiamina.

RESULTADOS

Constantes de formación del complejo -Fe- 1,2 etilendiamina
En la Figura 1, se muestran los espectros electrónicos del complejo de Fe- 1,2 etilendiamina dichos experimentos son realizados a concentraciones altas y concentraciones bajas de forma simultánea. Los valores de absorbancia observados en diferentes longitudes de onda se midieron a 24 ºC.

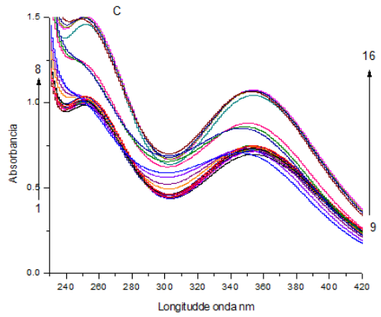


Figura 1. Espectros de absorcion del sistema Fe(III)-1,2 etilendiamina en metanol para los espectros 1- 16[Fe] 0.0247m y para 1, 2-etilendiamina: (1) 0.00099m (2) 0.0002917m (3) 0.000693m (4) 0.000891m (5) 0.001089m (6) 0.001287m (7) 0.001485m (8) 0.001683m (9) 0.00188m (10) 0.002079m (11) 0.000399m (12) 0.000798m (13) 0.001197m (14) 0.001596m (15) 0.001995m (16) 0.002793m.

Constantes de formación del complejo Fe(III)-1,3-propanodiamina
En la Figura 2, se muestran los espectros electrónicos del complejo de Fe(III)-1,2 propanodiamina Estos experimentos son realizados a concentraciones altas y concentraciones bajas de forma simultánea. Los valores de absorbancia observados en diferentes longitudes de onda se midieron a 24 ºC.

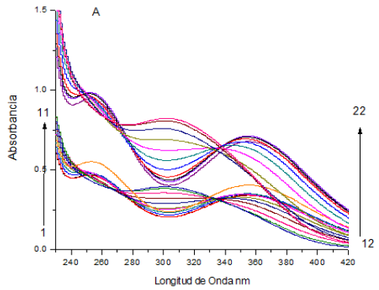


Figura 2. Espectros de absorcion del sistema Fe(III) -1,3 propanodiamina en metanol para los espectros 1- 22[Fe(III)]= 0.0247mM para 1,3-propanodiamina: (1)0.0000984 M (2) 0.000295 M, (3) 0.000492 M (4) 0.000688 M (5) 0.0008856 M (6) 0.0001082M (7) 0.00127 M (8) 0.001.476 M (9) 0.001672 M (10) 0.00186 M (11)0.002064 M (12) 0.00018 M (13) 0.000354 M (14) 0.00059 M (15) 0.00059 M (16) 0.00826 M (17)0.001062 M (18) 0.001534 M (19) 0.00177 M (20) 0.002006 M (21) 0.002242 M (22) 0.002428 M.

Constantes de formación del complejo Fe – 1,4 butanodiamina
En la Figura 3 y 4, se muestran los espectros electrónicos del complejo de Fe(III)-1,4 butanodiamina estos experimentos son realizados a concentraciones altas y concentraciones bajas de forma simultánea. Los valores de absorbancia observados en diferentes longitudes de onda se midieron a 24 ºC.

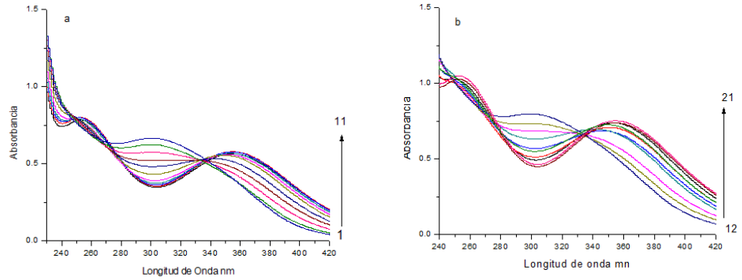


Figura 3 y 4. Espectros de absorcion del sistema fe- 1,4 butanodiamina en metanol para los espectros 1- 22[Fe(III)]= 0.0247 M y para 1,4-butanodiamina:(1) 0.0001 M (2) 0.0003 M (3) 0.0005 M (4) 0.0007 M (5) 0.009 M (6) 0.0011 M (7) 0.0013 M (8) 0.0015 M (9) 0.0017 M (10) 0.0019 M (11)0.0021 M (12) 0.00078 M (13) 0.00013 M (14) 0.000182 M (15) 0.000234 M (16) 0.00286 M (17)0.00312 M (18) 0.00338 M (19) 0.0039 M (20) 0.00494 M (21) 0.005.46 M.

DISCUSION DE RESULTADOS

De acuerdo a los resultados anteriores en los espectros mostrados en la Figura 1 podemos observas la bandas del espectro en el rango de 230 nm se encuentran las bandas de transferencia de carga y en el rango de 350 y 360 nm se encuentra las bandas de absorbancia de este complejo al igual que en la figura 2 se puede observar la absorbancia molar, En la figura 3 se muestra el espectro obtenido del complejo Fe-1,3 propanodiamina en el cual muestra en un rango de 240 a 260nm las bandas de carga del complejo y de 340 a 360nm las bandas de absorción, asi como en la figura 4 y 5 se muestran los espectros del complejo Fe-1,4 butanodiamina de cada uno de los experimentos realizados obteniendo en un rango de 230 a 260 nm las bandas de carga y de 340 a 360nm las bandas de absorción.

CONCLUSIONES

En este trabajo se presentan resultados muy preliminares de la asociación de fierro (III) cuando es coordinado con diversos ligantes como 1,2-etlendiamina, 1,3-propanodiamina y 1,4-butanodiamina. La búsqueda de fuentes alternas para obtener energía a llevado a través de la generación de métodos en los cuales se pretende imitar el rompimiento fotocatalitico del agua para la obtención de energia por medio de un método denominado fotosíntesis artificial el cual utiliza al complejo $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ debido a que es un catalizador muy activo en el rompimiento del agua. Los complejos formados con Fe-1,2-etilendiamina se observan que presentan una mayor estabilidad. Los complejos con Fe-1,3 propanodiamina y Fe-1,4 butanodiamina no se ha podido determinar su estabilidad y se continua su refinamiento en el programa HypSpec aún está en proceso. Un refinamiento mas a detalle puede cambiar ligeramente los valores reportados aquí.

REFERENCIAS

ALBERTS, B., D. BRAY, et al. (2006). Introducción a la biología celular, Editorial Médica
ARIFIN, K., E. H. MAJLAN, et al. (2012). "Bimetallic complexes in artificial photosynthesis for

AUDESIRK, T., G. AUDESIRK, et al. (2003). Biologia: la vida en la tierra, Pearson Educación
BARBER, J. (2008). "Crystal Structure of the Oxygen-Evolving Complex of Photosystem II." Inorganic
BENEMANN, J. R., BERENSON, J. A., Kaplan, N. O., and Kamen, M. D. "Hydrogen evolution by a chloroplast-ferredoxin-hydrogenase system". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1973, 70, 2317-2320.
Chemistry **47**(6): 1700-1710
Evolving (2-phenylpyridinato) platinum (II) Unit." Molecules **15**(7): 4908-4923.
Evolving Properties of Tris (2, 2'-bipyridine) ruthenium (II) Derivatives Tethered to an H2-
hydrogen production: A review." International Journal of Hydrogen Energy **37**(4): 3066-3087.
Infrared spectra of N,N′-bis(salicylidene)-1,1-(dimethyl)ethylenediamine and its metal complexes J.A. Faniran, K.S. PatelDepartment of Chemistry, University of Ibadan, Ibadan, Nigeria, W. Africa John C. Bailar Jr. School of Chemical Sciences, University of Illinois, Urbana, Illinois 61801, USA Received 18 July 1973, Available online 16 May 2003.

JONES, A. K., Sillery, E., Albracht, S. P. J., and Armstrong, F. A. "Direct comparison of electrocatalytic oxidation of hydrogen by an enzyme and a platinum catalyst". Chemical Communications, 2002, 866-867.
KOBAYASHI, M., S. MASAOKA, et al. (2010). "Syntheses, Characterization, and Photo-Hydrogen-
NAVARRO, R. M., Pena, M. A., and Fierro, J. L. G. "Hydrogen production reactions from carbon feedstocks: Fossils fuels and biomass". Chemical Reviews, 2007, 107, 3952-3991.
PALO, D. R., Dagle, R. A., and Holladay, J. D. "Methanol steam reforming for hydrogen production". Chemical Reviews, 2007, 107, 3992-4021.
Panamericana.

DESARROLLO DE MATERIALES PARA ELIMINAR COMPONENTES TÓXICOS EN FUENTES DE AGUA

Aury Guadalupe Mendoza Medina[1] y Merced Martínez Rosales[2]

RESUMEN

Se presentan los resultados y conclusiones del trabajo realizada en una estancia de investigación, cuyo objetivo fue el conocimiento sobre la síntesis, caracterización y evaluación de materiales que mediante el proceso de adsorción removerían, de fuentes de agua, componentes tóxicos que son un riesgo para la salud. Específicamente en esta oportunidad se estudió la adsorción de arsénico. Como uno de los productos de esta síntesis, fue una mezcla de óxidos de aluminio y de magnesio para optimizar la adsorción de aniones. En principio se obtuvo alúmina activada, que funciona como un soporte que favorece la fase activa, posteriormente, esta fue modificada con óxido de magnesio, favoreciendo con ello la capacidad de remoción de arsénico. El trabajo se realizó en las instalaciones de la División de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad de Guanajuato.

ABSTRACT

The results and conclusions of the work carried out are presented in a research stay whose objective was the knowledge on the synthesis, characterization and evaluation of materials by adsorption process would remove, water sources, toxic components that are a risk to Health. Specifically this time arsenic adsorption was studied. As one of the products of this synthesis, was a mixture of oxides of aluminum and magnesium to optimize the adsorption of anions. In principle, activated alumina, which functions as a support that promotes active phase later this was modified with magnesium oxide, thereby facilitating the ability to remove arsenic was obtained. The work was conducted at the premises of the División de Ciencias Naturales y Exactas of the Universidad de Guanajuato.

Palabras clave: Adsorción, arsénico, alúmina.

INTRODUCCION

La adsorción se trata de un proceso donde los átomos, iones y moléculas e quedan retenidas en la superficie del material, que popularmente se utiliza para la erradicación de metales pesados, este método es utilizado con frecuencia por que el proceso resulta eficiente, simple y es de bajo costo.

La liberación de metales pesados sigue siendo una problemática mundial, como bien sabemos las fuentes que causan una mayor contaminación de medio ambiente son aquellas donde los efectos, procesos o materiales son producto de la actividad humana, pero también los metales pesados pueden introducirse

[1] Universidad de Guanajuato, División de Ciencias Naturales y Exactas, Departamento de Química; Malecón del rio 424, Coecillo, C.P:37260, León, Guanajuato; aurygpemm.94@hotmail.com.
[2] Universidad de Guanajuato, División de Ciencias Naturales y Exactas, Departamento de Química; Unidad noria alta S/N, Noria Alta, C.P: 36050, Guanajuato, Guanajuato; mercedjgto.mx.

como contaminantes, mediante fuentes naturales, como son la erosión de las rocas y el suelo, el agua de lluvia. El arsénico es un elemento natural de la corteza terrestre, se encuentra distribuido en el aire, el agua y la tierra. La exposición a altos niveles de arsénico inorgánico (forma toxica) o la exposición prolongada puede causar intoxicación crónica, y esta puede deberse a diversas causas, como el consumo de agua contaminada, para el riego de cultivos alimentarios y para procesos industriales, así como al consumo de tabaco y de alimentos contaminados con este pseudometal. Los efectos más característicos son la aparición de lesiones cutáneas y cáncer de piel, así como trastornos neurológicos y hematológicos. México es un país que reporta altos niveles de arsénico inorgánico en aguas subterráneas, según la Organización Mundial de la Salud (OMS). Todo esto justifica la decisión de la OMS de reducir el límite máximo admisible a 10 µg/l.

MÉTODOS Y MATERIALES

Las materias primas utilizadas para obtener el oxido de aluminio (alúmina activada) son: sulfato de aluminio hidratado con 18 moléculas de H_2O, hidróxido de amonio 15 molar de densidad 0,9 g/cm^3, calidad reactivo químico, y agua destilada. La reacción química de obtención del precursor es la siguiente:

$$Al_2(SO_4)_3 + 6NH_4OH \rightarrow 2Al(OH)_3 + 3[(NH]_4)_2SO_4$$

La secuencia metodológica es como se muestra en la figura 1. Inicialmente se prepara una solución saturada de sulfato de aluminio pH=5 y se calienta a 65°, se agrega lentamente una solución de hidróxido de amonio como hidrolizante para dar lugar al producto deseado; mediante una bomba dosificadora se agrega al reactor la solución de sulfato de aluminio hasta neutralizar la reacción manteniendo el pH = 10 y con agitación vigorosa y constante, finalmente se recupera por filtración el producto AlOOH (pseudobohemita). Al final de la etapa de filtrado, se realizaron lavados del material para eliminar la presencia de sulfato remanente, la prueba se realiza con la adición de cloruro de bario, prueba muy ilustrativa por la formación de un precipitado blanco de sulfato de bario.

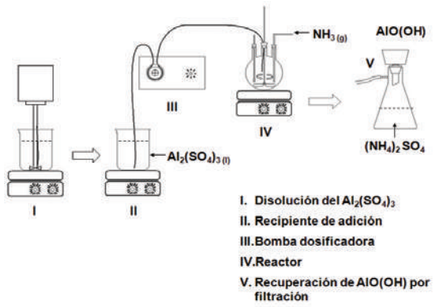


Figura 1. Esquema de la obtención de pseudobohemita (oxihidróxido de aluminio).

Posteriormente, mediante un tratamiento térmico a una temperatura de 500 °C se llega a la alúmina activada (Ver figura 2). En esta etapa, el tratamiento térmico se deberá llevar a cabo a través de rampas de calentamiento con el fin de conservar la porosidad y área específica, propiedades texturales muy útiles para la aplicación que se estudia.

La reacción ilustrativa del tratamiento térmico (deshidratación) es la siguiente:

$$AlOOH \xrightarrow{\Delta=500^{\circ}} Al_2O_3 + H_2O$$

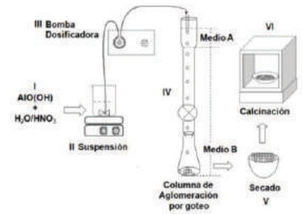


Figura 2. Esquema de la obtención de alúmina activada aglomerada por goteo.

RESULTADOS

La porosidad del material y su precursor es alta, tal como se muestran en las micrografías que aparecen en las figuras 3 y 4. Estas características y lo amorfo del material, predicen que es posible realizar de manera exitosa el proceso de adsorción del componente de interés.

Como complemento, en la tabla 1, se muestran los valores considerablemente altos de área específica superficial (S_{BET}, m^2/g); volumen de poro (V_P, cm^3/g) y diámetro de poro (D_P, nm). De acuerdo a estos valores se puede predecir que estos materiales deberán presentar alta capacidad de remoción de especies aniónicas o catiónicas presentes en fuentes naturales o residuales de agua. Esto está ligado también a la característica estructural del material adsorbente.

Tabla. 1. Propiedades texturales de precursor y alúmina activada (γ-Al_2O_3).

Muestra	S_{BET} (m^2/g)	V_P (cm^3/g)	D_P (nm)	T_P* (nm)
AlOOH (precursor) modificado **	380	0.80	8.30	150
Alúmina activada (γ-Al_2O_3)	326	0.92	11.30	250

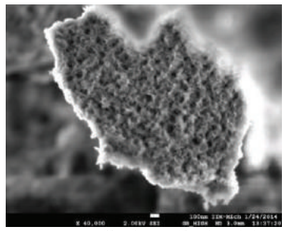


Figura 3.Micrografía de partículas del precursor (AlOOH) ilustrativa de su alta porosidad.

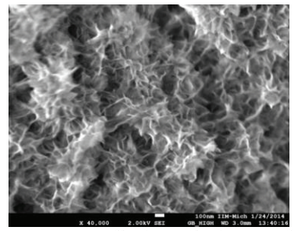


Figura 4.Micrografía de partículas amorfas del producto (alúmina activada).

En la figura 5, se ilustra el patrón de DRX de la alúmina activada (γ-Al_2O_3**)**. En este patrón se puede notar la presencia de una familia de señales (o picos) que son características de la fase de interés. Estas señales son picos ensanchados que están asociados con materiales formados por cristales muy pequeños de ahí el prefijo "*pseudocristalinidad*" dándose por entender que son cristales que tienden a crecer si se les aplica un tratamiento específico (hidrotermal). Tal como se mostró en la tabla de valores de textura, también están asociados con valores de área superficial alta.

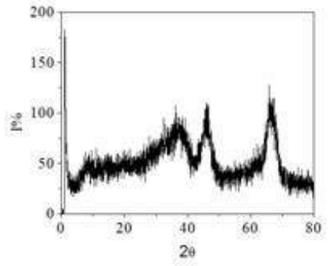


Figura5. Patrón DRX de γ-Al_2O_3 (alúmina activada).

CONCLUSIONES

La metodología descrita para la obtención, caracterización y evaluación de materiales adsorbentes, por esta ruta es económica, la síntesis es espontánea y las materias primas que intervienen son accesibles.

La aplicación de esta metodología en el desarrollo del proceso, resulta una técnica sencilla para la adsorción o remoción de arsénico y metales pesados en fuentes de agua, esto es un proceso sumamente importante, que al ser aplicado para corroborar la calidad del agua de dichas fuentes, será un proceso fácil, eficiente, y económico para la adsorción de arsénico.

La eficacia de este material, depende en gran medida de la estructura amorfa del mismo, puesto a que conforme pasa el líquido por el material, el componente de importancia se queda en la estructura, permitiendo así la adsorción.

Cabe mencionar que esta metodología tiene un amplia aplicación, pues cubriría la necesidad de mantener los niveles aceptados de arsénico en agua potable, así como los de otros componentes que presentan un peligro en caso de consumirse a ciertas concentraciones. Queda pendiente el estudio de la aceptación en la población de este método, antes de pasar a una producción masiva del material.

BIBLIOGRAFIA

PHOEBE ZITO R; SHIPLEY J. (2015). "Inorganc nano-adsorbents for the removal of heavy metals and arsenic: a review" en *Royal Society of Chemistry*, Num. 15, vol. 5. [pp. 39885-2907].

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION, WATER POLLUTION CONTROL FEDERATION. Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales. 17a ed. México, D.F. Iberoamericana S.A;1990. Sección 4-80.

SIERRA I, PEREZ QUINTANILLA D. (2012). "Heavy metal complexation on hybrid mesoporus silicas: an approach to analytical application" en *Royal Society of Chemistry*, Rev 2013, vol 42. [pp. 3792-3807].

YUNFENG X; YINGCHUN D; JIZHI Z; ZHI P; GUANGREN Q; G. Q. Max Lu. "Removal efficiency of arsenate and phosphate from aqueous solution using layered double hydroxide materials: intercalation vs. Precipitation" en Royal Society of Chemistry, Año 2010, vol. 20, [pp.4684-4691].

ANÁLISIS *IN SILICO* DE UN DERIVADO DE CUMARINA PARA PREDECIR POSIBLE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Maria del Carmen Montano Luna[1] y José García Elías[2]

RESUMEN

En el presente proyecto de investigación del 18º verano de la ciencia se realizó un análisis *in silico* de un derivado de cumarina con un sustituyente en C-7 del anillo A, a través de programas computacionales, ambos otorgados por el Laboratorio de Investigación de Síntesis Asimétrica y bioenergética (LSAyB). Los programas utilizados ayudan a predecir algunas propiedades fisicoquímicas, así como posible bio-actividad, probables efectos adversos y nivel toxicológico. El resultado de la elucidación en los programas ratifica que cumplen con las propiedades fisicoquímicas establecidas por las reglas de Lipinski, así como una probabilidad alta en el efecto como ligando a receptores nucleares y con una probabilidad de no ser bloqueador ERG.

ABSTRACT

In this research project the 18th summer of science it has been made an in silico analysis of coumarin derivative with a substituent at C-7 ring through computer programs, both awarded by the Research Laboratory of Asymmetric Synthesis and Bioenergetics (LSAyB). The programs used to help predict some physicochemical properties and possible bioactivity, probable adverse effects and toxicological level. The result of elucidating ratifies in the programs must comply with the laws of Lipinski with the physicochemical properties and a high effect joining nuclear receptors and a probability of not being blocker ERG.

Palabras Clave: Cumarina*, in silico,* biológicos, fisicoquímicos, cáncer.

INTRODUCCIÓN

Las plantas han sido parte importante para el hombre en la cura de enfermedades, son utilizadas por su gran versatilidad y para la obtención de compuestos biológicamente activos, de acuerdo a la tradición popular se le adjudican propiedades medicinales y se elaboraban preparados galénicos como infusiones, lociones, cremas, pomadas, jarabes que los contenían. Son muchas las familias de plantas que han aportado grandes conocimientos en el descubrimiento de moléculas con una actividad importante para la salud. El LSAyB, tiene una línea de investigación dedicada a los productos naturales, donde el interés de este trabajo está enfocado a las cumarinas.

Las cumarinas, pertenecen al grupo de compuestos conocidos como benzopironas, consiste en un anillo bencénico condensado a un anillo de α-pirona. (Figura 1) La cumarina fue aislada por primera vez en el año de 1820 por Voleg, quien también le asignó el nombre a esta importante familia. En la naturaleza se encuentran presentes: en raíces, hojas, flores o frutos de diferentes familias de las *Angiospermas*, como

[1] Unidad Académica de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Zacatecas Campus Siglo XXI, Carretera Zacatecas-Guadalajara Km 6, Ejido la Escondida C.P. 98160. Zacatecas, Zac. MÉXICO; esmaci_@hotmail.com
[2] Unidad Académica de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Zacatecas Campus Siglo XXI, Carretera Zacatecas-Guadalajara Km 6, Ejido la Escondida C.P. 98160. Zacatecas, Zac. MÉXICO; garciaelias_jose@uaz.edu.mx

son *Apiaceae, Rutaceae, Asteraceae, Umbeliferae*, entre otras. Y pertenecen al grupo de metabolitos secundarios sintetizados por la vía del ácido shikímico, también nombrados como metabolitos C_6C_3.

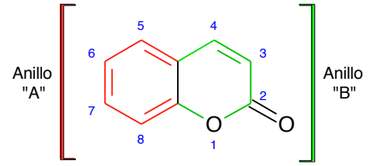


Figura 1. Estructura de cumarina

Las investigaciones relacionadas a la cumarinas, se han dedicado a la separación, purificación y síntesis de nuevos derivados, para explorar algunas posibles actividades farmacológicas. Varios de los derivados de cumarina han tenido un gran impacto como fármaco terapéutico, entre las actividades biológicas que destaca son anti-bacteriano, inhibidor de la cicloxigenasa, antimutagénico, antioxidante, anti-inflamatorio, anticoagulante, estimulantes del sistema nervioso central, antitrombótica, vasodilatador y anticancerígeno. Como ya mencionamos la importancia que tienen los derivados de cumarina, se han planteado diversos procesos de síntesis, entre los que destacan las reacciones de condensación de Pechmann, Perkin, Knovenagel, Wittig, entre otras (Figura 2).

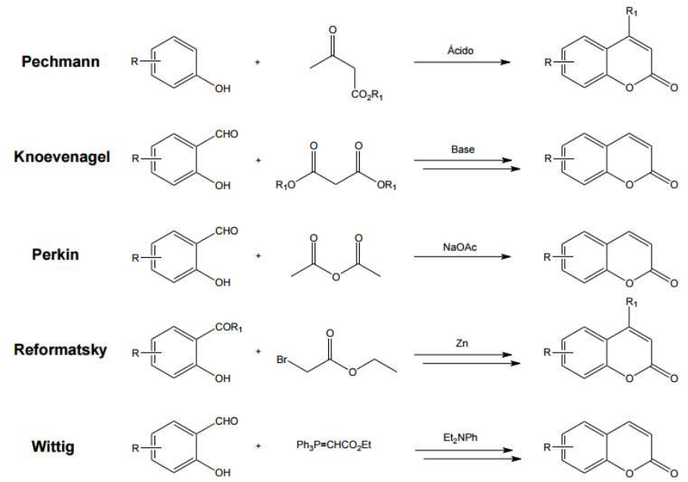


Figura 2. Métodos de síntesis de cumarinas

Una vez establecidos los métodos para la síntesis de cumarinas, se observó que el núcleo de cumarina presenta una versatilidad en las posiciones 3, 4 y 7 para ser sustituida por otros sustituyentes. Debido a lo anterior, se planteó el estudio de una estructura derivada del núcleo de cumarina sustituida en la posición C-7 del anillo A para su evaluación biológica. Para dicho objetivo, se realizan estudios de diferente índole, *in vivo* (estudios en animales), *ex vivo* (tejido y órgano), *in vitro* (cultivos de células) e *in silico* (estudios en computadora). Cabe mencionar que en la estancia de verano, se trabajó con el derivado mediante estudios *in silico*.

Debido al proceso tan extenso que implica analizar las propiedades fisicoquímicas y actividad biológica de una molécula, se ha propuesto el análisis *in silico*, con el objetivo de reducir los costos y el tiempo. Estos parámetros son valorados en programas computacionales y software libres, para predecir una funcionalidad en estudios posteriores *in vivo*. Los datos expresados en cada programa se basan en criterios propios. Sin embargo, una de las principales formas de evaluar los resultados, es con referencia a las reglas de Lipinski, también conocida como la regla de los 5. Lo anterior debido a que sus valores son múltiplos de 5 y consideran parámetros que ayudan a clasificar una molécula como un posible cuasifármaco. Las reglas comprenden lo siguiente: un peso molecular menor a 500 Dalton, su Log P menor a 5, donadores de puente de hidrogeno menor de 5 y aceptores de puente de hidrogeno menor a 10.

MÉTODOS Y MATERIALES

Los programas que fueron utilizados son los siguientes: a) Molinspiration, permite dibujar la molécula objetivo, genera el código smile con números, letras o signos, este código indica la forma abreviada de la molécula. También el programa calcula las propiedades fisicoquímicas y la predicción de bio-actividad; b) el programa PASSOnline, muestra la probabilidad de actividad (Pa) y la probabilidad de inactividad (Pi), así como posibles efectos adversos y actividad toxicológica; c) la función de LabMol es predecir los posibles canales ERG, indicando si es bueno, mediano o mal bloqueador de dichos canales; d) en el programa Metaprint se predice la probabilidad de los sitios de metabolismo. Por último, el programa MestReNova predice el espectro de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) para ^{1}H y ^{13}C.

RESULTADO

Los resultados obtenidos del compuesto con el núcleo de cumarina sustituido en la posición C-7 del anillo A en los programas Molinspiration y PASSOnline fueron evaluados de acuerdo a las reglas de Lipinski (Tabla 1).

Tabla 1. Resultados de programas Molinspiration y PASSOnline

Parámetro	Programas	
	Molinspiration	MedChem Desinger
Peso molecular (Da)	394.38	394.38
Número de átomos	29	-
Log P*	3.88	3.919
Donadores de puente de hidrógeno (NHO)	0	0
Aceptores de puente de hidrógeno (NO)	7	7
TPSA (Å)	92.06	92.04
Enlaces rotables	8	-

En ninguno de los dos programas se violan las reglas de Lipinski, los dos programas generan valores de propiedades similares, como el peso molecular. Sin embargo, el valor de Log P varia un poco en ambos programas, pero en ambos casos el valor se traduce en la capacidad que tiene la molécula para atravesar

la membrana celular y demuestra la baja solubilidad en agua. Con respecto a los valores de donadores y aceptores de hidrogeno se encuentran dentro de lo establecido, por lo tanto, tienen una alta probabilidad de tener una buena absorción oral. El área topológica polar superficial (TPSA) es un valor indispensable en la farmacocinética para la obtención del porcentaje de absorción y la molécula presenta un 77% de este descriptor.

Para la bio-actividad se trabajó con ambos programas, en Molinspiration se presentaron seis probables blancos en los que la molécula podría interactuar y el mejor valor obtenido fue para la interacción con el ligando del receptor nuclear. Por otro lado, para PASSOnline existe una probabilidad de actividad de 0.927 de 1 como agonista de la integridad de membrana y un 0.808 de 1 para ser inhibidor de la permeabilidad de membrana. El núcleo de cumarina sustituido fue probado en el software MetaPrint2D, donde se obtuvo una probabilidad alta (>0.66) de metabolizarse en las posiciones 13 (CH_2) y 14 (CH_3), (Figura 3) mediante las posibles reacciones que implican desalquilación.

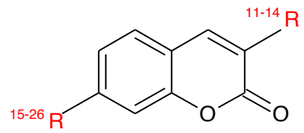


Figura 3. Derivado de cumarina con ubicación de radicales

Por último, se presenta la elucidación de la molécula empleando un simulador de Resonancia Magnética Nuclear (RNM) de H^{1}. (Figura 4)

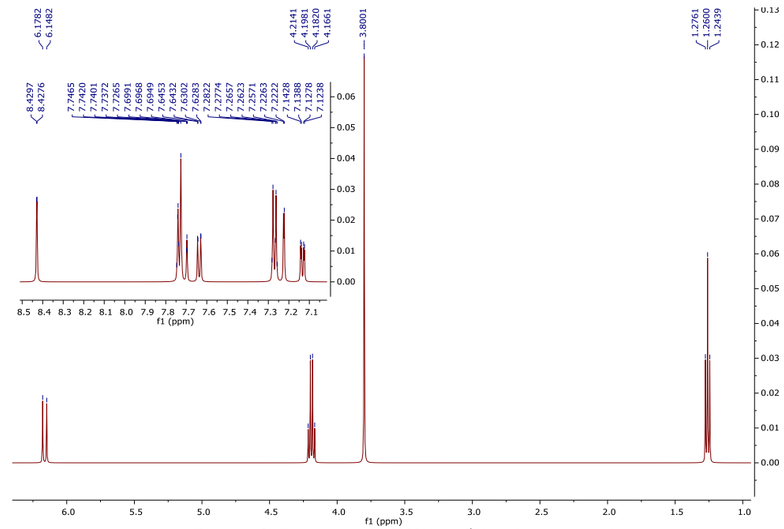


Figura 4. Espectro de RMN de ^{1}H del compuesto

El espectro de RMN de ^{1}H presenta 10 señales correspondientes al compuesto, comenzando de campo bajo a campo alto se observan en un intervalo de desplazamiento de 6.5 a 8.5 ppm los hidrógenos aromáticos, de alqueno α,β-insaturado del anillo lactámico y del éster α,β-insaturado presentes en la

estructura. De 6 a 6.5 ppm se observa uno de los hidrógenos del alquenos α,β-insaturado. Finalmente, en la región de 1 a 4.5 ppm se presentan los hidrógenos correspondientes a los metilos y metilenos que están ubicados en la estructura con diferentes desplazamientos químicos debido al ambiente químico que presentan.

CONCLUSIONES

El compuesto analizado una actividad biológica probable como ligando a receptores nucleares, los cuales pueden actuar como factores de transcripción para modular de manera positiva o negativa, la expresión de genes involucrados en procesos de diferenciación, crecimiento, reproducción y metabolismo, las disfunciones asociadas a estos receptores en procesos fisiológicos tienen implicaciones en enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2 y cáncer, entre otras. De acuerdo a los resultados obtenidos de los programas es una buena opción para que se continúe con el proceso sintético y posteriormente los estudios de forma *in vivo*, aunque cabe destacar que tienen probabilidades de tener efectos adversos como la sensibilidad y ulceras gástricas.

BIBLIOGRAFÍA

MEDINA-FRANCO, J., FERNÁNDEZ-DE GORTARI, E., & NAVEJA, J. (2015). "Avances en el diseño de fármacos asistido por computadora" *Educación Química*, Núm. 26, Vol. III, [pp. 180-186]

REIJA OTERO, B. (2007). "Estudio estructural y dinámico de sistemas organizados mediante sondas fluorescentes" *[Santiago De Compostela]*: Universidad de Santiago de Compostela, Servicio De Publicaciones e Intercambio Científico.

SANHUEZA C, J. AND VALENZUELA B, A. (2006). "Receptores nucleares y regulación de la expresión génica por ácidos grasos poliinsaturados: algo más que producción de energía y esencialidad". *rev. chil. nutr.*, 33(2).
THAKUR, A., SINGLA, R., & JAITAK, V. (2015). "ChemInform Abstract: Coumarins as Anticancer Agents" A Review on Synthetic Strategies, *Mechanism of Action and SAR Studies*. Cheminform, Núm. 46, Vol. XLI, no-no.

VENUGOPALA, K., RASHMI, V. AND ODHAV, B. (2013). "Review on Natural Coumarin Lead Compounds for Their Pharmacological Activity". *BioMed Research International*, 2013, pp.1-14.

SÍNTESIS DE COMPUESTOS ORGÁNICOS POTENCIALMENTE BIOACTIVOS MEDIANTE METODOLOGÍAS DE LA QUÍMICA VERDE

Jorge Isaac Montenegro Nares[1] y Catalina María Pérez Berumen[2]

RESUMEN

Mediante el uso de la química verde se busca encontrar y utilizar metodologías las cuales impliquen la reducción o eliminación del uso de sustancias la cuales pueden representar un peligro para el medio ambiente o la salud. De la misma manera se buscan metodologías más sencillas las cuales tengan una mejor eficiencia en la producción de compuestos naturales. Las chalconas son compuestos orgánicos producidos naturalmente por ciertas plantas, los cuales tienen propiedades biológicas de gran interés. También las chalconas actúan como precursores para la síntesis de diferentes flavonoides que, igualmente, tienen un interés biológico. Este proyecto se basa en el fundamento de la condensación de Claisen-Schmidt utilizando radiación de microondas para la síntesis de chalconas.

ABSTRACT

By using green chemistry seeks to find and use methods which involve reducing or eliminating the use of the substances which may represent a hazard to the environment or health. Similarly, simpler methods which have improved efficiency in the production of natural compounds are sought. Chalcones are produced naturally by certain plants organic compounds which have biological properties of interest. Chalcones also act as precursors for the synthesis of various flavonoids that also have a biological interest. This project is based on the foundation of Claisen-Schmidt condensation using microwave radiation for synthesis of chalcones.

Palabras Clave: Chalconas, química verde, microondas.

INTRODUCCIÓN

Los Flavonoides son compuestos presentes naturalmente en las plantas y cumplen funciones de defensa, en la ayuda del desarrollo de planta y también la polinización (Modolo, et al., 2007). A pesar de haber sido estudiados por más de un siglo existe aún un interés por la síntesis y aislamiento de estos compuestos y esto se debe a la gran cantidad de aplicaciones biológicas de dichos compuestos (Seijas, Vázquez-Tato, & Carballido-Reboredo, 2005).

Muchos de estos flavonoides poseen actividades antivirales, antiinflamatorias, antioxidantes y anti alergénicas (Seijas, Vázquez-Tato, & Carballido-Reboredo, 2005; Modolo, et al., 2007) pero también han mostrado actividad vasodilatadora, antibacterial, anticancerígenas y antimutagénicas. (Seijas, Vázquez-Tato, & Carballido-Reboredo, 2005). Las Chalconas, con estructura (1,3-diaril-2-propen-1-onas) (Kumar, et al., 2012), son cetonas aromáticas que forman parte del núcleo central de los flavonoides (Chauhan, Dwivedi, Siddiqi Anees, & Kishore, 2011) y son usados como precursores en gran parte de las síntesis de

[1] Universidad Autónoma De Coahuila, Facultad De Ciencias Biológicas; Carretera Torreón-Matamoros Km. 7.5. Ciudad Universitaria. C.P. 27276. Torreón, Coahuila. isaac.montenegro.m@outlook.com
[2] Universidad Autónoma De Coahuila, Departamento De Química Orgánica, Facultad De Ciencias Químicas; Blvd. V. Carranza y José Cárdenas, 25280, Saltillo, Coahuila, México. catalinaperez@uadec.edu.mx

compuestos heterocíclicos que son biológicamente importantes (Krishnakumar & Swaminathan, 2011). Estos compuestos de gran importancia son usados como productos agroquímicos, farmacéuticos e intermediarios para producir perfumes (Krishnakumar & Swaminathan, 2011), y al igual que muchos flavonoides, poseen propiedad antibacterial, antiinflamatoria, antitumoral (Won, et al., 2005; Kumar, et al., 2012; Chauhan, Dwivedi, Siddiqi Anees, & Kishore, 2011). También son prometedores agentes quimiopreventivos de cáncer, así como también presentan un uso potencial en la terapia de choque séptico (Won, et al., 2005).

Las metodologías más reportadas para la síntesis de chalconas son las catalizadas por un ácido o base fuerte (Krishnakumar & Swaminathan, 2011). La condensación de Claisen-Schmidt es uno de los métodos más simples, en la que los compuestos con grupo β-hidroxicarbonilo son sometidos a una reacción de deshidratación y, de esta forma, proporcionar el grupo arildeno. Como muestran Lin, et al., (1997); Seijas, Vázquez-Tato, & Carballido-Reboredo, (2005) y Won, et al., (2005) esta reacción se lleva a cabo entre una arilacetofenona y un aldehído aromático.

Esta reacción es más comúnmente catalizada por una base, sometida a calentamiento convencional o también llevada a cabo a temperatura ambiente y puede ocurrir en presencia o ausencia de solvente. Sin embargo, en cualquiera de estas condiciones la formación de productos secundarios disminuye el rendimiento y esto implica el uso procesos de purificación (Rayar, Sylla-Iyarreta, & Ferroud, 2015).

Muchas metodologías reportadas proporcionan buenos rendimientos, pero implican el uso de catalizadores peligrosos o solventes tóxicos, largos tiempos de reacción y también la formación de productos secundarios. Por esto es de gran interés el desarrollo de nuevos métodos los cuales mejoren los rendimientos, así como también condiciones de reacción suaves. (Rayar, Sylla-Iyarreta, & Ferroud, 2015). La eliminación o sustitución de las metodologías estequiométricas clásicas con alternativas más limpias es una solución que propone la química verde, la cual surge de la necesidad de procesos ambientalmente aceptados en la industria química (Sheldon, 2005). La síntesis asistida con radiación de microondas ofrece mayores ventajas contra las técnicas de síntesis convencionales ya que implica tiempos de reacción menores y una reducción del uso de solventes lo cual trae consigo también incrementos en el rendimiento (Kumar, et al., 2012; Krishnakumar & Swaminathan, 2011; Seijas, Vázquez-Tato, & Carballido-Reboredo, 2005).

MÉTODOS Y MATERIALES

Síntesis de chalconas
Siguiendo la reacción de condensación de Claisen-Schmidt, como se muestra en la figura 1, se hace reaccionar cantidades equimolares de la acetofenona y el aldehído aromático en medio básico, para catalizar la reacción.

Mecano síntesis
En un mortero, y con ayuda de un pistilo, se pulverizan 0.5 gramos de 2, 4- Dihidroxiacetofenona y 0.4 gr de hidróxido de sodio (lo cual equivale al triple de moles de acetofenona). Después de homogenizar estos compuestos, se agrega 0.34 gr de benzaldehído (± 0.33 mL) y, con ayuda del pistilo, se hace reaccionar por 10 minutos.

Síntesis por ultrasonido.
Se lleva acabo de la misma forma, y cantidades iguales, la pulverización del NaOH con 2, 4- Dihidroxiacetofenona y esta mezcla es vertida en un tubo de ensayo de 16x150 con 4 mL de etanol. Posterior a la solubilizarían de esta mezcla se agrega el mismo volumen de benzaldehído y se deja reaccionar en un baño de ultrasonido por un tiempo de 30 minutos.

Esta misma metodología se siguió nuevamente en dos síntesis diferentes, con la modificación de las cantidades y el tipo de acetofenona. En la primera de estas síntesis se empleó 1 gramo de 2-hidroxiacetofenona (±0.89 mL), 0.58 gr de NaOH, en este caso equivalente al doble de moles de acetofenona, y 0.77 gr de benzaldehído (± 0.74 mL), en el mismo tiempo de reacción. En la segunda síntesis se utilizó 1 gramo de 2, 5- Dihidroxiacetofenona, con 0.78 gr de NaOH y 0.69 gr de benzaldehído (± 0.66 mL). El tiempo de reacción en esta síntesis varió hasta las 2 horas por intervalos de 30 minutos.

Síntesis por microondas
En un tubo especial para microondas, se diluye ± 0.4 gr de NaOH en 2 mililitros de etanol, como medio de reacción. Para facilitar esta solución se elevó la temperatura y se empleó agitación magnética. Cuando el NaOH se diluyó por completo se añadió 0.5 gr de 2, 5- Dihidroxiacetofenona y posteriormente 0.34 gr de benzaldehído (± 0.33 mL). Inmediatamente después de la adición del benzaldehído la mezcla se irradió, en un microondas Discover® LabMate™ con sistema de control de presión IntelliVent™ y el software Synergy ™. Las condiciones establecidas fueron de 65 °C, 300 W de potencia por un tiempo de 5 minutos. En otro tubo para microondas, 1 gramo de 2- hidroxiacetofenona (±0.89 mL) se puso a reaccionar con 0.77 gr de benzaldehído (± 0.74 mL), en un medio que contenía 0.04 gr de alúmina básica, siendo irradiada en el mismo microondas con 300 W de potencia, a una temperatura de 80 °C y por un tiempo de 15 minutos (a intervalos de 5 minutos. Transcurrido este tiempo la temperatura fue elevada a 100 °C por 10 minutos y posteriormente se agregó 0.108 gr de NaOH, el cual se encontraba en solución con etanol, y se irradió por 10 minutos más con la misma temperatura.

En un tercer tubo las primas fueron puestas a reaccionar nuevamente en presencia de alúmina básica, pero esta vez el medio de reacción contenía NaOH solubilizado, (las cantidades fueron las mismas que en la síntesis anterior). Las condiciones de reacción fueron de 100 °C con una potencia de 300 W por únicamente 5 minutos.

Comprobar la formación de producto.
Para esto se observó el cambio de color de la muestra mientras la reacción se llevaba a cabo. Con el mismo fin, se hicieron cromatografías de capa fina utilizando placas de sílica gel con un indicador, fluorescente a una longitud de onda de 254 nanómetros, y una mezcla 5:5 de hexano-acetato de etilo como eluyente. Esto también fue usado para conocer si la reacción se había llevado acabo u observar la presencia de materias primas en la reacción.

Separación del producto.
Como primer pasó se debía eliminar la presencia de etanol, en caso de que fuera el medio de reacción, en un matraz bola para rotavapor, se utilizó un rotavapor modelo R-200 marca BÜCHI®.

Posteriormente el producto se extrajo del NaOH con un embudo de separación de 50 mL usando volúmenes iguales de agua destilada y acetato de etilo como solventes. Después de la separación, se añadió nuevamente acetato de etilo al agua, esto se realizó dos veces para una mejor extracción. Al término de la extracción se agregó sulfato de magnesio para captar cualquier parte de agua que se encuentre en el acetato de etilo y posterior a una filtración, el acetato de etilo fue evaporado de nuevo en el rotavapor.

Identificación de compuestos.
Para esto, es necesario que los productos se encuentren cristalizados, lo cual se hizo agregando etanol caliente a nuestra muestra libre de solventes y exponiéndola a un choque térmico en un baño de hielos. Los cristales fueron separados y cuantificados por filtración y diferencia de peso. La primera de las pruebas realizadas a los productos cristalizados fue le determinación del punto de fusión, utilizando un aparato de punto de fusión Fischer-Johns, colocando una pequeña cantidad de muestra entre dos cubreobjetos hasta observar la fusión de dicho compuesto. Como principal forma de identificación de los compuestos se utilizó la espectroscopia de infrarrojo.

RESULTADOS

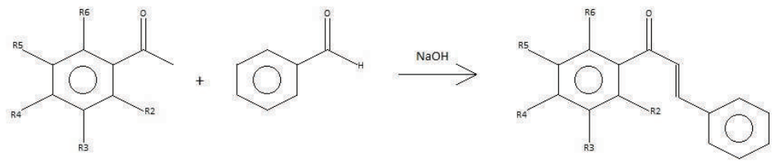


Figura 1. Reacción de síntesis de chalconas con sustituyentes en el anillo A

Tabla 1. Síntesis de chalconas con sustituyentes en el anillo A

Chalcona	Sustituyente en el anillo A[a]					Condiciones de reacción				Rendimiento, yield (%)	Punto de Fusión, m.p. (°C)
	R2	R3	R4	R5	R6	Tiempo de reacción (min)	Temperatura (°C)	Potencia µw (W)[b]	Soln. para la cristalización		
1	OH	H	OH	H	H	10	25	x	EtOH	-	-
2	OH	H	OH	H	H	30	30	x	EtOH	1.8	-
3	OH	H	H	H	H	30	30	x	EtOH	10.8	80-84
4	OH	H	H	OH	H	120	65	x	EtOH	3.7	212-214
5	OH	H	H	OH	H	5	65	300	EtOH	10.2	214-216
6	OH	H	H	OH	H	5	65	300	EtOH	11	212-214
7	OH	H	H	OH	H	15	65	300	EtOH	-	-

[a] Sustituyentes en la posición según muestra la figura 1.
[b] En las síntesis en las que no se empleó microondas se muestra (x)
- Indica que no se realizó esta prueba.

3. 1-(2'-Hydroxyphenyl)-3-phenyl-2-propen-1-one (Figura 2)
Rendimiento 10.8%; m.p.; 80-84 °C; IR (ATR) (cm^{-1}): 3048 (OH), 1637 (C=O), 1567 (C=C).
4. 1-(2',5'-Dihydroxyphenyl)-3-phenyl-2-propen-1-one (Figura 3)
Rendimiento 3.7%; m.p.; 212-214 °C; IR (ATR) (cm^{-1}): 3208 (OH), 1662 (C=O), 1627 (C=C).
5. 1-(2',5'-Dihydroxyphenyl)-3-phenyl-2-propen-1-one (Figura 4)
Rendimiento 10.2%; m.p.; 214-216 °C; IR (ATR) (cm^{-1}): 3228 (OH), 1641 (C=O), 1614 (C=C).
6. 1-(2',5'-Dihydroxyphenyl)-3-phenyl-2-propen-1-one (Figura 5)
Rendimiento 11%; m.p.; 212-214 °C; IR (ATR) (cm^{-1}): 3206 (OH), 1662 (C=O), 1627 (C=C).
7. 1-(2',5'-Dihydroxyphenyl)-3-phenyl-2-propen-1-one (Figura 6)
IR (ATR) (cm^{-1}): 3320 (OH), 1680 (C=O), 1620 (C=C).

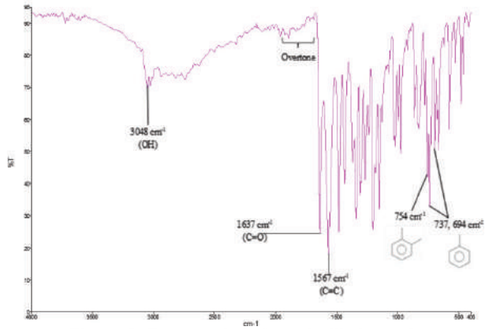


Figura 2. Espectro de Infrarrojo Chalcona 3.

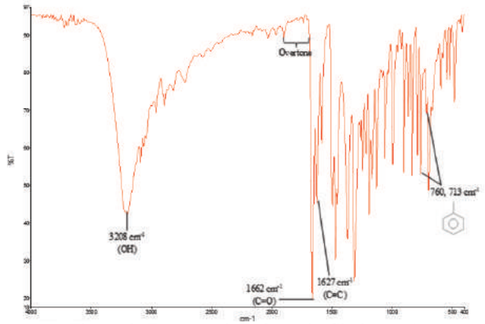


Figura 3. Espectro de Infrarrojo Chalcona 4.

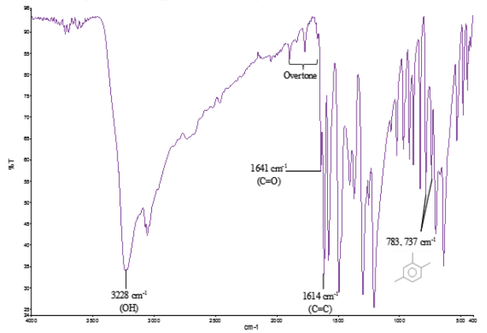


Figura 4. Espectro de Infrarrojo Chalcona 5

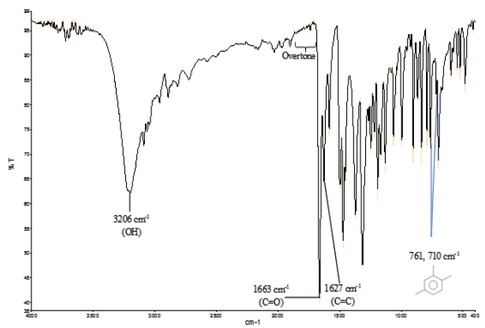


Figura 5. Espectro de Infrarrojo Chalcona 6

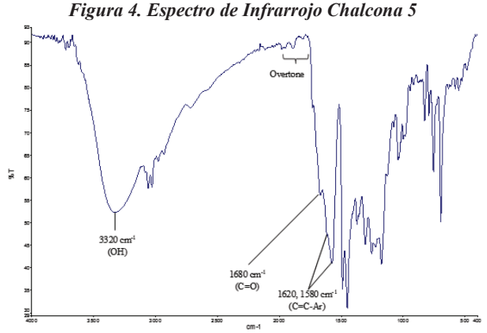


Figura 6. Espectro de Infrarrojo Chalcona 7

DISCUSIONES

Según reportan Lin, et al. (1997), la 1-(2'-Hydroxyphenyl)-3-phenyl-2-propen-1-one (2'-Hidroxichalcona) tiene un punto de fusión de entre 83 a 84 °C, así como también reportan un punto de fusión de entre 165 a 166 °C para la 2',5'-Dihidroxichalcona. Asimismo, Raghav & Garg (2014) reportan diferentes 2'-hidroxichalconas que, analizadas por espectroscopia de infrarrojo, mostraban señales en las regiones de 3100-3000, 1630-1600 y 1600-1450 cm^{-1} asignados a (OH), (C=O) y (C=C) aromático, respectivamente.

En la Figura 6, correspondiente a la chalconas 7, esta muestra claras diferencias con respecto a los espectros de las chalconas 4, 5 y 6, las cuales son similares entre sí. La variación de esto puede ser debido a la formación de productos secundarios según mencionan Rayar, Sylla-Iyarreta, & Ferroud (2015) a causa de las diferentes condiciones de reacción, en este caso, el aumento del tiempo de reacción.

CONCLUSIONES

Las hidroxichalconas son compuestos con una aplicación biológica importante, de la cual destaca la acción antitumoral y cancerígena, de ahí surge el gran interés por obtener estos compuestos de manera sintética con altos rendimientos al igual que un grado de pureza considerable. Sin embargo, también se buscan metodologías sencillas las cuales puedan llevarse a cabo con una mayor rapidez y los cuales no impliquen el uso de solventes o sustancia que represente un riesgo al ambiente, así como tampoco sean difíciles de separar o eliminar del producto. La constante búsqueda de nuevas metodologías ha llevado a la implementación metodologías como el uso de radiación de microondas la cual tiene notorias ventajas contra diferentes metodologías, principalmente la reducción del tiempo de reacción. Como ya se mencionó las chalconas son importantes precursores para la producción de otros flavonoides, en específico las hidroxichalconas son empleadas como precursor para la síntesis de flavanonas, los cuales son compuestos de igual interés biológico sin embargo su síntesis es reportada en menor medida que otros flavonoides y los esfuerzos que se han hecho para su síntesis han obtenido rendimientos bajos.

BIBLIOGRAFIA

Chauhan, R., Dwivedi, J., Siddiqi Anees, A. A., & Kishore, D. (2011). SYNTHESIS AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF CHALCONE DERIVATIVES OF INDOLE NUCLEUS. *Pharmaceutical Chemistry Journal, 44*(10), 542–550.

Krishnakumar, B., & Swaminathan, M. (2011). Solvent free synthesis of quinoxalines, dipyridophenazines and chalcones under microwave irradiation with sulfated Degussa titania as a novel solid acid catalyst. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical, 350*, 16-52.

Kumar, R., Sharma, P., Shard, A., Kumar Tewary, D., Nadda, G., & Kumar Sinha, A. (2012). Chalcones as promising pesticidial agents against diamondback moth (Plutella xylostella): microwave-assisted synthesis and structure-activity relationship. *Medical Chemistry Research, 21*, 922-931.

Lin, C.-N., Lee, T.-H., Hsu, M.-F., Wang, J.-P., Ko, F.-N., & Teng, C.-M. (1997). 2',5'-Dihydroxychalcone as a Potent Chemical Mediator and Cyclooxygenase Inhibitor. *Journal of Pharmacy and Pharmacology, 49*(5), 530-536.

Modolo, L. V., Blount, J. W., Achnine, L., Naoumkina, M. A., Wang, X., & Dixon, R. A. (2007). A functional genomics approach to (iso)flavonoid glycosylation in the model legume Medicago truncatula. *Plan Molecular Biology, 64*, 499-518.

Raghav, N., & Garg, S. (2014). SAR studies of o-hydroxychalcones and their cyclized analogs and study them as novel inhibitors of cathepsin B and cathepsin H. *European Journal of Pharmaceutical Sciences, 60*, 55-63.

Rayar, A., Sylla-Iyarreta, M., & Ferroud, C. (2015). An efficient and selective microwave-assisted Claisen-Schmidt reaction for the synthesis of functionalized benzalacetones. *SpringerPlus, 4*, 221.

Seijas, J. A., Vázquez-Tato, M. P., & Carballido-Reboredo, R. (2005). Solvent-Free Synthesis of Funtional Flavones under Microwave Irradiation. *The Journal of Organic Chemistry, 70*(7), 2855-2858.

Sheldon, R. A. (2005). Green solvents for sustainable organic synthesis: state of the art. *Green Chemistry Journal, 7*(5), 267-278.

Won, S.-J., Liu, C.-T., Tsao, L.-T., Weng, J.-R., Ko, H.-H., Wang, J.-P., & Lin, C.-N. (2005). Synthetic chalcones as potential anti-inflammatory and cancer chemopreventive agents. *European Journal of Medicinal Chemistry, 40*, 103-112.

OBTENCION Y CARACTERIZACION DE PELICULAS POLIMERICAS Y TIO2, ESTUDIO DE SU APLICACIÓN EN LA DEGRADACION DE COLORANTES CONTENIDOS EN FASES ACUOSAS

Diana Alejandra Montoya Lara[1] y María del Pilar González Muñoz[2]

RESUMEN

Se reporta la preparación de películas catalíticas de alcohol polivinilico a diferentes concentraciones (10, 15, 20, 25 y 30%) barnizadas con nanopartículas de TiO_2, ya que el TiO_2 posee propiedades fotoconductoras y fotocatalíticas que lo presentan como uno de los óxidos de mayor impacto en la degradación de compuestos orgánicos. La eficiencia foto catalítica de estas películas se probó en la degradación del Naranja de metilo en soluciones acuosas. Las películas obtenidas fueron caracterizadas mediante espectroscopia raman y medidas de ángulo de contacto.

ABSTRACT

The preparation of polymer films of polyvinyl alcohol in different concentrations (10, 15, 20, 25 and 30 %) being varnished with nano TiO2 particles is reported as TiO2 has photoconductive properties and photocatalytic that present it as one of the oxides the greatest impact on the degradation of organic compounds introduced to an aqueous solution of methyl orange with acetic acid (pH 2) at 50 ppm , observed in the UV -Vis spectrophotometer its absorption rate reaching 50 % at 120 min . These materials were made in raman spectroscopy characterization and contact angle

Palabras Clave: *TiO_2, Películas Poliméricas, Alcohol polivinilico, Colorantes*

INTRODUCCIÓN

La industria textil es una de las más importantes de nuestro país. Sin embargo, es una de las industrias con mayor consumo de agua y las aguas residuales que se generan contienen un gran número de contaminantes de diferente naturaleza. Entre los contaminantes se destacan los colorantes. Estos compuestos se diseñan para ser altamente resistentes, incluso a la degradación microbiana, por lo que son difíciles de eliminar en las plantas de tratamiento convencionales. Los colorantes, aún a bajas concentraciones, son altamente visibles y, dependiendo del proceso usado y de la normatividad vigente (por ejemplo, 1 ppm como concentración límite permisible en ríos para el caso del Reino Unido), es posible requerir de una reducción hasta del 98% de la concentración del colorante presente en el efluente industrial. Por esta razón, existe una fuerte demanda de tecnologías que permitan eliminar el color en estos efluentes y así hacer posible reciclar el importante volumen de agua que se consume durante el proceso.

El color pocas veces es considerado como un contaminante, sin embargo varios efluentes coloreados, poseen una alta cantidad de bioacumulacion y una baja velocidad de despolimerización generando la acumulación a largo plazo en lagos y bahías provocando una disminución del poder absorbente del agua y por ende una disminución en la actividad fotosintética de los organismos presentes en dichos ecosistemas y disminuyendo el oxígeno disuelto en el sistema. Varios procesos de eliminación de

1 Universidad Autónoma de Zacatecas, Químico en Alimentos; CAMPUS UAZ-SIGLO XXI carreteraGuadalajara KM 6, Ejido La Escondida, C.P: 98160, Zacatecas, Zacatecas, dianilla_ochoa@hotmail.com

2 Universidad de Guanajuato, División de Ciencias Naturales y Exactas, Departamento de Química, Cerro de la Venada s/n, Pueblito de Rocha, Guanajuato, Guanajuato, C.P. 36040, gomupi@ugto.mx.

colorantes de soluciones acuosas se han desarrollado, dentro de los que encontramos distintos procesos físicos, químicos y biológicos [3-5]:

a) Métodos fisicoquímicos: Adsorción sobre carbón activado y zeolitas.
b) Técnicas de filtración: micro/ultra/nanofiltración y ósmosis inversa.
c) Sedimentación / precipitación del tratamiento con coagulación / floculación.
d) Tratamientos electroquímicos.
e) Tratamiento biológico: biodegradación, descomposición enzimática.

Generalmente, estas técnicas a pesar de remover los colorantes con gran eficacia, presentan serios problemas como contaminación secundaria y altos costos de operación. Recientemente se han realizado estudios para la eliminación de colorantes en el área de la degradación fotocatalítica y fotocatálisis heterogénea ya que puede llevarse a cabo en diversos medios: fase gaseosa, fases orgánicas líquidas o soluciones acuosas.

El TiO_2 es un fotocatalizador muy conocido debido a que es fotocatalíticamente estable, química y biológicamente inerte. Se conoce que la velocidad de degradación de TiO_2 en la fotocatálisis heterogénea depende en gran medida de la capacidad de adsorción que esta asociada con la superficie específica. Sin embargo, tiene restricciones cuando las partículas se utilizan en tamaños nanométricos tales como la inmovilización, dispersión de las mismas y sobre todo problemas de reciclaje. Es por eso que en la actualidad se ha iniciado la búsqueda de un soporte eficiente para dicho catalizador. Entre los principales materiales que han sido utilizados como soporte son vidrio, polímeros, materiales cerámicos como la alúmina, carbón activado entre otros [8].

Una alternativa es formar un material híbrido TiO_2/polímero produciendo un nuevo material con mejores propiedades eléctricas, térmicas, ópticas y mecánicas [12-15]. El alcohol polivinílico es un polímero biodegradable e hidrofílico con múltiples usos en la preparación de materiales plásticos para la industria textil y farmacéutica. Debido a esto en este trabajo se propone la obtención de películas de alcohol polivinílico como soporte de nanopartículas de TiO_2.

MÉTODOS Y MATERIALES

La solución coloidal del TiO_2 se preparará por hidrólisis controlada mediante el goteo del alcóxido (isopropóxido y butóxido de titanio) diluido en etanol sobre una solución ácida. La solución resultante se dejará en agitación constante durante un período de 18 horas y a una temperatura de 5 °C.

Las películas de alcohol polivinílico se prepararon a partir del polvo de PVA a diferentes concentraciones (p/v) en agua desionizada y fueron goteadas en una superficie de vidrio.
Se prepararon diferentes soluciones de Naranja de Metilo a 50 ppm a pH 2, en una solución de ácido acético. A partir de esta solución se prepararon soluciones de 10 ppm para los experimentos realizados.

1.- Se llevó a cabo el estudio de adsorción del colorante sobre las películas de PVA en ausencia del TiO_2, en función del tiempo.
2.- Las películas catalíticas se obtuvieron ensamblando el TiO2 a las películas de PVA mediante la metodología de barnizado.
3.- Las películas catalíticas obtenidas fueron evaluadas en la degradación de las soluciones de Naranja de Metilo, se llevaron a cabo cinéticas de degradación e isotermas. Utilizando una lámpara de UV (UVP de 6 watts a 60 Hz y con una longitud de onda de 254-365 nm).

El control analítico se realizó por medio de espectrofotometría Uv/Vis, a una longitud de onda de 458 nm.

RESULTADOS

Primente se llevó a cabo la cinética de adsorción de naranja de metilo sobre las películas obtenidas de PVA a diferente concentración, estos resultados se muestran en la Figura 1. Podemos observar en esta figura que la adsorción de naranja de metilo es similar para las películas de 10 a 25 % de PVA, teniendo adsorciones menores al 10%, este comportamiento es prácticamente constante en todo el tiempo de estudio. Cuando la película se hace con 30 % de PVA se observa un incremento importante en la adsorción, para esta película se observa que la adsorción se incrementa con el tiempo, llegando a un máximo del 18%..A partir de estos resultados se decidió trabajar con películas al 20 % de PVA, pues además de tener una bja adsorción de colorante estas presentan una mayor estabilidad cuando se sumergen en la solución ácida de naranja de metilo. Con concentraciones menores las películas comienzan a deshacerse al finalizar el experimento.

Una vez realizado el estudio de adsorción y de la determinación de concentración de PVA más adecuada para la preparación de las películas, se llevó a cabo el soporte de las nanopartículas de TiO_2 sobre las películas mediante la metodología de barnizado, esta metodología fue desarrollada previamente en el laboratorio.

Una vez obtenidas las películas catalíticas se llevó a cabo el estudio de la degradación del naranja de metilo utilizando estas películas, en función del tiempo, esto lo podemos observar en la Figura 2.

Podemos observar que las películas catalíticas si degradan al naranja de metilo y que el porcentaje de degradación se incrementa con el tiempo, la cinética es lenta pues se requieren de 7 horas para obtener el máximo de degradación (80%).

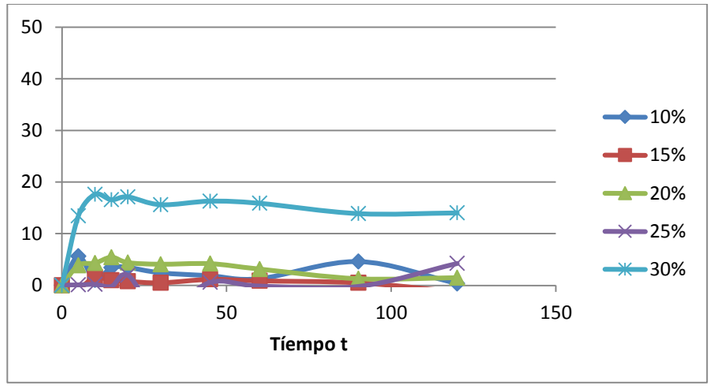


Fig. 2 Cinetica de absorción de Naranja de Metilo sobre películas de PVA.

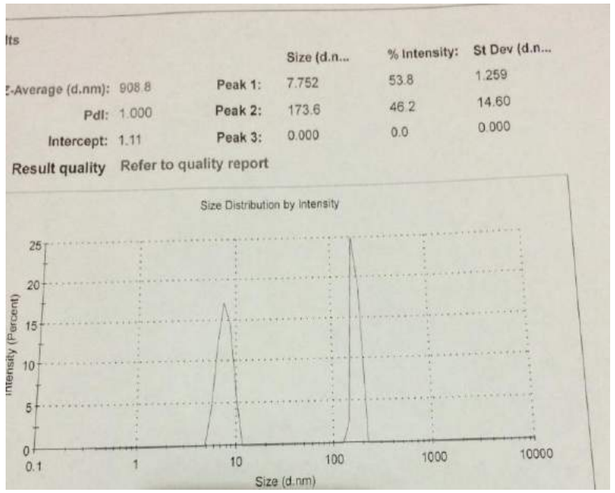


Fig. 1 Tamaño de partícula de TiO2.

Al medir en el tamaño de partícula del TiO2 se obtuvieron picos estables lo que demostró que hubo partículas de un mismo tamaño homogéneas.

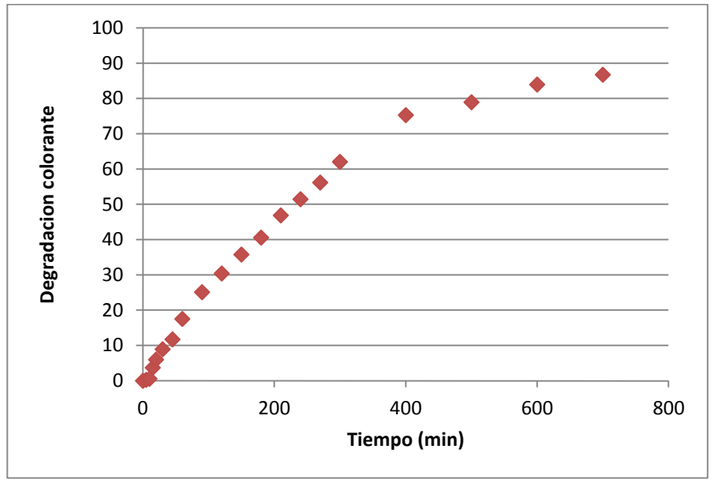


Fig. 3 Degradación del colorante utilizando las películas de PVA con TiO2.

Teniendo las condiciones de degradación del naranaja de metilo utulizando las películas catalítcas, se llevó a cabo un estudio dela variación de la concentración del colorante en la solución inicial, los experimentos se hicieron para 180 minutos (Figura 3) Podemos observar que cuando se utiliza una concentración inicial de 30 ppm se tiene un comportamiento similar al observado cuando se utilizan 10 ppm, es decir la degradación se incrementa con el tiempo hasta llegar a un 35 %, este porcentaje es un

poco menor al observado para 10 ppm para ese tiempo (40 %). Sin embrago cuando se utilizan concentraciones mayores ya no se observa este comportamiento y solo se logra obtener un 10 % de degradación, este comportamiento es el esperado pues de acuerdo a la bibliografía consultada se comprobó que la eficiencia disminuye por el aumento de la concentración del colorante pues los sitios activos del TiO_2 quedan cubiertos por los iones del colorante inactivando al catalizador, entre menos colorante más se favorecerá la degradación del colorante.

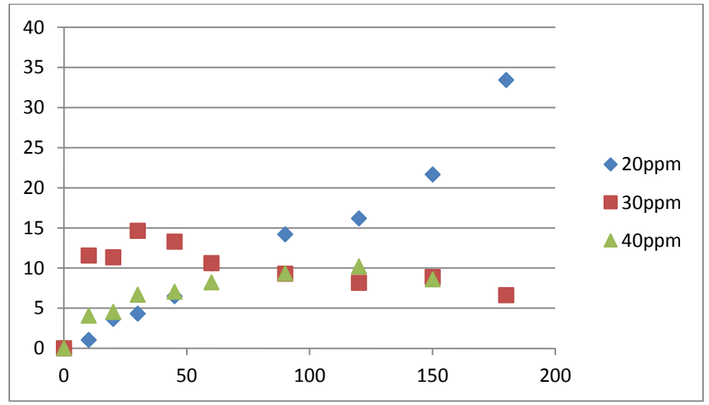


Fig. 4 Isotermas de Naranja de metilo

Al final l la caracterización que se realizo fue la medición de ángulo de contacto donde se observó la hidrofobicidad y en que tiempo se absorbía la gota en la película.

Fig. 5 Medición de ángulo de contacto

CONCLUSIONES

Se lograron obtener películas de PVA, las películas con menor adsorción de colorante y buena estabilidad son aquellas que se prepararon utilizando una solución de PVA al 20 % (p/v).

Con las películas catalíticas se lograron obtener porcentajes de degradación cercanos al 80%. Al incrementar la concentración de colorante disminuye la eficiencia catalítica de las membranas, lo cual indica que para trabajar concentraciones mayores de colorante debemos incrementar la cantidad de TiO2 en las películas.

BIBLIOGRAFIA

1.- J. Blanco et al., "Eliminación de Contaminantes por Fotocatálisis Heterogénea," en Diseño de Reactores para fotocatálisis, evaluación comparativa de las distintas opciones, M. Blesa, ed., pp. 243-266, Mar del Plata: Red CYTED VIII-G, 2001.

2.-CABRERA, J. (2007). "Preparación y caracterización de películas de alcohol poli vinílico contenido en nanoparticulas de TiO2" en *Revista Iberoamericana de polímeros*, Vol.VIII, [pp. 323-332].

3.-C.M. Gómez, G. Del Angel, F. Tzompantzi, R. Gómez, L.M. Torres-Martínez. (March 24, 2012). Photocatalytic degradation of p-cresol on Pt/Al2O3–TiO2 mixed oxides: Effect of oxidizing and reducing pre-treatments. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 236, 21–25.

4.- Sung H, Seung-Yeop K,∗, Byeong-Hyeok S, Tai H (2003) "Design of TiO2 nanoparticle self-assembled aromatic polyamide thin-film-composite (TFC) membrane as an approach to solve biofouling problem*" en Journal of Membrane Science.* [pag. 157-165]

BÚSQUEDA DE GENES DEL HONGO *METARHIZIUM* IMPPLICADOS EN LA INTERACCIÓN Y BENEFICIO, EN LA RIZÓSFERA DE PLANTAS DE *SORGHUM VULGARE*

Mora Garduño Josué Daniel[1] y Padilla Guerrero Israel Enrique[2]

RESUMEN

Metarhizium es un ascomiceto con un doble estilo de vida al ser entomopatógeno y endófito en plantas, además de asociarse a sus raíces; llevando a cabo una simbiosis mutualista con plantas. Por tales características tienen una potencial aplicación en cultivos agrícolas al ser utilizado como biocontrol de pestes de insectos y favoreciendo el crecimiento en plantas. Por lo tanto es indispensable entender la interacción planta-hongo-insecto. En el presente trabajo se analizó la expresión en *Metarhizium brunneum* CARO19 de los genes CHITCBM1, CH1, CHI2 y CHI3, en medios con diferente fuente de nitrógeno y de carbono que se pueden encontrar en los exudados de las raíces de las plantas, para estudiar si estos nutrientes podrían activar la expresión génica. Se analizó también la expresión de estos genes de la interacción *in vitro* del hongo con raíces de *Sorghum vulgare* y con medios que de cutículas de *G. mellonella* y de *G. portentosa*. Los resultados muestran una expresión diferencial génica.

ABSTRACT

Metarhizium is an ascomycete with a double lifestyle as entomopathogenic and endophyte in plants. In addition is associated with their roots, conducting a mutualistic symbiosis with plants. For these characteristics has a potential application in agricultural crops to be used as biocontrol of insect pests and promoting growth in plants. It is therefore essential to understand the plant-fungus-insect interaction. In the aim to study which media with different nitrogen and carbon source that can be found in the root exudates of plants could activate gene expression, the expression was analyzed in *Metarhizium brunneum* CARO19 of CHITCBM1, CH1, CHI2 and CHI3 genes. *In vitro* expression of these genes during interaction between fungus and *Sorghum vulgare* roots and in media with *G. mellonella* and *G. portentosa* cuticle was also analyzed. The results show a differential gene expression.

Palabras Clave: Ascomiceto, entomopatógeno, endófito, simbiosis mutualista, quitinasas.

INTRODUCCIÓN

Metarhizium es un hongo ascomiceto del orden de los hipocreales (NCBI), que se encuentra distribuido en una variedad de ecosistemas en todo el mundo; desde el ártico hasta ecosistemas tropicales (Hajek y St. Leger, 1994) y se produce en los suelos hasta 10^6 propágulos por gramo (Milner, 1991). Es un hongo con un estilo de vida multifuncional, ya que es endófito y patógeno de insectos (Behie *et al*., 2013).

Se ha reportado la asociación de *Metarhizium* con las raíces de plantas mono y dicotiledóneas, in vitro y en campo, favoreciendo la proliferación de pelos radiculares (Sasan RK y Bidochka RJ, 2012) y promoviendo el crecimiento de las plantas (Liao X *et al*. 2014). También se ha reportado que transfiere nutrientes, como el nitrógeno, del insecto que infecta hacia la planta hospedera a través del micelio y a cambio recibe nutrientes como fuente de carbono por parte de la planta (Behie *et al*., 2012). Por lo que *Metarhizium* lleva a cabo una simbiosis mutualista con plantas.

[1]División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato; Noria Alta S/N, Col. Noria Alta, C.P: 36050, Guanajuato, Gto., jhosdj@live.com.mx
[2]Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato; Noria Alta S/N, Col. Noria Alta, C.P: 36050, Guanajuato, Gto., ie.padillaguerrero@ugto.mx

Metarhizium puede infectar a más de 200 especies de insectos (DW Roberts y AE Hajek, 1992), pero dentro del género del hongo hay especies con un rango restringido de insectos hospederos, mientras que otras tienen un amplio rango de hospederos y a través de un análisis genómico se ha demostrado que en su evolución *Metarhizium* ha pasado de ser especialista a generalista, pasando por especies transicionales, en el rango de hospederos (Xiao Hu *et al*., 2014).

En general, *Metarhizium* presenta un genoma de alrededor de 40 Mb y dentro del cual están contenidos alrededor de 11,000 genes (NCBI), entre estos genes se han reportados algunos que están implicados en la interacción de *Metarhizium* con la planta y el insecto que mata. Los genes *Mad1* (*Metarhizium* adhesin-like protein 1) y *Mad2* (*Metarhizium* adhesin-like protein 2) codifican para adhesinas involucradas en la patogénesis con el insecto y la asociación a plantas, respectivamente (Wang C y St. Leger RJ, 2007). El gen *Mrt* (*Metarhizium* raffinose transporter) codifica para un transportador de sacarosa y galactósidos en *Metarhizium* y es requerido para la exitosa colonización de la raíz (Fang W y St. Leger RJ, 2010). Se ha reportado en la especie *Metarhizium robertsii* contiene el gen *MrInv* que codifica para una invertasa extracelular, que se produce sobre las raíces de las plantas, y es responsable de la hidrólisis de la sacarosa como fuente de carbono, pero que a su vez limita el grado de la colonización de la raíz durante su asociación con la planta (Liao X *et. al*, 2013). Así mismo, los genes *chit1*, *chi2* y *chi3*, son genes que codifican para quitinasas; las cuales son enzimas que hidrolizan enlaces β-1,4 de la quitina propia y no propia y que son indispensables en la remodelación de la pared celular y modificación del tipo celular y afectan significativamente la infección en insectos (Junges A *et. al*, 2014).

El potencial de *Metarhizium* para controlar pestes de insectos en agroecosistemas ha sido conocido desde comienzos del siglo XX (Madelin, 1963), y numerosas formulaciones de *M*etarhizium han sido aprobadas para su uso en protección a campos (Faria y Wraight, 2007; Castrillo *et al*. 2011).

Dada la importancia de *Metarhizium* como biocontrol de pestes de insectos en cultivos, y tomando en cuenta que México es el tercer mayor productor del mundo, y el primer importador mundial de sorgo (*Sorgum vulgare)*, y el estado de Guanajuato es el segundo productor a nivel nacional (Herrera Gutiérrez RJ, 2016), es de suma importancia el estudio y la comprensión de la interacción planta-*Metarhizium*-insecto, para su aplicación en cultivos.

En el presente trabajo se analizó la expresión in vitro de los genes *chit1*, *ch1*, *chi2* y *chi3*, en la cepa CARO19 de *Metarhizium brunneum*, al ponerlo en interacción con raíces de *Sorghum vulgare* y con medios de cutícula de *Galleria mellonella* y *Gromphadorhina portentosa*. Así mismo, se analizó la posible activación en la expresión de estos genes al inocular el hongo en diferentes condiciones, en las cuales se varió la fuente de carbono y de nitrógeno.

MÉTODOS Y MATERIALES

Se inoculó 1×10^6 conidios de una suspensión conidial de la cepa CARO19 de *M. brunneum* en 50 mL de medio M100, en el cual se varió la fuente de nitrógeno (urea o nitrato de potasio) y de carbono (Glucosa, celobiosa y xilosa) y se incubaron a 28℃, con agitación, por 36 h. Terminado el tiempo de incubación, se filtró el micelio.

Para la interacción del hongo con las cutículas de insecto, se inoculó medios de cutículas de *G. mellonela* y de *G. portentosa* al 1% (0.25g de cutícula en 25 mL de agua destilada estéril) con 1×10^6 conidios. Se incubó medios inoculados a 28℃, con agitación, por 36 h. Terminado el tiempo de incubación, se filtró el micelio.

Para la interacción del hongo con la planta, se inocularon las raíces de semillas de *Sorghum vulgare* a los 7 días de haber germinado, por inmersión en 50 mL de una dilución que contenía 1×10^6 conidios. Se

colocó las raíces de las semillas en cajas Petri con medio agar-agua y se incubó a 28℃, con fotoperiodo de luz-obscuridad de 12:12 h, por 2 y 4 días. Terminado el tiempo de incubación, se cortaron las raíces con micelio y se almacenó a −70℃, por 12 h.

Se llevó a cabo la extracción de RNA de los micelios provenientes de las interacciones del hongo con cutículas de insectos, del micelio proveniente de las distintas condiciones de carbono y nitrógeno, y del micelio de las interacciones con raíces de *S. vulgare* a los 2 y 4 días. La extracción se realizó por el método de TRIzol.

Una vez extraído el RNA, se realizó una RT-PCR para obtener cDNA, utilizando el Kit Thermo Script™ RT-PCR System.

Ya obtenido el cDNA, se llevó a cabo la amplificación de los genes *CHITCBM1*, *CH1*, *CHI2* y *CHI3*, por PCR utilizando el Kit JumpStart™ *Taq* ReadyMix™. Los oligonucleótidos iniciadores que se utilizaron para cada gen se muestran en la tabla 1. La programación del termociclador para la PCR fue, desnaturalización inicial 1 minuto a 95℃, después 25 ciclos de, desnaturalización 20 segundos a 95℃; alineamiento, 1 minuto a 60℃; extensión, 1 minuto a 72℃, y extensión final, 5 minutos a 72℃.

Los genes amplificados se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2%, y empelando SYBR® Safe.

Tabla 1. Primers empleados para la analizar la expresión de los genes CHIT1, CH1, CHI2 y CHI3

Gen	Primers
UBIQ (Control)	U: 5'-TTGGGGCGAAATCATCACGA L: 5'-CCCCGAAGCCCATATCCAGAG
CHITCBM 1	U: 5'-CAGGCGACCAATGGCAAAACAATC L: 5'-GGGAGCGGCGGTGAGGTAGAACT
CH1	U: 5'-CGGGAAGAACTCGACGCATACG L: 5'-GAACCGGAAAAGTCATAGGCCATCAAAT
CHI2	U: 5'-CGGCGGTGCGACGAGCTCTTATTCC L: 5'-GCGTTGCCGTTGATTCCCAGTGC
CHI3	U: 5'-GATGGCGTCGACCTGGATAATGAAACA L: 5'-TCTTGACGGCCTTGGCGAACCCTCTT

RESULTADOS

Los resultados de los genes amplificados del micelio crecido en las distintas condiciones de fuente de carbono y de nitrógeno, se muestran en la figura 1.

Los genes que se expresaron al tener interacción *Metarhizium brunneum* CARO19 con las cutículas de insectos y las raíces de *Sorghum vulgare*, se muestran en la figura 2.

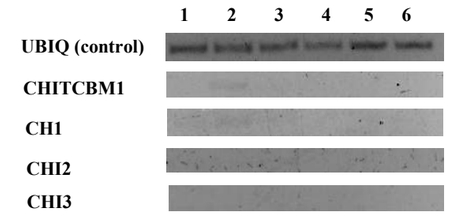


Figura 1. Análisis de la expresión de genes en M. bruenneum Caro19 en medio M100, al estar en distintas condiciones: 1)Urea y glucosa, 2) urea y celobiosa,3)urea y xilosa, 4) KNO_3 y glucosa, 5) KNO_3 y celobiosa, 6) KNO_3 y xilosa.

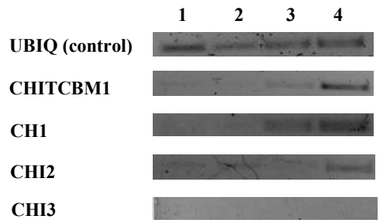


Figura 2. Análisis de la expresión de genes en M. brunneum CARO19 al estar en contacto con: Raíces de sorgo por 1) 2 días, 2) 4 días; 3) cutícula de G. portentosa y 4) cutícula de G. mellonella.

El gen CHITCBM1 (figura 2) se expresó en las interacciones con las raíces de *Sorghum vulgare*, pero tuvo una mayor expresión en la interacción con las cutículas de insectos. El gen CHITCBM1 que pertenece al subgrupo A de la familia de las quitinasas, se ha reportado que en *M. anisopliae* codifica para las enzimas involucradas en el crecimiento y autolisis fúngico (Junges A *et. al*, 2014). También tuvo expresión en medio con urea y celobiosa (figura 1) como fuentes de nitrógeno y de carbono, respectivamente, por lo que estos nutrientes podrían activar su expresión del gen CHITCBM1.

El gen CH1 sólo se expresó en las interacciones con las cutículas de *G. mellonella* y de *G. portentosa* (figura 2), por lo que su función podría estar implicada en la interacción de Metarhizium con insectos. Hubo muy poca expresión de este gen en medio con urea y celobiosa (figura 1), por lo que estos nutrientes también podrían estar involucrados en la activación del gen CH1.

Para el gen CHI2 hubo expresión en la interacción de *M. brunneum* CARO19 con cutícula de *G. mellonella*, pero no con la cutícula de *G. portentosa*. También se expresó el gen en la interacción con las raíces de *Sorghum vulgare*, teniendo mayor expresión a los 4 días de interacción. Para el gen CHI2, que pertenece al subgrupo B de la familia de las quitinasas, en *M. anisopliae* se ha reportado está involucrado en funciones nutricionales y de virulencia en insectos (Junges A *et. al*, 2014).

El gen CHI3 no se expresó en ninguna de las interacciones con raíces de *Sorghum vulgare* como de cutículas de insectos (figura 2). Tampoco hubo expresión de este gen en las distintas condiciones de fuente de carbono y de nitrógeno (figura 1). Para este gen CHI3, que pertenece al subgrupo B de la familia de las quitinasas, en *M. anisopliae* se ha reportado está involucrado en funciones nutricionales y de virulencia en insectos, al igual que el gen CHI2 (Junges A *et. al*, 2014).

CONCLUSIONES

El análisis de la expresión génica de 4 genes que pertenecen a la familia de las quitinasas, muestra una expresión diferencial en las interacciones con las raíces de plantas y con las cutículas de insectos, teniendo mayor expresión al interaccionar *Metarhizium* con las cutículas de insectos, por lo que se requiere llevar a cabo un análisis más amplio de los demás miembros restantes que conforman a las quitinasas de la familia GH18, para tener un estudio más completo de la posible función de estos genes implicados en la interacción de *Metarhizium* con plantas e insectos.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la beca otorga al alumno Josué Daniel Mora Garduño por parte del 18º Verano de la Ciencia Región Centro.

Agradecemos los apoyos económicos para la realización de este proyecto de Investigación:
Universidad de Guanajuato
1.- Apoyos Institucionales para fortalecer la excelencia académica 2015 y 2016, convenios 003/2015 y 017/2016 respectivamente.

Apoyos Externos
1.- Desarrollo Científico para Atender Problemas Nacionales Problemas Nacionales 2014 convenio 248622
2.- SEP: PROMEP UGTO-PTC-327

BIBLIOGRAFIA

Páginas de internet

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/2190

Artículos de revista

Hajek AE, St Leger RJ. (1994). “Interactions between fungal pathogens andinsect hosts”. Annu. Rev. Entomol. Vol. 39 [pp. 293–322]. http://dx.doi.org/10.1146/annurev.en.39.010194.001453.

Milner RJ. (1991). Biological Control of Locusts and Grasshoppers, C. J. Lomer, C. Prior, Eds. (CAB International, Wallingford, UK), [pp. 200–207]

Behie SW, Padilla-Guerrero IE and Bidochka MJ. (2013). “Nutrient transfer to plants by phylogenetically diverse fungi suggests convergent evolutionary strategies in rhizospheric symbionts”. Communicative & Integrative Biology 6:1, e22321.

Sasan RK, Bidochka MJ. (2012). “The insect-pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* (clavicipitaceae) is also an endophyte that stimulates plant root development”. American Journal of Botany. Núm. 1, Vol. 99, Enero, [pp. 101-107].

Liao X, O’Brien TR, Fang W, St. Leger RJ. (2014). “The plant beneficial effects of *Metarhizium* species correlate
with their association with roots”. Appl Microbiol Biotechnol. Vol. 98, [pp. 7089–7096].
Behie SW, Zelisko PM, Bidochka MJ.(2012). “Endophytic insect-parasitic fungi translocate nitrogen directly from insects to plants”. Science; Vol. 336 [pp 1576-1577]; PMID:22723421; http://dx.doi.org/10.1126/science.1222289.

DW Roberts, AE Hajek. (1992). “Entomopathogenic fungi as bioinsecticides”.In Leathan GF (ed), Frontiers in industrial mycology.Chapman & Hall, New York, NY. [pp. 144–159].

Xiao Hu, *et al*. (2014). “Trajectory and genomic determinants offungal-pathogen speciation and host adaptation”. PNAS. Núm. 47. Vol. 111, Noviembre, [pp. 16796-16801].

Wang C, St. Leger RJ. (2007). “The MAD1 adhesin of Metarhizium anisopliae links adhesion with blastospore production and virulence to insects and the MAD2 adhesin enables attachment to plants”. Eukaryot Cell. Vol. 6, [pp. 808–816].

Fang W y St. Leger RJ. (2010). “Mrt, a Gene Unique to Fungi, Encodes an Oligosaccharide Transporter and Facilitates Rhizosphere Competency in Metarhizium robertsii”. Plant Physiology. Vol. 54, Noviembre, [pp. 1549-1557].

Liao X, Fang W, Lin L, Lu H-L, St. Leger RJ. (2013). "*Metarhizium robertsii*" Produces an Extracellular Invertase (MrINV) That Plays a Pivotal Role in Rhizospheric Interactions and Root Colonization. PLoS ONE.Núm.10, Vol. 8, Octubre. [pp. 1-14].

Junges A, Boldo JT, Souza BK, Guedes RLM, Sbaraini N, et al. (2014). "Genomic Analyses and Transcriptional Profiles of the Glycoside Hydrolase Family 18 Genes of the Entomopathogenic Fungus Metarhizium anisopliae". PLoS ONE. 9(9). Núm. 9, Vol. 9, Septiembre. [pp. 1-16].

Madelin MF. (1963). "Diseases caused by hyphomycetous fungi. In: Steinhaus E (ed) Insect pathology: an advanced treatise". Vol 2. Academic Press, New York. [pp. 233–272]

Faria MR, Wraight SP. (2007). "Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international". Classification of formulation types. Biol Control. Vol. 43, [pp. 237–256].

Castrillo LA, Griggs MH, Ranger CM, Reding ME, Vandenberg JD. (2011). "Virulence of commercial strains of Beauveria bassiana and Metarhizium brunneum" (Ascomycota: Hypocreales) against adult Xylosandrus germanus (Coleoptera: Curculionidae) and impact on brood". Biol Control. Vol. 58, [pp. 121–126].

Herrera Gutiérrez RJ. (2016). Tesis "Evaluación de la interacción de cepas de *Metarhizium* con *Sorghum vulgare*". División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato.

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y DE CAPACIDAD LIPOLÍTICA DE UNA POBLACIÓN DE AISLADOS DE Y. *LIPOLYTICA*

Stephany Alejandra Mora Macías[1] y Adán Topiltzin Morales Vargas[2]

RESUMEN

Yarrowia lipolytica es una levadura capaz de secretar una lipasa extracelular a la cual se le ha dado diversos usos, entre estos destaca la elaboración de biocombustibles. *Y. lipolytica* muestra heterogeneidad en cuanto a sus capacidades enzimáticas. Es importante evaluar esta capacidad en diversas cepas obtenidas de muestras de productos cárnicos y lácteos. Se realizó el aislamiento de levaduras, la caracterización bioquímica para la identificación de *Y. lipolytica* y se llevó a cabo una prueba con rodamina B para la determinación de las capacidades lipolíticas. De las cepas aisladas, 19 fueron positivas en la prueba con rodamina. Las diferencias en las capacidades lipolíticas de los aislados ayudarán a determinar cuáles cepas tienen potencial para su uso en biotecnología.

ABSTRACT

Y. lipolytica is a yeast capable of secreting an extracellular lipase which has been given various uses, for example the production of biofuels. *Y. lipolytica* shows heterogeneity in this enzymatic capability. Is important to evaluate this capability in different strains obtained in samples of dairy and meat products. For this is has been made the isolation of yeast from the samples before mentioned, a biochemical characterization for the identification of *Y. lipolytica* and a test with rhodamine B for the determination of the lipolytic activity of the isolates. Of the isolated strains, 19 given positive in the rhodamine test. The differences in the lipolytic capabilities of the isolates will help to determine which of them have potential for their use in biotechnology.

Palabras Clave: *Yarrowia,* lipasas, rodamina B, levadura.

INTRODUCCIÓN

Yarrowia lipolytica es una levadura dimórfica, aerobia estricta y con diversas capacidades enzimáticas. Entre estas capacidades enzimáticas y una de las más sobresalientes es la secreción de una lipasa a la cual se le ha dado diversos usos, como es la degradación de aceites, hidrocarburos o la elaboración de biocombustibles (Coelho *et al.,* 2010; Darvishi, 2014; Harder *et al.*, 2013).

Sin embargo, los estudios realizados en esta capacidad enzimática se han enfocado principalmente en cepas de colección, es decir; un tipo de cepa ya identificada y caracterizada. Esto deja de lado la diversidad metabólica de cepas que pudieran ser aisladas de diferentes ambientes en los que se encuentra de forma natural *Y. lipolytica*ya que estas pueden presentar variaciones en cuanto a las capacidades enzimáticas (Darvishi, 2014).

Por lo que el presente trabajo se centra en el estudio de una colección de aislados de muestras de productos cárnicos y lácteos, con el objetivo de determinar de manera cualitativa las diferencias en las capacidades enzimáticas de las cepas.

[1] Instituto tecnológico superior de Irapuato, coordinación de ingeniería bioquímica; Carretera Irapuato-Silao km. 12.5, Colonia, C.P: 36820, Irapuato, Guanajuato, stephymora5@gmail.com
[2] Universidad de Guanajuato Campus Celaya-Salvatierra, Ciencias naturales y exactas, Ave. Ing. Barros Sierra No. 201 Esq. Ave. Baja California Ejido de Santa María del Refugio 38140 Celaya, Guanajuato, adan.tops@gmail.com

MÉTODOS Y MATERIALES

Aislamiento de las levaduras.
Se preparó una solución isotónica de cloruro de calcio al 0.9% (esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos), a la cual se agregó 10 gr de la muestra; queso y carne respectivamente, y se dejó incubar durante 12 horas a una temperatura de 25°C a 120 rpm. Mediante la técnica de diluciones seriadas, se inoculó 1 mL de la disolución 10^{-4} y 1 mL de la disolución 10^{-5} en caja Petri, utilizando agar YPD (40 g/L de dextrosa, 10 g/L de peptona, 15 g/L de agar y 5 g/L de extracto de levadura), y se dejan en incubación durante 4 días a 28°C.

En cuanto hubo crecimiento, se eligieron 20 cepas de cada muestra y se aislaron por estriado en agar YPD, se incubaron a 25°C durante 2 días.

Caracterización bioquímica
Una vez aisladas las levaduras de las muestras de carne y queso, se hicieron crecer en medio líquido YPD y se ajustó la densidad óptica de las misma a 0.1; para ello se lee la absorbancia de las cepas a 600 nm en un espectrofotómetro, con la finalidad de tener la misma cantidad de inoculo de cada cepa. Cuando se obtuvo la densidad óptica deseada se realizaron 3 pruebas bioquímicas para la identificación de *Yarrowia lipolytica:* 1) fermentación de glucosa; *Y. lipolytica* no fermenta azucares ni tiene capacidad de producir CO_2, 2) asimilación de nitratos; *Y. lipolytica* no posee el metabolismo necesario para la asimilación de nitratos y 3) producción de pigmentos marrones, *Y. lipolytica* cambia la coloración del medio en presencia de tirosina. Para la fermentación en glucosa se preparó medio YPD líquido y se utilizaron campanas Durham para la visualización de producción de gases, siendo positivas aquellas cepas que no produzcan gases; para la prueba de asimilación de nitratos se utilizaron dos medios: el medio YNB (Yeast Nitrogen Base Difco) con sulfato de amonio como fuente de nitrógeno (control) y el medio YNB con nitrato de potasio como fuente de nitrógeno, las cepas que no crecieron con el nitrato como fuente de nitrógeno dieron positivas y para la tercera prueba bioquímica se utiliza un medio que contiene: (5 g/L de peptona, 5 g/L de extracto de levadura, 1.8 g/L de L-tirosina, 0.28 g/L de $MnSO_4$, 5 g/L de lactato (solución al 90%) y 20 g/L de agar), se tomaron como positivas aquellas cepas que presentaban un cambio en la coloración del medio (Kurtzman *et al.,* 2011*)*.

Prueba de capacidad lipolítica.
Las cepas que a través de las pruebas bioquímicas fueron identificadas como posibles cepas de *Y. lipolytica* fueron inoculadas en un medio con la siguiente composición: 0.1% de extracto de levadura, 0.5% de peptona, 1.0% de dextrosa, 2.0% de agar y 2.5% de aceite de oliva, este se llevara a esterilización y se dejó templar antes de añadir 0.01% de rodamina B (esterilizada por filtración); se dejan incubando a 30°C durante 48 horas, después de este tiempo se puede observar un halo fluorescente de color naranja bajo luz UV para aquellas cepas con actividad lipolítica positiva (Kumari *et al.,* 2015*)*.

RESULTADOS

Aislamiento de levaduras.
Dependiendo de la muestra de donde fueron aisladas las levaduras mostraron morfologías diferentes; para la muestra de queso se pudieron observar cepas con 2 morfologías en ambas diluciones: 1) circulares, color crema, de aspecto cremoso, brillantes, abultadas y pequeñas y 2) forma irregular, grandes, aplanadas, color crema y opacas. Para la muestra de carne también se pudieron observar dos morfologías diferentes: 1) pequeñas, brillantes, abultadas, lisas y color crema y blancas (dilución a la -4) y 2) colonias grandes, brillantes, abultadas y blancas (dilución a la -5).

De estas cajas se escogieron 10 cepas, obteniéndose de esta manera 20 aislados de cada muestra; para la identificación de cada aislado se dio el siguiente código: Q o C para diferenciar entre cada muestra, un número del 1 al 10 y la leyenda -4 o -5 dependiendo de la dilución; por ejemplo, Q1-4 para el aislado de la

muestra de queso de la dilución -4, o C1-5 para el primer aislado de la muestra de carne de la dilución -5. En las figuras 1 y 2 se muestran algunos aislados de ambas muestras. El número total de aislados obtenidos en la muestra de queso fue de 23, para la muestra de carne se obtuvieron 20 aislados.

Figura 1 Cepas aisladas de muestra de queso

Figura 2 Cepas aisladas de muestra de carne

Caracterización bioquímica.
La tabla 1 muestra el condensado de los resultados para las cepas en las pruebas bioquímicas, como control positivo en las diferentes pruebas se usó la levadura W29 (cepa tipo de *Y. lipolytica*). El resultado de estas pruebas indica de manera cualitativa las diferentes capacidades que tienen las cepas. Con las diferentes pruebas se observó la capacidad metabólica, de asimilación de nitratos y de secreción de pigmentos, que muestra una población de aislados; observándose una amplia heterogeneidad en estas capacidades entre las diferentes cepas.

Tabla 1 Resultados pruebas bioquímicas

Cepa	Prueba fermentativa		Asimilación de nitratos		Producción de pigmentos marrones	
	Positiva	Negativa	Positiva	Negativa	Positiva	Negativa
Q1-4	■		■		■	
Q2-4	■		■		■	
Q3-4	■		■		■	
Q4-4	■		■		■	
Q5-4	■		■		■	
Q6-4	■		■		■	
Q7-4	■		■		■	
Q8-4	■		■		■	
Q9-4	■		■		■	
Q10-4	■		■		■	
Q1-5	■		■		■	
Q2-5	■		■		■	
Q3-5	■		■		■	
Q3.1-5	■		■		■	
Q4-5	■			■	■	
Q5-5	■		■		■	
Q6-5	■		■		■	
Q7-5		■		■	■	
Q8-5		■	■		■	
Q8.1-5	■		■		■	

Q9-5						
Q10-5						
Q10.1-5						
C1-4						
C2-4						
C3-4						
C4-4						
C5-4						
C6-4						
C7-4						
C8-4						
C9-4						
C10-4						
C1-5						
C2-5						
C3-5						
C4-5						
C5-5						
C6-5						
C7-5						
C8-5						
C9-5						
C10-5						

Prueba de lipasas.

Aquellas cepas que dieran positivas en todas las pruebas bioquímicas fueron inoculadas en un medio con rodamina B, al exponer estas cajas a luz UV después de 48 horas se ve un halo alrededor de aquellas cepas que estén llevando acabo la secreción de la lipasa, en la figura 3 se muestran las cajas con las cepas inoculadas, pudiéndose ver que 19 cepas tienen una actividad enzimática. Para tener un mayor control se inoculo junto con las cepas aisladas la levadura W29.

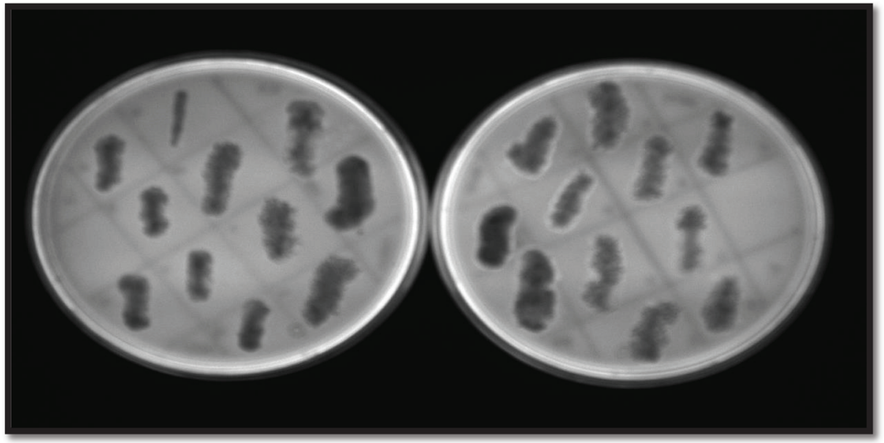


Figura 3 Prueba de capacidad lipolítica con rodamina B

CONCLUSIONES

Si bien se tiene reportado que *Y. lipolytica* es una buena secretora de lipasas, lo cierto es que cada cepa posee características y eficiencias únicas.

De las muestras analizadas, *Y. lipolytica* se encuentra mayormente en productos lácteos.

La caracterización bioquímica muestra las diferentes capacidades metabólicas, de asimilación y secretorias que pueden llegar a tener una colección de aislados.

Las cepas caracterizadas como *Y. lipolytica* muestran diferente actividad lipolítica lo cual nos habla de la diversidad enzimática que existe entre ellas.

BIBLIOGRAFÍA

COELHO, M., AMARAL, P., BELO, I. (2010). "*Yarrowia lipolytica* : an industrial workhorse." *Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 930–944.

DARVISHI HARZEVILI, F. (2014). *Biotechnological Applications of the Yeast Yarrowia lipolytica*. http://doi.org/10.1007/978-3-319-06437-6

HARDER, M., DELABIO, A., CAZASSA, S., REMEDIO, R., PIRES, J., MONTEIRO, T. (2013). "Lipid production by *Yarrowia lipolytica* for biofuels" 274–278.

KUMARI, A., BARONIAN, K., KUNZE, G., GUPTA, R. (2015) "Extracellular expression of *YlLip11* with a native signal peptide from *Yarrowia lipolytica* MSR80 in three different yeast hosts" en *Protein expression and purification*

KURTZMAN, C., FELL, J., BOEKHOUT, T., ROBERT, V. (2011) *Phenotypic, ultrastructural, biochemical and molecular properties used for yeast classification,* Elsevier editorial

EFECTO POTENCIAL DE LAS ESPECIES ÍCTICAS EXÓTICAS INVASORAS EN RÍOS DE LA RESERVA DE LA BIOSFERA SIERRA GORDA DE QUERÉTARO

Juan Paulo Mora Martinez[1] y Juan Pablo Ramírez Herrejón[2]

RESUMEN

La reserva de la biosfera de la Sierra Gorda de Querétaro alberga una gran cantidad de especies endémicas de flora y fauna de México, y uno de sus principales objetivos es la conservación de la biodiversidad. En los últimos años se han encontrado una cantidad considerable de especies exóticas en los ríos, principalmente de peces, lo cual representa una amenaza a la biodiversidad de la fauna nativa, aunado al constante deterioro de los ecosistemas fluviales. En el presente trabajo se revisaron las condiciones en las que se encuentran estas especies, cuál es su función en el ecosistema analizando la dieta, y el impacto potencial sobre las especies nativas.

ABSTRACT

The Biosphere reserve “Sierra Gorda” in Querétaro state in Central Mexico contains a several endemic Species of fauna and flora, and one of the main challenges is the conservation of his biodiversity. In the recent years, have seen some invasive species of fishes in the main rivers on this reserve, which represent a one of the major threat to biodiversity, added to this, the constant ecological impairment. This study analyses the ecological conditions were the exotic fishes exist, which are their ecological functions by analyzing his diet, and the potential effect over the native fauna.

Palabras Clave: Sierra Gorda, Especies exóticas, contenido estomacal, bioindicador.

INTRODUCCIÓN

La posición geográfica de la Reserva de la Biosfera “Sierra Gorda”, entre dos regiones biogeográficas, la Neártica y la Neotropical, hacen de esta de los lugares más ricos en cuanto a su ecodiversidad y uno de los más diversos de México. Está ubicada en el norte del estado de Querétaro, con una extensión de 383, 567 hectáreas, lo que representa un 32. 02% del territorio total del estado, limitando al norte con el río Santa María, al sureste con el río Moctezuma, al oeste con la sierra formada por cerro El Toro, cerro Ojo de Agua y cerro El Infiernillo y al sur con el río Victoria – Xichú – Extóraz – Santa Clara hasta la intersección con el río Moctezuma. El polígono general de la Reserva abarca la totalidad de los municipios de Arroyo Seco, Jalpan de Serra y Landa de Matamoros, el 88.03% de Pinal de Amoles y el 69.7% de Peñamiller. Incluye 638 localidades, contando las cabeceras municipales, con un total de 93,352 habitantes, lo que representa el 7.5% de la población del Estado.

La Sierra Gorda es una de las áreas protegidas con mayor biodiversidad en especies de flora, fauna, y macromicetos en el país. Debido a su diversidad de microclimas y a su particular orografía, alberga numerosas especies endémicas convirtiéndola en un sitio prioritario de conservación. La Reserva pertenece a la Región Hidrológica del río Pánuco. El área se divide en dos cuencas: la del río Tampaón o Tamuín, y la del río Moctezuma. La primera ocupa una extensión de 2,038 km^2, siendo sus principales afluentes los ríos Ayutla, Santa María y Jalpan. La segunda, abarca 1,532 km^2 de la Reserva, siendo su

[1]Universidad de Guanajuato, División de Ciencias Naturales y Exactas, Departamento de Biología, Campus Guanajuato, Noria Alta S/N, CP:36050, Guanajuato, Guanajuato, México.
Correo:jmoramartinez@icloud.com
[2]CONACYT-Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Ciencias Naturales, laboratorio de Integridad Biótica, Campus UAQ Aeropuerto, carret. Chichimequillas, Ejido Bolaños, C.P: 76140, Santiago de Querétaro, Qro, México. ramirezherrejon@gmail.com

principal afluente el río Extóraz (Gobierno del Estado, 1992, e INEGI, 1986). La conservación estos ecosistemas es esencial ya que aquí residen un gran número de especies florísticas y faunísticas en categoría de riesgo de acuerdo a la NOM-059-SEMARNAT-2001 y sirven como refugio para varias especies migratorias. En el caso de los ecosistemas acuáticos en la Reserva se han identificado seis especies de peces introducidas en los diferentes cuerpos de agua, todas ellas utilizadas en acuacultura y/o pesca deportiva que accidentalmente o intencionalmente se han liberado, con la intención de tener un aprovechamiento de este recurso; siendo la tónica, el mal manejo y la baja productividad acuícola. Las especies identificadas con mayor riesgo, por considerarse como invasoras potenciales son: la lobina negra (*Micropterus salmoides*), y las mojarras africanas (*Oreochromis aureus, O. mossambicus* y *O. niloticus*) todas ellas con un alto potencial biológico y de difícil erradicación.

Hoy en día, las especies invasoras constituyen una de las principales causas de cambio global (Everett, 2000). El porcentaje de las especies exóticas que logran establecerse en un nuevo medio ambiente es bajo; sin embargo, los impactos generados pueden ser muy graves e incluyen efectos ecológicos, económicos y sociales. Las especies exóticas invasoras pueden desplazar a las especies nativas por competencia directa por hábitat o recursos, depredación, transmisión de enfermedades, modificación del hábitat, alteración de la estructura trófica y de las condiciones biofísicas de los ambientes. Algunas especies exóticas invasoras producen alteraciones a nivel de procesos ecológicos que pueden desencadenar cambios extensos y profundos a nivel del paisaje y la biodiversidad. Además de los impactos ecológicos, las especies exóticas invasoras son responsables de daños económicos sobre las actividades agrícolas y pecuarias, la piscicultura, la producción forestal y efectos negativos sobre obras de infraestructura que resultan en costosas acciones de reparación. Por esta razón, existen numerosas iniciativas a nivel mundial y regional dedicadas a optimizar información y manejo de especies exóticas invasoras.

Por esta razón, son de gran importancia los estudios que busquen estudiar la distribución de las especies exóticas y las condiciones en las que se lleva a cabo el proceso de invasión, así como los posibles efectos que puedan causar sobre los ecosistemas. En este caso particular, el objetivo del presente trabajo fue conocer la distribución, la relación con las condiciones del ecosistema, la alimentación y con esto evaluar el posible efecto de las especies de peces exóticos *Micropterus salmoides* (lobina), *Poeciliopsis gracilis* y *Oreochromis sp*. (mojarra) dentro de ríos de la reserva de la biosfera Sierra Gorda de Querétaro. Asimismo, se evaluó la condición ecológica de las localidades donde se encuentran dichas especies, considerando las condiciones físicas y químicas del rio, y utilizando macroinvertebrados como bioindicadores de la degradación ambiental, ya que presentan respuestas predecibles ante la modificación de su hábitat y la calidad del agua.

MÉTODOS Y MATERIALES

Para cada sitio de muestreo se delimitó un tramo de estudio del río igual a cinco veces el ancho de la ribera máxima, como ha sido establecido por la norma para la determinación de caudal ecológico NMX-AA-159-SCFI-2012. Se obtuvieron los siguientes parámetros fisicoquímicos *in situ* mediante una sonda multiparamétrica: pH (unidades de pH), oxígeno disuelto (mg/L), sólidos totales (g/L), conductividad (mS/cm), turbidez (NTU), salinidad (UPS) y temperatura (°C).

Para la captura de peces se utilizaron tres distintos métodos: i) electropesca, pesca con atarraya (método que se usa cuando el sustrato del rio esta libre de ramas y vegetación sumergida) y el método de pesca con chinchorro, dependiendo las condiciones del sitio. Los peces capturados se fijaron en alcohol al 80% para su posterior análisis en el laboratorio, donde se procedió a tomar datos de peso, talla, sexo y estadio gonadal (Fig. 2). Posteriormente se llevó a cabo un análisis de contenido estomacal, para identificar los elementos de la dieta de las especies encontradas, considerando categorías como: restos vegetales, algas filamentosas, diatomeas, invertebrados (identificados al menor nivel taxonómico posible), materia orgánica no identificada, detrito, etc

Las muestras de macroinvertebrados se recolectaron con una red tipo “D” de 30 centímetros de diámetro con una luz de malla de 300 µm. El muestreo se llevó a cabo en cada unidad hidromorfológica identificada en el tramo del río (Parasiewicz, 2007), considerando que el número de muestras estuvo determinado por la cantidad de microhábitats disponibles, con un mínimo de tres muestras por unidad hidromorfológica. Los macroinvertebrados acuáticos se separaron del detrito y material abiótico en campo (Fig. 1) y se colocaron en frascos con alcohol al 80% para su fijación, considerando un esfuerzo de recolecta de organismos de 30 minutos por unidad hidromorfológica. Posteriormente se transportaron al laboratorio de Integridad Biótica de la FCN-UAQ, donde se identificaron al nivel taxonómico de familia utilizando claves especializadas (v.g. Arce Pérez y Roughley, 1999; Merritt, et al., 2008; Springer et al., 2010).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se llevó acabo la comparación de dos ecosistemas con condiciones contrastantes, un canal de riego en condiciones muy deterioradas y dos ríos de la reserva de la biosfera de sierra gorda. En cuanto a las mediciones de los parámetros fisicoquímicos los más contrastantes fueron el porcentaje de oxigeno disuelto y la turbidez, esto por que en el canal las condiciones de oxigeno eran bastantes bajas y la turbidez era demasiado elevada, lo que era totalmente contrario en los ríos de sierra gorda. Esto se puede deber a que los procesos de urbanización y cambio de uso de suelo están relacionados con una reducción del oxígeno disuelto y aumento en la deposición y suspensión de sedimentos (Crespo, 2011; Ometo et al., 2000).

En cuanto a los invertebrados también fue notable la diferencia, en el canal se encontraron elevadas abundancias de macroinvertebrados muy tolerantes a estresores ambientales, tales como las familias *Chironomidae y Syrphidae,* que se ha reportado en diversos estudios presentan una relación positiva entre el incremento en la abundancia de estas familias y cambios de uso de suelo, como pastizales, cultivos y áreas urbanas (Jones and Clark, 1987; Quinn et al., 1997), a su vez estos cambios en el uso de suelo están asociados con un incremento en la temperatura del agua, un incremento en la sedimentación y una disminución de la concentración de oxígeno disuelto (Miserendino et al., 2011).

En contraste, los ríos de la biosfera mantienen condiciones óptimas o subóptimas para el mantenimiento de la biodiversidad y de los procesos ecosistémicos, lo que se vio reflejado en la composición y diversidad de macroinvertebrados, encontrando taxones muy variados, los mas significativos fueron: *coleoptera, Ephemeroptera, Odonata, Hemiptera, Trichoptera,* entre otros. Esto nos permite hacer inferencias acerca de la salud del ecosistema.

En la mayoría de los peces estudiados se mostraba un estadio gonadal en reproducción (Figura 2), esto significa que eran sexualmente maduros. El contenido estomacal, en un porcentaje bajo se observo estomago vacío, esto nos indica que la mayoría de los peces al momento de la captura habían tenido una buena alimentación. Con respecto a los invertebrados encontrados en dicho contenido, se identificaron tanto especies acuáticas como terrestres.

El conocer la dieta de las especies exóticas nos puede indicar cuál es su función dentro del ecosistema y por lo tanto cuál es su efecto potencial a las comunidades nativas, tanto directo como indirecto, ya sea por la depredación de peces nativos, o por la competencia de recursos alimenticios y de hábitat.

Figura 1. Separación en campo de los macroinvertebrados.

Figura 2. Observación de estadio gonadal y obtención de contenido estomacal.

CONCLUSIONES

Los ríos de la Reserva de la Biosfera de Sierra Gorda de Querétaro y las condiciones de supervivencia de las especies que viven en ellos son optimas, el problema presente es que las especies que mas proliferan son especies que han sido introducidas o también llamadas exóticas, de las muestras que mas obtuvimos fueron de *Poeciliopsis gracilis*, mojarras y lobinas. En estas especies se ha observado una muy buena adecuación y existe en posible desplazamiento de las especies endémicas de estos ríos como lo son *Poecilia mexicana* y *Astyanax mexicanus* en donde aun no se sabe si esto puede llegar a causar un efecto negativo en el ecosistema. Asimismo, otro factor que puede estar favoreciendo la perdida de especies nativas, en conjunto con los efectos de las especies invasoras, es la alteración de los ecosistemas.

Por otro lado monitoreo de los invertebrados se debería realizar en cada época del año, debido a que esta bien estudiado que estos organismos buenos indicadores de la condición del ecosistema e incluso permiten identificar afectaciones puntuales y son buen modelo de estudio en salud de un ecosistema y de sus especies.

BIBLIOGRAFIA

1. Arce Pérez, R., Roughley, R.E., 1999. Lista anotada y claves para los Hydradephaga (Coleoptera: Adephaga: Dytiscidae, Noteridae, Haliplidae, Gyrinidae) de México. Dugesiana 6, 69–104.
2. Crespo, J.G., 2011. A review of chemosensation and related behavior in aquatic insects. J. Insect Sci. Online 11, 62. doi:10.1673/031.011.6201
3. Everett, R.A., 2000. Patterns and pathways of biological invasions. Trends Ecol. Evol. 15, 177–178. doi:10.1016/S0169-5347(00)01835-8
4. Jones, R.C., Clark, C.C., 1987. Impact of Watershed Urbanization on Stream Insect Communities1. JAWRA J. Am.
5. Water Resour. Assoc. 23, 1047–1055. doi:10.1111/j.1752-1688.1987.tb00854.x
6. Merritt, R.W., Cummins, K.W., Berg, M.B., 2008. An introduction to the aquatic insects of North America, 4th edition. ed. Kendall/Hunt Publishing Company, Dubque, Iowa.
7. Miserendino, M.L., Casaux, R., Archangelsky, M., Di Prinzio, C.Y., Brand, C., Kutschker, A.M., 2011. Assessing land-use effects on water quality, in-stream habitat, riparian ecosystems and biodiversity in Patagonian northwest streams. Sci. Total Environ. 409, 612–624. doi:10.1016/j.scitotenv.2010.10.034

8. Ometo, J.P.H.B., Martinelli, L.A., Ballester, M.V., Gessner, A., Krusche, A.V., Victoria, R.L., Williams, M., 2000. Effects of land use on water chemistry and macroinvertebrates in two streams of the Piracicaba river basin, south-east Brazil. Freshw. Biol. 44, 327–337. doi:10.1046/j.1365-2427.2000.00557.x
9. Parasiewicz, P., 2007. The MesoHABSIM model revisited. River Res. Appl. 23, 893–903. doi:10.1002/rra.1045
10. Quinn, J.M., Cooper, A.B., Davies-Colley, R.J., Rutherford, J.C., Williamson, R.B., 1997. Land use effects on habitat, water quality, periphyton, and benthic invertebrates in Waikato, New Zealand, hill-country streams. N. Z. J. Mar. Freshw. Res. 31, 579–597. doi:10.1080/00288330.1997.9516791
11. Schüttler, E. & Karez, C.S. (2008). Especies exóticas invasoras en las Reservas de Biosfera de América Latina y el Caribe. Un informe técnico para fomentar el intercambio de experiencias entre las Reservas de Biosfera y promover el manejo efectivo de las invasiones biológicas. UNESCO, Montevideo.
12. Secretaria del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca (1999). Programa de Manejo de Reserva de la Biosfera "Sierra Gorda", México: Unidad de Participación Social, Enlace y Comunicación, INE.
13. Springer, M., Ramírez, A., Hanson, P., 2010. Macroinvertebrados de Agua Dulce de Costa Rica I. Rev. Biol. Trop. 58.

EVALUACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA, VIGOR Y PARÁMETROS POBLACIONALES DE LA AVIFAUNA ASOCIADA A LA ZONA IXTLERA DE SAN LUIS POTOSÍ EN RELACIÓN A LA CALIDAD DEL HÁBITAT

Daniel Mizael Morales Arias[1] y Leonardo Chapa Vargas[2]

RESUMEN

La participación en este proyecto consistió en el entendimiento ecológico básico y especifico de la avifauna en las regiones norte y "Sur" del estado de San Luis Potosí, para poder determinar procesos y patrones que se ven reflejados en la calidad de sus hábitats, su estado inmunológico y tamaños corporales. En las actividades de campo fue necesario analizar la diversidad de aves en las regiones para que por medio de características propias de cada especie y verificando estas en guías de campo especializadas en avifauna mexicana. Fue necesario el uso de trampas especiales, toma de muestras sanguíneas y preparaciones de frotis de las mismas. En laboratorio las actividades consistieron en visualización de frotis al microscopio buscando parásitos sanguíneos de las aves.

ABSTRACT

The participation in this study consisted in the basic and specific ecological understanding of the avifauna in the regions north and south of the state San Luis Potosí to determinate processes and patters which are reflected in quality of habitat, the immune status and the body size. In field activities was necessary to analyze the diversity of bird at the selected areas by distinctive features for each species and check them in field guides specialized in Mexican avifauna. It was necessary the use of special traps, blood sampling and smear preparations. The laboratory activities consisted in the visualization of the birds' blood smars.

Palabras Clave: Avifauna, calidad del hábitat, estado inmunológico.

INTRODUCCIÓN

México tiene una diversidad de aves muy grande, alrededor de 1150 especies, (11% de las especies a nivel mundial) de las cuales alrededor de 200 son endémicas (Navarro et al., 2014). Es importante estudiar su estado ecológico, de conservación y de salud; por lo cual este estudio busca analizar los estados de habitas de algunas regiones del estado de San Luis Potosí, la diversidad de aves presente y la búsqueda de parásitos sanguíneos, contemplando la parasitaria presente en las especies comunes de las regiones en consecuencia de varios factores ambientales y antropogénicos. El estudio analiza las variables presentes en calidad y cantidad de vegetación en el estado, la presencia o ausencia de ciertos parásitos (*Haemoproteus, Leucocytozoon, Plasmodium*) (Reinoso et al., 2016).

MÉTODOS Y MATERIALES

En un proyecto con el objetivo de conocer la relación de la calidad del hábitat y el estado inmunológico (parásitos sanguíneos) de las aves por consecuencia de la contaminación de agroquímicos en el ambiente se realizaron dos salidas a campo. La primera salida a campo consistió en el reconocimiento de posibles lugares de colecta. Se viajó a tres localidades, todas en el municipio Villa Juárez de San Luis Potosí, donde se buscó que estas cumplieras ciertos criterios como; presencia evidente de aves, vegetación apta

[1]Universidad Autónoma de Zacatecas, Unidad Acedémica de Ciencias Biológicas; Universidad Autónoma de Zacatecas, Av. Preparatoria, Hidraulica, 98068 Zacatecas, Zac., daniel_mizael@hotmail.com.
[2] Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica; Camino a La Presa de San José 2055, Lomas 4 sección, 78216 San Luis, S.L.P. lchapa@ipicyt.edu.mx

para el ecosistema de las mismas como; árboles, arbustos y herbáceas altas, zonas de producción de agrícola donde se implementaran agroquímicos y disponibilidad de cuerpos de agua. En las tres localidades hubo avistamiento de varias especies de aves, las cuales por medio de monitoreo con binoculares y el uso de guías de campo especializadas se pudo observar una vista general de la diversidad de los lugares. En los tres lugares había vegetación adecuada para la presencia de aves; mezquites, pinos, algunas herbáceas, entre otras, había presencia de cuerpos de agua como presas, riachuelos, pozos y ojos de agua. Por la temporada de cultivo y el testimonio de algunos productores locales se afirmó que en las tierras de producción ya habían sido aplicados agroquímicos.

Se regresó después a la primera localidad para realizar el muestreo. La primera localidad de muestreo fue Ojo de León y este duro 3 días, el punto de muestreo está posicionado en una zona recreativa perteneciente a los pobladores del ejido y donde hay presencia de ojos de agua y arroyos con presencia de algunos peces introducidos. La presencia y flujo del agua es un factor importante en el proyecto de investigación, pues determina la presencia de ciertos parásitos sanguíneos y de sus vectores, estos estarán presentes en las muestras de sangre de las aves reflejando el estado inmunológico de las mismas dependiendo de la cantidad de parasitemia. En el primer día, llegando al área de muestreo se instalaron 10 redes trampas especiales para aves, estas están hechas de tela de "niebla" que hace que sean invisibles para algunas aves. Se establecieron en lugares en donde había a consideración más tránsito de aves; tres cerca de un cuerpo artificial de agua y las otras siete dispersas entre la vegetación más abundante. Se instalaron y se plegaron enseguida, ya que las primeras horas de luz en la mañana es cuando las aves están más activas y son más propensas a ser atrapadas.

Conforma trascurre el día, el ritmo de captura de las aves va disminuyendo hasta que poco antes del atardecer las redes se cierran. Fue instalada enseguida la mesa de trabajo, en donde se realizaron medidas y la toma de muestras de sangre y plumas. La dinámica de trabajo fue; Dar rondines periódicos en tiempos cortos para revisar las redes, detectar aves atrapadas y de manera inmediata retirarlos de estas y transportarlos dentro de sacos de tela de manta. Es importante que las aves no queden atrapadas por mucho tiempo, esto puede provocar que se enreden más y sea más difícil retirarlas de la red, además de que por el estrés estás puedan morir mientras sigan atrapadas. Otra consecuencia de dejarlas mucho tiempo atrapadas es la producción de hormonas y células por el estrés, esto puede perjudicar en los resultados de su estado inmunológico natural. Una vez en los sacos se toma la hora de captura y son transportadas a la mesa de trabajo, estos son puestos en formación para ir manejando un ave a la vez. Se saca el ave del saco y se maneja de manera especial con una mano con el motivo de evitar mordeduras y rasguños por el ave, así a la vez para evitar que esta misma se lastime. Se le miden a continuación las siguientes proporciones; Longitud de las alas, de los tarsos, de la punta del pico a las narinas y de la punta del pico a la envergadura de la base del pico con la cabeza, la longitud total del ave que comprende la punta del pico hasta la punta de la cola. Se toma el peso, se verifica la presencia o ausencia de parche y de la osificación de la cabeza, esto con motivo de prever el estado de madurez del individuo. Se toma muestras de plumas; de las alas, cola, pecho y dorso; esto con el motivo de medir la cantidad de agroquímicos presentes en ellas.

Se le inserta un anillo en la pata, el cual contiene un número de identificación; esto con el motivo de no volver a tomar como muestra un individuo dos veces; si este reaparece en las trampas se libera de inmediato. Finalmente se obtiene la muestra de sangre; se pincha una vena en el revés del ala y con un capilar se toma la sangre, de inmediato se hacen los frotis en las laminillas. Si se obtiene buena cantidad de sangrado se toma muestra de sangre en tubos eppenderof con buffer de preservación. Después de la toma de muestra de sangre se le aplica un polvo de cicatrización y algodón; se mantiene sostenida el ave por unos minutos y después que haya parado el sangrado se libera el ave. Todos estos datos se van anotando en hojas con el formato necesario; nombre de la especie, número de individuo muestreado, código de anillo, sexo, estado de madurez y todas las medidas.

En otra actividad de campo se viajó al altiplano potosino, en la región desértica que comprende el área natural protegida de "la mojonera", para recuperar dos cámaras trampas instaladas dos meses antes. Esto

con motivo de un proyecto para conocer la distribución del águila real (*Aquila chrysaetos*) en el estado de San Luis Potosí. Las cámaras habían sido instaladas en un bebedero artificial construido por proyectos de conservación del águila real, pues había sido avistada cercas en las sierras.

En otra actividad de campo se realizaron sondeos de aves en la ciudad capital de San Luis Potosí, como colaboración de un proyecto de aves urbanas en ciudades de México. Se visitaron putos previamente establecidos en parques y calles de la ciudad donde en intervalos de 5 minutos se contaban el número de especies de aves y el número de individuos de estas. En intervalos de un minuto el número de peatones y automóviles, además, se contaba la presencia de árboles, cables, postes, gatos y perros. Todo esto dentro de un rango de 25 metros. Se visitaron varios puntos del centro histórico y tres parques (Tangamanga I, Tangamanda II y Morales).

En el laboratorio se realizó la a organización de frotis sanguíneos de diferentes fechas y colectas que estaban guardados en cajas especiales. Estos se acomodaron por especie y orden alfabético, para después servir como material de próximas publicaciones.

RESULTADOS

En el muestreo realizado en el municipio de Villa Juárez se obtuvo el muestreo de &$$% individuos, de los cuales las especies con más frecuencia de caer fueron "$%$&%" , con esto se podrá elegir una especie para la realización del proyecto y ver su estado ecológico en esa región.

Con la recuperación de las cámaras en el área natural protegida de "La mojonera" no se captó la presencia de Aguila Rea. Solo se encontraron fotos de algunas chivas y una zorra.

También se realizó la tinción de algunos frotis para la visualización de las muestras en campo y de algunas en el archivo de laboratorio encontrando parásitos sanguíneos en algunas de pájaros carpinteros *(Q. mexicanus.)*

CONCLUSIONES

Se participó en varias salidas a campo; donde se exploraron áreas atractivas de muestreo, con presencia de varias especies de aves para la realización de un próximo proyecto de investigación sobre la relación del estado del abitat y la salud de las aves. Después se volvió a estas áreas para la realización del muestreo de sangre en las aves obtenidas por medio de redes. Se visitó un sitio el norte del estado para le recuperación de cámaras-trampa instaladas en el reserva de con el propósito de visualizar las fotografías que tomo en un tiempo aproximado a dos meses con el motivo de encontrar presencia del águila real (*Aquila chrysaetos*).

BIBLIOGRAFIA

- Reinoso-Pérez, T. 2016, "Haemosporidian parasite prevalance, pasasitemia, and diversity in three resident bird species at a shrubland dominated landscape of the Mexican Highland plateau", en Parasites & Vectors, 9:307.
- Navarro-Sigüenza, A. 2014. "Biodiversidad de aves en México". Revista Mexicana de Biodiversidad. V. 85. 476-495.

SELECCIÓN E IDENTIFICACIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE BACTERIAS AISLADAS DE SITIOS CONTAMINADOS POR ORGANOCLORADOS CON POTENCIAL USO EN LA BIORREMEDIACIÓN

María Fernanda Morales Gutiérrez[1] y Alma Rosa Corrales Escobosa[2]

RESUMEN

La identificación de microorganismos mediante técnicas de espectrometría de masas con ionización suave como MALDI-TOF (desorción/ionización láser asistida por matriz con detector de tiempo de vuelo) ha surgido recientemente como una tecnología rápida y sensible para la identificación de organismos en base a la comparación de los espectros de masas de las proteínas del organismo estudiado con los de una cepa de referencia existente en una librería. En esta investigación se usó el sistema MALDI-BIOTYPER (Bruker, Daltonic) para realizar la identificación de microorganismos aislados de suelos contaminados con organoclorados del municipio de Salamanca, Guanajuato. Adicionalmente, se evaluó la capacidad de crecimiento de los aislados obtenidos en presencia de 5 y 50 ppm DDT, a fin de seleccionar cepas con potencial uso en biorremediación. En base a los espectros de masas de obtenidos de los aislados bacterianos se logró identificar diferentes cepas entre las que destacan *Bacillus marisflavi, Pseudomonas balearica, Lysinibacillus fusiformis, Bacillus megaterium y Bacillus pumilus*. En el caso de las cepas fúngicas aisladas a pesar de que se adquirió buenos espectros de masas, no se logró la identificación de dichos aislados, probablemente por falta de espectros de referencias existentes en la base de datos. Algunos aislados presentaron capacidad de crecer en medio con DDT. En conclusión, MALDI-BIOTYPER es sistema que permite identificar fácilmente aislados bacterianos procedentes de muestras ambientales, sin embargo, falta incrementar la base de datos para los aislados fúngicos.

ABSTRACT

The identification of microorganisms by MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption / assisted and detector flight time) is a soft ionization techniques used in mass spectrometry has recently emerged as a fast and sensitive technology for the identification of organisms based on the comparison of mass spectra of proteins in an organism with an existing reference strain in a library. In this research the MALDI-Biotyper system (Bruker, Daltonic) was used for the identification of microorganisms isolated from contaminated with organochlorine of Soils Salamanca, Guanajuato soils. Additionally, the growth capacity of the isolates obtained in the presence of 5 and 50 ppm DDT and was evaluated to select strains with potential use in bioremediation. Based on the mass spectra obtained from bacterial isolates were identified different strains among which *Bacillus marisflavi, Pseudomonas balearica, Lysinibacillus fusiformis, Bacillus pumilus and Bacillus megaterium*. In the case of fungal isolates despite good mass spectra were acquired, the identification of these isolates failed, probably due to lack of spectra references in the database. Some isolates showed ability to grow in medium with DDT. In conclusion, MALDI-Biotyper is easily system which identifies bacterial isolates from environmental samples, however, necessary to increase the database for the fungal isolates.

Palabras Clave Organoclorados. Biorremediación, MALDI BIOTYPER, DDT

---

[1] Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico de Celaya Colonia: Fovissste CP: 38010, Celaya, Guanajuato, 12030348@itcelaya.edu.mx
[2] Departamento de Química, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato Cerro de la Venada S/N, CP: 36040, Guanajuato, Gto., alma_rce@ugto.mx

INTRODUCCIÓN

Recientemente, la espectrometría de masas (EM) ha conquistado los laboratorio de microbiología de clase mundial por ser una alternativa rápida y fiable para la identificación de microorganismos, sustituyendo en parte las técnicas microbiológicas convencionales, tales como la identificación bioquímica debido a su menor tiempo de preparación de la muestra y ofrece un bajo costo de consumibles por muestra **[1]**. En general, el principio de la EM consiste en la ionización química suave de los compuestos para generar moléculas cargadas y la determinación de espectros en base a su relación masa/ carga (*m/z*).

La identificación de microorganismos mediante el sistema MALDI-Biotyper (Bruker, Daltonic) mediante la técnica de espectrometría de masas MALDI-TOF (por sus siglas en ingles desorción/ionización láser asistida por matriz con detector de tiempo de vuelo) proporciona los espectros de masas con un rango de masa de 2000 a 20000 Da de las proteínas más abundantes (ribosomales) del organismo estudiado y los compara con los espectros de masas de cepas de referencia existentes en su librería, la cual se encuentra representada principalmente por bacterias (aproximadamente 5300) y en menor proporción por levaduras y hongos filamentosos (aproximadamente 600).

Una vez obtenido el espectro de masas y comparado con los existentes en la base de datos, el software Biotyper 3.0 le adjudica una identificación y un valor indicativo de la fiabilidad de dicha identificación. Este valor se encuentra en escala arbitraria que va de 0 a 3 en base al $\log_{10}$ del valor obtenido de la comparación de los espectros de masas; en base a estos valores se recomienda dividir el rango en cuatro intervalos: de 3 a 2.3 indica una identificación fiable a nivel de especie, un valor entre 2 a 2.29 indica seguro identificación de género, probable identificación de especie, un valor de 1,7 y 2 ofrece una identificación fiable a nivel de género, y un valor <1,7 la identificación no es fiable (Tabla 1).

Tabla 1: Criterios de interpretación estándar Bruker

Rango (Score)	*Interpretación*	*Simbolo*	*Color*
2.30….3.00	Alta probabilidad de identificación en especie	(+++)	Verde
2.00 …2.299	Seguro identificación de género, probable identificación de especie	(++)	Verde
1.70 … 1.99	Probable identificación de género	(+)	amarillo
0.00 ..1.69	No posible identificación	(-)	rojo

Cabe señalar que el sistema MALDI-Biotyper ha sido recientemente aprobado por la FDA para la identificación de aislados proveniente principalmente de muestras clínicas, sin embargo, es necesario investigar su aplicación y factibilidad en la identificación de microorganismos asilados de muestras ambientales principalmente de suelo contaminado con compuestos orgánicos persistentes (COP) y posterior utilización en la biorremediación del sitio.

En este estudio se aislaron microorganismos de suelo de la ex unidad Fertimex en Salamanca, Guanajuato **[2]**, este suelo contiene con altos niveles de COP, principalmente DDT (1, 1, 1-Tricloro-2, bis-[p-clorofenil] etano). La identificación rápida y precisa de microorganismos en el laboratorio con potencial uso en la biorremediación es importante para iniciar su caracterización, así como para para evitar la utilización de microorganismos patógenos.

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue identificar por el sistema MALDI-BIOTYPER mediante MALDI-TOF microorganismos aislados del suelo de un sitio industrial contaminado, así como evaluar la capacidad de crecimiento de los aislados en presencia de DDT, a fin de seleccionar cepas con potencial uso en biorremediación

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de suelo
Las muestras de suelo con altos niveles de COP fueron obtenidas de 7 puntos representativos de la ex unidad Fertimex ubicada en Carretera Panamericana Kilómetro 314.5, San Juan, CP: 36760 en Salamanca, Guanajuato.

Obtención y aislamiento de capas bacterianas
Se realizó una dilución 1:1000 de cada una de las muestras de suelo, posteriormente se tomaron alícuotas de 50 µl para sembrar y cultivar en agar LB para bacterias y PDA para hongos. Los microorganismos se incubaron durante 24 horas a 28°C, se aislaron y re-sembraron hasta obtener cultivo puro. Las diferentes colonias aisladas se seleccionaron en función a su color, tamaño, borde y superficie.

Identificación de microorganismos
La identificación para cada cepa de bacterias aisladas se realizó mediante identificación con transferencia directa, para ello se tomó con un palillo una única colonia crecida en agar LB y se transfirió directamente al pocillo de la placa de acero para MALDI, se esperó a que secaran por unos minutos y se prosiguió a superponer 1 µL de matriz preparada previamente con 250 µL de ácido α-ciano-4-hidroxicinámico (HCCA) en una mezcla de 50% de acetonitrilo (ACN), 47,5% de agua y ácido trifluoroacético (TFA) 2,5%, permitiendo secar la alicuota nuevamente a temperatura ambiente.

Para las muestras de los hongos aislados se realizó la extracción de las proteínas mediante el método etanol-acido fórmico descrito en el manual de MALDI Biotyper, se transfirió un 1 µL del extracto a la placa y se secó, inmediatamente se adicionó 1 µL de matriz HCCA preparada de la misma manera que para bacterias. Finalmente, una vez preparada la placa de MALDI se introdujo en el equipo MALDI-TOF y se corrió el método correspondiente. Para la calibración se utilizó el estándar BTS. Los resultados arrojados por el equipo fueron procesados con el software BIOTYPER 3.0

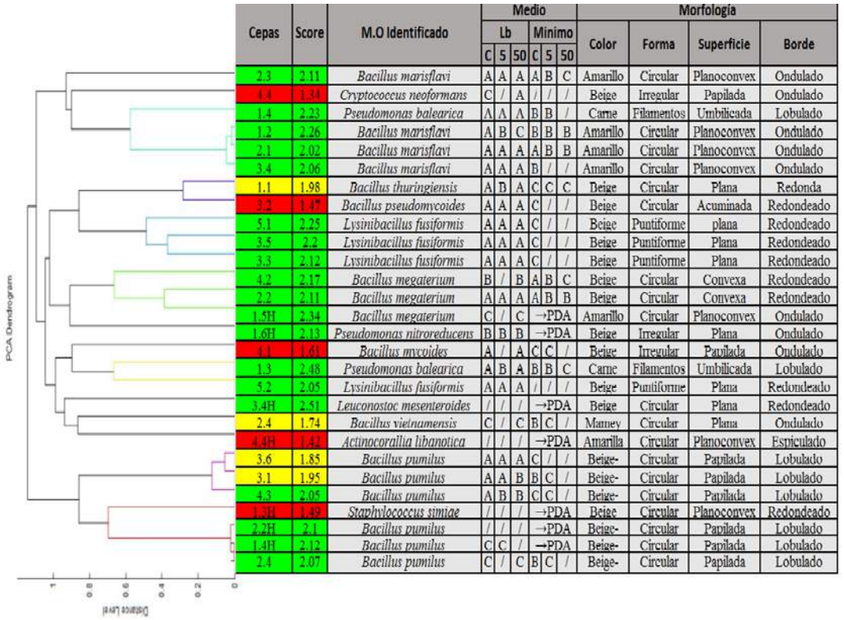
Identificación de crecimiento de cepas bacterianas en presencia de DDT
Cada una de las cepas identificadas fueron sembradas nuevamente en los medios: Mínimo, PDA y LB en ausencia y con 5 y 50 ppm con DDT.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las muestras de suelo se aislaron 28 cepas bacterianas y 17 cepas de hongos. En ambos casos la identificación de microorganismos por MALDI-TOF se basó en la comparación del espectro de masas del organismo estudiado con las de cepas de referencia en la base de datos mediante el uso de software Biotyper, el cual asigna un valor arbitrario entre 0 y 3 que refleja la similitud entre la muestra y el espectro de referencia (Tabla 1).

En la Tabla 2 se muestran, los resultados obtenidos del score de identificación asignado por el software Biotyper para cada una de las cepas de las bacterias aisladas. La tasa de identificación fue de más del 67% con respecto a especie, mientras para el caso de la identificación a nivel de género se obtuvo un 14%, el porcentaje restante corresponde a resultados no fiables. Adicionalmente, en la tabla 2 se presentan los resultados de la relación filogenética representada por el dendograma, así como los datos de morfología y capacidad de crecimiento en presencia de DDT para cada uno de los aislados bacterianos.

Tabla 2: Dendograma, identificación por Biotyper, crecimiento en DDT y morfología de las bacterias aisladas.



Cepas	Score	M.O Identificado	Medio						Morfología			
			Lb			Minimo			Color	Forma	Superficie	Borde
			C	5	50	C	5	50				
2.3	2.11	*Bacillus marisflavi*	A	A	A	A	B	C	Amarillo	Circular	Planoconvex	Ondulado
3.4	1.54	*Cryptococcus neoformans*	C	/	A	/	/	/	Beige	Irregular	Papilada	Ondulado
1.4	2.23	*Pseudomonas balearica*	A	A	A	B	B	/	Carne	Filamentos	Umbilicada	Lobulado
1.2	2.26	*Bacillus marisflavi*	A	B	C	B	B	B	Amarillo	Circular	Planoconvex	Ondulado
2.1	2.02	*Bacillus marisflavi*	A	A	A	A	B	B	Amarillo	Circular	Planoconvex	Ondulado
3.4	2.06	*Bacillus marisflavi*	A	A	A	B	/	/	Amarillo	Circular	Planoconvex	Ondulado
1.1	1.98	*Bacillus thuringiensis*	A	B	A	C	C	C	Beige	Circular	Plana	Redonda
3.2	1.47	*Bacillus pseudomycoides*	A	A	A	C	/	/	Beige	Circular	Acuminada	Redondeado
5.1	2.25	*Lysinibacillus fusiformis*	A	A	A	C	/	/	Beige	Puntiforme	plana	Redondeado
3.5	2.2	*Lysinibacillus fusiformis*	A	A	A	C	/	/	Beige	Puntiforme	Plana	Redondeado
3.3	2.12	*Lysinibacillus fusiformis*	A	A	A	C	/	/	Beige	Puntiforme	Plana	Redondeado
4.2	2.17	*Bacillus megaterium*	B	/	B	A	B	C	Beige	Circular	Convexa	Redondeado
2.2	2.11	*Bacillus megaterium*	A	A	A	A	B	B	Beige	Circular	Convexa	Redondeado
1.5H	2.34	*Bacillus megaterium*	C	/	C	→PDA			Amarillo	Circular	Planoconvex	Ondulado
1.6H	2.13	*Pseudomonas nitroreducens*	B	B	B	→PDA			Beige	Irregular	Plana	Ondulado
4.1	1.61	*Bacillus mycoides*	A	/	A	C	C	/	Beige	Irregular	Papilada	Ondulado
1.3	2.48	*Pseudomonas balearica*	A	B	A	B	B	C	Carne	Filamentos	Umbilicada	Lobulado
5.2	2.05	*Lysinibacillus fusiformis*	A	A	A	/	/	/	Beige	Puntiforme	Plana	Redondeado
3.4H	2.51	*Leuconostoc mesenteroides*	/	/	/	→PDA			Beige	Circular	Plana	Redondeado
2.4	1.74	*Bacillus vietnamensis*	C	/	C	B	C	/	Marney	Circular	Plana	Ondulado
4.4H	1.42	*Actinocorallia libanotica*	/	/	/	→PDA			Amarilla	Circular	Planoconvex	Estriculado
3.6	1.85	*Bacillus pumilus*	A	A	A	C	/	/	Beige-	Circular	Papilada	Lobulado
3.1	1.95	*Bacillus pumilus*	A	A	B	B	C	/	Beige-	Circular	Papilada	Lobulado
4.3	2.05	*Bacillus pumilus*	A	B	B	C	C	/	Beige-	Circular	Papilada	Lobulado
1.3H	1.52	*Staphylococcus simiae*	/	/	/	→PDA			Beige	Circular	Planoconvex	Redondeado
2.2H	2.1	*Bacillus pumilus*	/	/	/	→PDA			Beige-	Circular	Papilada	Lobulado
1.4H	2.12	*Bacillus pumilus*	C	C	/	→PDA			Beige-	Circular	Papilada	Lobulado
2.4	2.07	*Bacillus pumilus*	C	/	C	B	C	/	Beige-	Circular	Papilada	Lobulado

Se utilizó la nomenclatura: A, B y C para describir un crecimiento satisfactorio, moderado y nulo de las cepas al exponerlas a 5 y 50 ppm de DDT más el control.

De las 28 cepas bacterianas en medio LB, 11 de ellas fueron resistentes a DDT y su crecimiento resulto de manera satisfactoria, por otra parte 7 cepas mostraron dificultad al crecer en una concentración de 5 ppm de DDT y por ultimo 3 cepas tuvieron un comportamiento decreciente proporcional al aumentar la concentración del contaminante.

En contraste a las 21 cepas sembradas en medio mínimo se tuvo un crecimiento menor ya que más de la mitad tuvo un comportamiento decreciente proporcional al aumentar la concentración del contaminante.

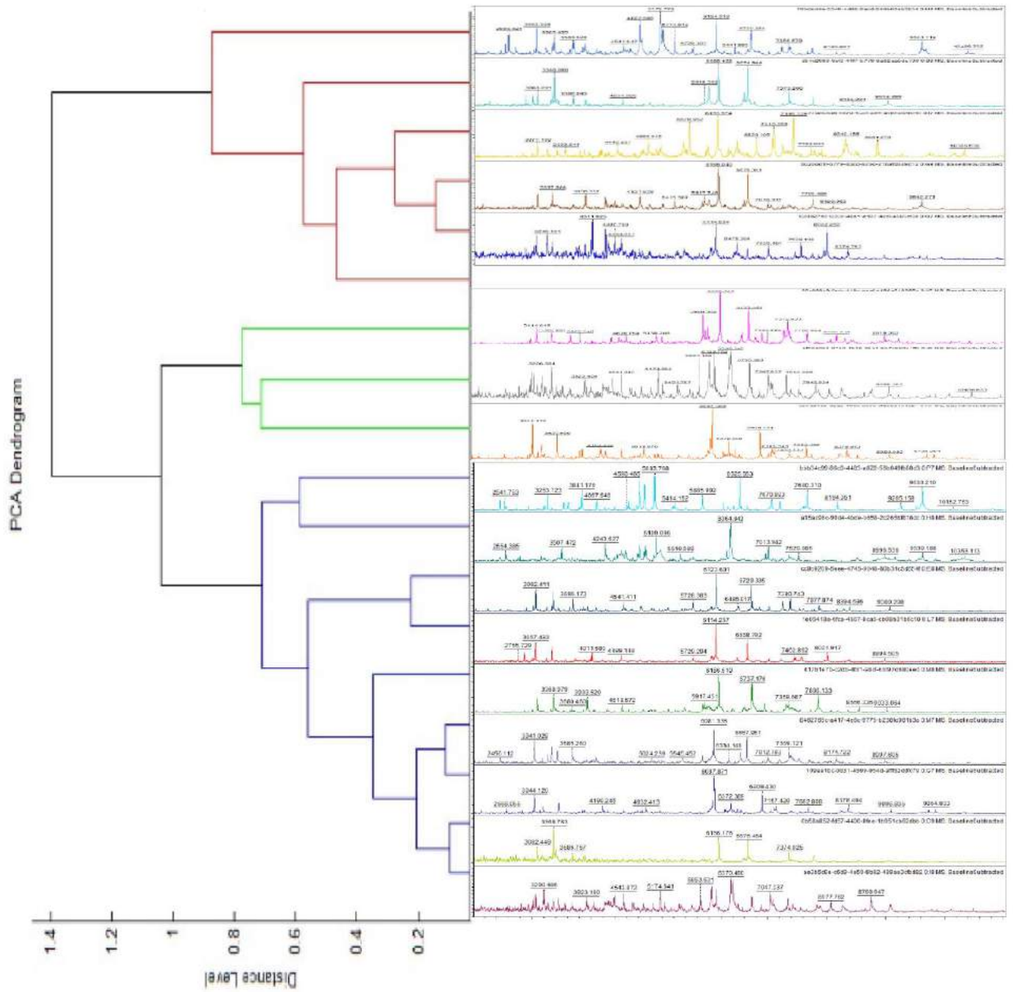


Figura 1. Dendograma obtenido con el software Biotyper y espectros de masas de los hongos aislados

En cuanto a los aislados de hongos, no se logró la identificación mediante el software Biotyper, probablemente a que en la base de datos no se encuentra espectros de referencias. Sin embargo, como se puede observar en la figura 1, después de la extracción de proteínas con etanol-ácido fórmico, se obtuvieron buenos espectros de masas. En la figura 1 también se presenta el dendograma que agrupa a los aislados de hongos en base a sus espectros de masas y evalúa, la posible similitud o diferencia entre ellos.

CONCLUSIONES

El empleo sistema MALDI-BIOTYPER mediante MALDI-TOF, mostro que es una técnica fácil y confiable para identificar de consorcios bacterianos aislados del suelo contaminado con compuestos organoclorados, ya que se logró la identificación de ocho especies bacterianas: *Bacillus marisflavi, Pseudomonas balearica, Bacillus thuringiensis, Lysinibacillus fusiformis, Bacillus megaterium, Pseudomonas nitroreducens, Leuconostoc mesenteroides,* y *Bacillus pumilus.* Sin embargo, falta incrementar la librería para la identificación de hongos filamentosos. Las bacterias aisladas, fueron capaces de crecer en medios de cultivo con presencia de DDT en concentraciones de hasta 50 ppm, Por lo tanto, ya que ninguno es patógeno de humano, se puede sugerir que estos microorganismos pueden ser utilizados como una herramienta estratégica para la biorremediación.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Instituto Tecnológico de Celaya y a la Universidad de Guanajuato por el apoyo para la realización del verano de investigación. Así mismo agradezco a la Dra. Alma Rosa Corrales Escobosa por su paciencia y permitirme estar trabajando en el laboratorio, aconsejarme y brindarme parte del conocimiento y destreza que ella tiene.

REFERENCIAS

[1] Sogawa, K., Watanabe, M., Sato, K., Segawa, S., Ishii, C., Miyabe, A., ... & Nomura, F. (2011). Use of the MALDI BioTyper system with MALDI–TOF mass spectrometry for rapid identification of microorganisms. Analytical and bioanalytical chemistry, 400(7), 1905-1911..

[2] Acevedo *et al.* (2001). "Evaluación de la contaminación por DDT y de en un suelo agrícola de Salamanca Guanajuato" de CINVESTAV-IPN. Consultada en http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:ixLJZ2XHmXEJ:web.uaemex.mx/Red_Ambientales/docs/congresos/Ciudad%2520Obregon/CONTAMINACION_AMBIENTAL/CA018.doc+&cd=1&hl=es&ct=clnk&gl=mx (06-08-2016).

CARACTERIZACION DE ESPECIES SILVESTRES DE LA FAMILIA DROSOPHILDAE DEL CENTRO DE LA REPÚBLICA MEXICANA

María Elena Guadalupe Morales-Madariaga[1] y Juan Rafael Riesgo Escovar[2]

RESUMEN

Drosophilidae es una gran familia cosmopolita del orden de los dípteros, y es uno de los grupos de insectos más importantes ya que incluye a un organismo modelo, *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830. A pesar de la diversidad de artrópodos y de la cantidad de estudios que se han realizado hay muy poca información sobre la diversidad de Drosophilidae. Querétaro se encuentra en una zona que se ve beneficiada en varios sentidos, porque presenta una geografía muy diversa en un territorio relativamente pequeño. Colectamos una amplia variedad de especies, la mayoría de ellas cactofílicas, y que pertenecen al grupo repleta. Además de estas moscas, también colectamos otro tipo de moscas, como *Megaselia scalaris*, que podría representar problemas sanitarios. Esta mosca es también interesante por sus hábitos. Se ha publicado que las larvas pueden representar problemas sanitarios para humanos, por lo que la colecta de especímenes y su caracterización nos podría permitir conocer los problemas o la historia del lugar donde existe y eventualmente evaluar si conlleva problemas a la población.

ABSTRACT

Drosophilidae is an enormous cosmopolitan family that belongs to the Diptera order, one of the most important groups of insects, partly because one model organism belongs to this group, *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830. Despite the great diversity of arthropods and the large quantity of studios that have been done, there is still a lack of information on Drosophilidae diversity. Querétaro is located in an environmentally very diverse zone, and that is beneficial, since it has diverse habitats in a relatively small zone. One species that caught our eye was *Megaselia scalaris* which is interesting as the larvae may cause sanitary problems. The larvae of this fly are also interesting. The collection and study of specimens of this species and their characterization may allow us to identify some problems where it is extant, and eventually evaluate whether it can mean problem to the human population.

Palabras Clave: Drosophilidae, Querétaro, Cactofílics, Repleta, Megaselia

INTRODUCCIÓN

Drosophilidae es una gran familia cosmopolita del orden de los dípteros, incluye 3, 950 especies existentes válidas, así como 12 especies fósiles y más de 4, 850 nombres, que incluye, entre otros, al género Drosophila, conocidas vulgarmente como moscas de la fruta o del vinagre. Es uno de los grupos de insectos más importantes ya que incluye a un organismo modelo, *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830 (Brake y Bächli, 2008).

A pesar de la diversidad de artrópodos y de la cantidad de estudios de diversidad que se han realizado hay muy poca información sobre la diversidad de Drosophilidae. Un ejemplo de ello es que en la serie *Biodiversidad, taxonomía y biogeografía de artrópodos de México: hacia una síntesis de su conocimiento* (Llorente Bousquets et al. 1996, 2000, 2004; Llorente Bousquets y Morrone 2008) existe una gran cantidad de información sobre los artrópodos que se encuentran en México. Sin embargo, la información para dípteros de México es muy escasa. Para dar una idea de ello, en una de sus tablas contiene un estimado de especies de dípteros para México de entre 3,290-30,000 (Ibáñez-Bernal, 2008), de las cuales 277 serían endémicas y de las cuales sólo hay 2, 091 descritas, y de entre estas solo 1,645 están incluidas en dicha compilación, y no se encontraron registros de Drosophilidae.

[1] Universidad Autónoma de Aguascalientes, Departamento de Biología, Centro de Ciencias Básicas; Av. Universidad No. 940, Ciudad Universitaria, C.P: 20131, Aguascalientes, Aguascalientes, megmm.1993@gmail.com

[2] Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Neurobiología; Boulevard Juriquilla 3001, Colonia Villas del Mesón, C.P: 76230, Juriquilla, Querétaro, riesgo@unam.mx

El estado de Querétaro se encuentra en el centro del país en una zona donde coinciden tres regiones naturales: el eje Neovolcánico Transversal, la Sierra Madre Oriental y la Altiplanicie Mexicana; limita con los estados de San Luis Potosí, Hidalgo, el estado de México, Michoacán y Guanajuato, está formado por una gran variedad de paisajes naturales, cuyas características de relieve y clima han permitido el desarrollo de 5 regiones.

El municipio de Santiago de Querétaro tiene llanos y pequeñas serrarías aisladas. Una de las elevaciones importantes es el cerro Ccimatario (con una altura de 2,400 msnm). En esta región el clima varía de seco a semiárido, siendo mayo el mes con mayores temperaturas cálidas, pero con lluvias en verano. La vegetación que domina en la región es matorrales, aunque también hay pastizales y en el cerro del cimatario encontramos un bosque de pino-encino (INEA, 2003)

MÉTODOS Y MATERIALES

Colectas y localidades: Las capturas de los organismos se realizaron en Juriquilla, y Laguna de Servín.

En Juriquilla se colocaron trampas del estilo de Marcow y O'Grady (2006), basado en el método de Carson y Heed (1983) que consiste básicamente en una trampa de cebo. Esta táctica es muy útil sobre todo para aquellas moscas que les gusta la fruta en descomposición. Se colocaron dos tipos de trampas, una realizada con plátano maduro, agua y levadura, y la segunda con un cactus en putrefacción, levadura y agua. Para la preparación de la trampa se usaron botellas de plástico (de litro y medio aproximadamente) donde se colocaron los cebos y unas cuantas ramas.

Esto último se hizo con la finalidad de que las moscas tuvieran donde detenerse. Estos contenedores se colocaron en lugares altos, en ramas de árboles donde hubiera sombra para tener una mejor colecta. Los muestreos se realizaron en el mes de Julio. Las trampas permanecían dos días colgadas y posteriormente se llevaban al laboratorio para colectar los organismos que se encontraban ahí.

En el caso de laguna de Servín, se realizó una colecta de diversos hongos para comprobar en el laboratorio que hubiera moscas. Estos hongos se colocaron en una caja de cristal dando la oportunidad de que se desarrollaran las larvas, además de una colecta por medio de red entomológica. La identificación de las especies se hizo mediante análisis de la morfología externa, haciendo uso de diversas claves taxonómicas (Disney, 1989; Disney, 1983; Patterson y Mainland 1944), además de análisis moleculares por medio de PCR; para la extracción de ADN se colocó una mosca anestesiada en un tubo eppendorf de 1.5 ml, en el cual se maceró el insecto y posteriormente se colocaron 50 µl de squishing buffer (SB) el cual contenía Tris-Cl pH 8.2, 10 mM, EDTA1 mM, NaCl 25 mM, Triton al 0.2%, y aproximadamente 10 microgramos de Proteinasa K. Posteriormente se incubó a 37° C por 30 minutos (a 300 rpm), y para inactivar la proteinasa K se aumentó la temperatura de la incubadora a 95° C por dos minutos.

Después se realizó el análisis por PCR para el cual se tomaron 2 µl del homogenado, 2 µl de buffer, 1.5 mM de MgCl, 10 mM de nucleótidos, 12 µl de H_2O, y 2 µl de primers (1 µl de cada uno, concentración final de 20 pmolas/microlitro). Los primers utilizados fueron para amplificar la Citocromo Oxidasa 1 (CO1). Finalmente, a esta mezcla se agregó 0.5 µl de Taq polimerasa. Una vez realizada la PCR para CO1 se separaron los amplicones por medio de electroforesis en gel de agarosa por aproximadamente 30 minutos a 100 V. Se usó bromuro de etidio para teñir y fotografiar los amplicones por medio de luz UV.

RESULTADOS

Para la zona de Juriquilla se tienen identificados preliminarmente los siguientes organismos:

Género Drosophila

Subgénero Dorsilopha
- *Drosophila busckii* (Coquillet, 1901)

Subgénero Drosophila

(Grupo Repleta)
- *D. fulvimacula* (Patterson & Mainland, 1994)
- *D. arizonie* (Patterson and Wheeler)
- *D. melanopalpa* (Patterson and Wheeler, 1942)
- *D. mojavensis* (Patterson and Crow, 1940)
- *D. bifurca* (Patterson and Wheeler, 1942)
- *D. spenceri* (Patterson, 1943)
- *D. hamatofila* (Patterson and Wheeler, 1942)
- *D. repleta* (Woolaston, 1858)

Subgénero Sophophora

(Grupo Melanogaster)
- *D. ananassae* (Dollescha, 1858l)
- *D. simulans* (Stutervant, 1919)

(Grupo Obscura)
- *D. pseudooscura* (Frolova in Frolova and Asterauv. 1929)

Género Megaselia
- *Megaselia scalaris* (Loew, 1866)

Género Zaprionus
- *Zaprionus indianus* (Coquillet, 1902)

Todos los organismos fueron colectados con las trampas de plátano maduro. En las trampas del cactus en putrefacción no se encontraron organismos, y para el caso de los hongos colectados en laguna de Servín solo se encontró un organismo, que se identificó como *Drosophila victoria*.

Para la PCR se obtuvieron resultados para *D. simulans*, *D. busckii*, *D. hamatofila*, *D. pseudooscura* que se muestran en la imagen 1. La banda esperada tiene un longitud de 750 bp. Estas bandas se cortaron del gel y se mandarán secuenciar posteriormente.

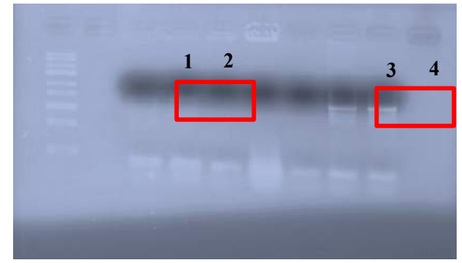


Imagen 1 PCR D. simulans(1), D. busckii(2), D. hamatofila(3), D. pseudooscura(4)

DISCUSIÓN

La diversidad de ambientes naturales favorece una gran variedad de flora y fauna. La topografía accidentada y el clima favorecen una mayor diversidad de especies. Como ya se ha mencionado, Querétaro se encuentra en una zona que se ve beneficiada en varios sentidos. Podemos observar que se colectaron una amplia variedad de especies. No hay muchos registros de las especies que se encuentran en la zona del Bajío, y para Querétaro es aún menor. Oliveira y colaboradores (2005) mencionan que una de las especies que podemos encontrar en la región es *D. spenceri* (imagen 2) la cual se encuentra con mayor abundancia en especies de cactus columnares; *D. spenceri* está más relacionada a las especies de los neotropicos, aunque en dicho trabajo, Oliveira y colaboradores (2005) no la tiene registrada para el estado tiene registros en el estado de San Luis y de Hidalgo cercanos al estado de Querétaro.

Cabe mencionar que hasta el 2005 se tiene registrado que *D. spenceri* es endémica del país ya que en todos los registros solo se había encontrado en México.

Imagen 2. D. spenceri

Imagen 3. D. simulans

Markow (2016), comenta que *Drosophila busckii*, *D. immigrans*, *D. hydei*, *D. simulans* y *D. melanogaster* son de las especies más cosmopolitas, por lo que no es extraño que encontremos algunas de estas moscas en la región. También menciona que cuando una fruta se está pudriendo, la primera en aparecer la mayoría de las veces es *D. simulans* (imagen 3), pero al mismo tiempo es la primera en dejar el alimento ya que su tolerancia a niveles altos de etanol es muy baja, por lo que no la encontramos en alimentos muy podridos. Nosotros encontramos que *D. simulans* es una de las especies más abundantes. Se observó que cuando se tenía en los tubos donde se mantienen a las moscas para investigación es la que se reproducía con mayor facilidad, y además es una de las moscas más activas.

Otra de las moscas que se observó era muy "fuerte", es decir que pueden salir con facilidad de la tapa de algodón, o que buscan hacerlo son *Megaselia scalaris*, que comúnmente la podemos encontrar en casa. Esta especie conlleva un interés particular ya que es capaz de transmitir mecánicamente organismos patógenos. García y colaboradores (2010) mencionan que incluso, con frecuencia las larvas de esta mosca contaminan cultivos de otros insectos, como es el caso del vector de la enfermedad Chagas *Triatoma brasiliensis* (Costa *et al., 2007)* y observando su comportamiento en los tubos de comida, sus larvas suelen ser muy agresivas, ya que son carnívoras, es decir, se comieron a sus progenitores. Son larvas generalmente grandes como se muestra en la imagen 4

Imagen 4. Larva, pupa y adulto de M. scalaris

Zaprionus indianus es una especie invasora, se sabe que su origen es del continente africano, y un estudio realizado en 2008 por Yassin y colaboradores, muestra un mapa donde se distribuye hasta esa fecha en el mundo. Estudios más recientes la han ubicado en el país. En esta ocasión la encontramos en nuestra colecta, aunque solo se encontró un organismo

Como se puede observar, el grupo del que más especies se colectaron fue repleta. Se identificaron 8 especies. Wasserman (1992) menciona que, de hecho, es uno de los grupos más grandes y Etges y colaboradores (2001) coinciden con ello, ya que nos dice que contiene 91 especies endémicas del nuevo mundo, de los cuales la mitad de los miembros de este grupo son cactofílicos. Podemos distinguir fácilmente a este grupo, ya que una de sus características es que regularmente las quetas del tórax emergen de un punto negro, como podemos observar en la imagen 5.

Imagen 5. Drosophila hamatofila

CONCLUSIONES

El conocer las especies que se encuentran en un lugar nos permite conocer un poco más de su historia, ya que con trabajos que reporten las especies de un lugar tenemos los antecedentes para estudios posteriores y ver cómo cambian con el tiempo y las perturbaciones; si hay o no especies introducidas y cómo puede afectar a las especies nativas del lugar.

Es importante señalar que para el caso de Drosophilidae hay muy pocos estudios al respecto, por lo que me parece de gran importancia que este tipo de trabajos y actividades se lleven a cabo en todo el país. Es vital que un país tenga conocimiento de su diversidad para así poder tener un control adecuado de este, tratando de que no se permita que especies invasoras se establezcan, para tratar de mantener lo menos perturbado posible los recursos que nos ofrece la naturaleza.

BIBLIOGRAFIA

Libros

Patterson J, T. Mainland G, B. (1944). *The Drosophilidae of Mexico*. Texas. The University of Texas Publication

Artículos de libros

Brake, I. Bächli, G. (2008). "Drosophilidae (Diptera)". en *"World catalogue of insects 9*". Dinamarca. Apollo Books Aps. [Pp. 7]

Markow T, A. O'Grady P, M. (2006). "How to collect wild flies". en "*Drosophila, a guide to species identification and use"*. London. El Sevier [Pp. 143]

Soberín, J. Halffter, G. Llorente-Bousquets, J. (2008). "Estado del conocimiento de la biota". en Llorente-Bousquets J. y Ocegueda S. "*Biodiversidad, taxonomía y biogeografía de artrópodos de México: hacia una síntesis de su conocimiento"* México: Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad [Pp. 295]

Wasserman M. (1992) "Citological Evolution of the *Drosophila repleta* species group". En. Costas, B, II. Powell, J, R. *"Drosophila inversion polymorphism"* CRC Press, Inc. [Pp. 256]

Artículos de revista

Costa J, Almeida. Esperança G. Morales N. Dos S. Mallet Jr. Gonçalves T. Do Prado A. 2007. *First record of Megaselia scalaris (Loew) (Diptera: Phoridae) infesting laboratory colonies of Triatoma brasiliensis Neiva (Hemiptera: Reduviidae)*. Neotrop Entomol 36(6): 987-989

Etges, W, J. Armella, M, A. O'Grady, P, M. Heed, W, B. .2001. *Two new species of Drosophila (Diptera: Drosophilidae) in the repleta Group from Mexico*. Ann. Entomol. Soc. Am. 94(1): 16-20

Garcia F, P. Álvarez C, S. Quesada M, E. 2010. *Primera cita de Megaselia scalaris (Loew, 1866), (Diptera: Phoridae) en Apis mellifera iberiensis.* Rev. Ibero-Latinoamericana Parasitología. 69 (1): 72-76

Ibañez-Bernal, S. 2008. *Catálogo de autoridad taxonómica del orden Díptera Insecta) en México. Parte 2: suborden Brachycera inferiores. Colección entomológica*. Instituto de Ecología, Xalapa. Base de datos SNIB-CONABIO, proyecto ES011 (en seguimiento).

Oliveira, D. C. S. G., O'Grady, P. M., Etges, W. J., Heed, W. B., & DeSalle, R. (2005). *Molecular systematics and geographical distribution of the Drosophila longicornis species complex (Diptera: Drosophilidae)*. Zootaxa, 1069, 1-32.

Artículos en línea

Instituto Nacional para la Educación de los Adultos delegación Querétaro (INEA). Abril 2003. "Geografía del Estado de Querétaro". en Biblioteca digital CONEVYT. [Pp. 10-33]. Consultada en http://bibliotecadigital.conevyt.org.mx/inea%5Cpdf%5C008%5C008004.pdf. (fecha de consulta 13-07-16)

Agradecimientos

Agradezco enormemente al Dr. Juan R. Riesgo, por permitirme trabajar con él, es un excelente investigador y una persona con una gran calidad humana. Me llevo por siempre los conocimientos que me permitió adquirir durante este verano, además del CONACYT y a la Universidad Autónoma de Aguascalientes que me permitieron formar parte de esta experiencia

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CICATRIZANTE DE *HAMELIA PATENS* (RUBICEAE) EN RATAS DIABÉTICAS

Nancy Lorena Morales Martínez[1] y Virginia Gabriela Cilia López[2]

RESUMEN

Hamelia patens perteneciente a la familia Rubiaceae es un arbusto que se distribuye en América, apreciado por sus usos medicinales pues tiene propiedades analgésicas, antimicrobianas y cicatrizantes. En el presente estudio se determinó el contenido químico de las hojas de *H, patens*. Se realizaron extractos metanólicos y hexánicos de hojas de *H. patens* recolectadas en la comunidad de Tocoy, San Antonio, S.L.P. Se realizó extracción en equipo Soxhlet. Se encontró una variabilidad de alcanos, ácidos grasos, flavonoides, obteniendo más compuestos en la extracción hexánica.

INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales tienen un papel importante, ya que los problemas de salud y la difícil consecución de los medicamentos sintéticos han llevado de nuevo a la búsqueda remedios basados en la medicina tradicional. Es así como el conocimiento de las plantas medicinales ha retomado importancia y cada día se ubica como una alternativa en el cuidado primario de la salud, debido a su eficacia, seguridad y bajo costo siempre y cuando se usada de manera adecuada (Fonnegra et al., 2007).

Hamelia patens (Rubiaceae) es un arbusto medicinal ampliamente distribuido en zonas tropicales del continente americano (Reyes et al., 2004). Es de hojas de elípticas a lanceoladas de 5-15 cm de longitud, agudas o acuminadas en el ápice. Son pubescentes, con los pecíolos rojizos. Su tallo color café, las flores de color naranja o escarlata, con corola largamente tubular y terminada en 5 lóbulos, a veces cubierta con pelillos que pueden ser erguidos o reclinados. El fruto es carnoso, globoso, de color rojo y al madurar es negro, mide unos 8 mm de longitud. Las semillas son numerosas y angulosas, su distribución se ve favorecida por pájaros y pequeños mamíferos (Cáceres, 1996). Crece mejor con humedad bien proporcionada y prefiere el sol en lugar de media sombra, Esta planta puede tomar calor y la sequía, pero un fuerte viento puede causar algunas hojas dorado (Gilman et al., 2014). Se distribuye desde el sur de los Estados Unidos hasta Argentina, atravesando México a Bolivia, Paraguay, Brasil e islas del Caribe (Cáceres, 1996).

Tiene diversos usos en la medicina tradicional, tiene propiedades analgésicas, antibacterianas, antifúngicas, antiinflamatorias, diuréticas, también se le atribuye propiedad astringente, cicatrizante, desinflamante, emoliente (Cáceres, 1996). En México se utiliza para 42 diferentes propósitos medicinales, especialmente para detener el sangrado, cicatrización de úlceras y trastornos menstruales (Mendoza, 2000). La evidencia experimental reciente indica que la aplicación tópica de una pomada elaborada con el extracto etanólico de partes aéreas de *H. patens* aumenta la resistencia a la rotura de heridas inducidas en ratas (Gomez et al., 2003). *Hamelia patens* se ha estudiado químicamente, se conoce que contienen alcaloides de oxindole pentacíclicos (Borge, 1979).

MÉTODOS Y MATERIALES

Material vegetal: *Hamelia patens* fue recolectada en la comunidad de Tocoy, San Antonio, S.L.P en el mes de enero.

[1] Instituto Tecnológico Superior de Irapuato, Ingeniería Bioquímica, Julian López, 2da sección las Heras, 36640,Irapuato, Guanajuato, NancyLorena_Morales@live.com
[2] Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, facultad de medicina , Av. Sierra Leona, 2da sección lomas, 78210, San Luis Potosí, San Luis Potosí, gabycl79@hotmail.com

Preparación de extractos
Extractos metanólicos: se pesaron 10 g de hojas secas pulverizadas de *H. patens* y se colocó en papel filtro. Se montó equipo soxhlet colocando 160 mL de metanol en el matraz bola durante 6 ciclos es una extracción exhaustiva a 80°C.

Extractos hexánicos: se pesaron 5 g de hojas secas pulverizadas de *H. patens* y se colocaron en papel filtro dentro de una bureta para fraccionamiento con 120mL de hexano. Se colocó en la campana de extracción y se maceró por 24 horas. Posteriormente se colocó el contenido en un vaso de precipitados, realizando un enjuague con 80 mL de hexano. Después se evaporó el hexano a baño maría a 37°C. Se retiró del baño maría cuando se obtuvo un volumen de 25 mL.

Una vez obtenidos los extractos, se tomaron 100µl en un vial para su lectura en el cromatógrafo y conocer los compuestos presentes.

RESULTADOS

Las tablas 1 y 2 muestran los componentes encontrados en las hojas de *Hamelia patens*, las figuras 1 y 2 muestran los compuestos mayoritarios encontrados para ambos extractos.

Tabla 1. Compuestos químicos mayoritarios de *Hamelia patens* presentes en el extracto hexano

Nombre	Familia	Tiempo de detección	Número CAS
hexadecane	alcano	10.563	000544-76-3
diethyl phthalate	ftalatos	10.74	000084-66-2
10-methylnonadecane	alcano	11.386	05686-62-5
nonadecane	alcano	11.444	000629-92-5
hexadecane, 4-methyl	alcano	11.644	025117-26-4
heptadecane,9-hexyl		11.919	055124-79-3
heptadecane	alcano	12.531	000629-78-7
squalane	isopreno	12.685	000111-01-3
n-hexadecylpyridinium bromide	alcano	13.395	000140-72-7
10-methylnonadecane	alcano	13.584	05686-62-5
ethanol,2-(dodecyloxy)	tipo éter (surfactantes)	13.612	004536-30-5
tetradecanoic acid	ácido graso	13.95	000544-63-8
hexadecanoic acid, 2-oxo-methyl ester	esteres	14.339	055836-30-1
dotriacontane	alcano	14.345	000544-85-4
3-buten-2-one,4-6(6,6dimethyl-1-ciclohexen-1-yl)	ácido graso	14.928	065133-79-1
1h-imidazole,4-methyl-5-nitro	ácido graso	17.303	014003-66-8
1,2-benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylpropyl) ester	Esteres	17.709	000084-69-5

1-hexadecanol	alcohol graso sintético	17.892	036653-82-4
hexadenanoi acid, methyl ester	Ester	19.58	000112-39-0
n-hexadecanoic acid	ácido graso	21.205	000057-10-3
1,2benzenedicarboxylic acid, butyl 8-methylnonyl ester	Éster	21.377	000089-18-9
hexadecanoiic acid ethyl ester	ácido graso saturado	22.521	000628-97-7
nanodecanoic acid, ethyl ester	Éster	22.527	018281-04-4
1-octadecanol	alcohol graso	26.876	000112-92-5
phytol	Alcohol	28.386	000150-86-7
9,12-octadecadienoic acid(zz)	ácido graso insaturado	29.828	000060-33-3

Tabla 2. Compuestos químicos mayoritarios de *Hamelia patens* en el extracto metanólico

Nombre	Familia	Tiempo de detección	Número cas
2-nonylmalonic acid, dimethyl ester	éster	5.812	1000210-44-7
4h-pryan-4-one,2,3-dihydroxy-6methyl	alcano	6.012	028564-83-2
ciclotetrasiloxane,octamethyl	ciclometicona	6.378	000556-67-2
indole	amino	7.231	000120-72-9
2-methoxy-4-vinylphenol	metoxifenoles	7.357	007786-61-0
phenol-2,35,6-tetrametyl	alcohol	7.454	000527-35-5
1h-pyrole-methyl	pirroles	7.637	000096-54-8
niacinamide	compuesto aromático	8.061	000098-92-0
phenol,2,4-bis(1,1, dimethylethyl)	alcohol	9.365	000096-76-4
megastigmatrienone	cetonas	11.545	038818-55-2
inositol	polioles	13.937	000087-89-8
adenine	purines	15.024	000073-24-5
2-heptadecanol	ácido graso	16.449	006876-13-7
cyclohexanemethanol,4,(1-methylethyl)-cis	ácido graso	17.227	013828-37-0
1ethynylcyclopentanol	alquino	17.942	017356-19-3
octanoic acid, octyl ester	éster	18.658	002306-88-9
hexadecanoic acid, methyl ester	éster	19.59	000112-39-0
n-hexadecanoic acid	ácido graso	20.935	000057-10-3

8,11octadecadienoic acid, methyl ester	éster	27.43	056599-58-7
9,12,15 octadecatrenoic acid, metil ester, (zzz)	éster	27.756	000301-00-8
phytol	alcohol	28.305	000150-86-7
octadecanoic acid, methyl ester	éster	28.98	000112-61-8
eicosanoic acid, methyl ester	éster	38.381	001120-28-1

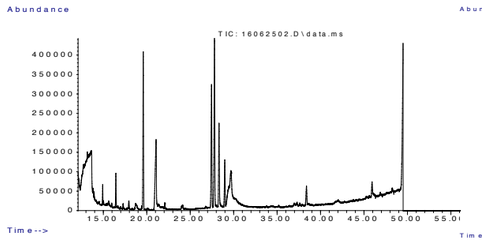


Figura 1. Espectro de *Hamelia patens* en metanol

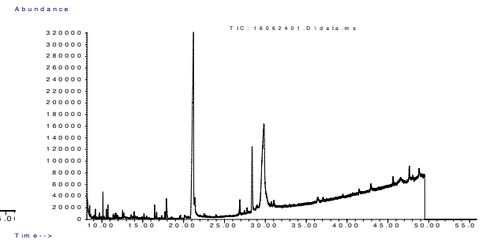


Figura 2. Espectro de *Hamelia patens* en hexano

CONCLUSIONES

A partir de las hojas secas de *Hamelia patens* obtuvimos diferentes compuestos químicos los cuales tiene una función farmacéutica tanto en el extracto de hexano como en el de metanol. Con los compuestos obtenidos y ya sabiendo se puede concluir que *Hamelia patens* efectivamente tiene un potencial bastante positivo en el área medicinal.

BIBLIOGRAFIA

Borges, J., Manresa M., Martin J., Pascual C., Rumbero A. (1979). *Tetrahedron Letters.* 34: 3197—3200

Cáceres, A. (1996), Plantas de uso medicinal en Guatemala. Guatemala. Editorial Universitaria. p.133 – 134

Gilman, E.F., Meerow, A. (2014). *Hamelia patens* firebush, scarlet bush. The Environmental Horticulture Department. University of Florida.1-3.

Fonnegra, G. R., Jiménez R.S.L. (2007). Plantas medicinales aprobadas en Colombia. Universidad de Antioquia. Colombia.

Gomez-Beloz A., Rucinski J., Balick M. y Tipton C. (2003). Double incision wound healing bioassay using *Hamelia patens* from El Salvador. *Journal of. Ethnopharmacoly.* 88: 169—173.

Mendoza-Márquez, P. (2000). Las plantas medicinales de la selva alta, perennifolia de los Tuxtla, Veracruz, un enfoque etnofarmacológico-químico. Tesis de licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.

Reyes-Chilpa, R., Rivera J., Oropeza M., Mendoza P., Amekraz B., Jankowski C. y Campos M. (2004). Methanol extracts of *Hamelia patens* containing oxindole alkaloids KCl-induced contraction in rat myometrium. *Biological. Pharmaceutical. Bulletin.* 27: 1-4.

FISIOLOGÍA DE LA GLIA EN LA ANOREXIA

Valeria Moreno Valencia[1] y Daniel Reyes Haro[2]

RESUMEN

La anorexia es el término para designar un trastorno psiquiátrico que se distingue por rechazo a la comida y pérdida de peso. Las causas de la anorexia y su prevalencia en mujeres adolescentes justifica el uso de modelos murinos para investigar sobre su neurobiología. El modelo murino de anorexia inducida por deshidratación (DIA) reproduce la disminución en la ingesta voluntaria de alimento y del peso corporal. La anorexia nerviosa puede alterar el correcto funcionamiento de algunas regiones del cerebro. Estudios recientes de resonancia magnética funcional indican que los pacientes adultos con *anorexia nervosa* presentan alteraciones en regiones del cerebro como el estriado. Los cambios en el volumen del estriado podrían reflejar cambios en la densidad de células nerviosas como la glía, el grupo más abundante del cerebro. Dentro de la glía encontramos a los astrocitos, células nerviosas que regulan la homeostasis del cerebro al proveer suplemento energético a las neuronas y sustratos para la neurotransmisión, además de participar activamente en la fisiología de la sinapsis tripartita.

El protocolo experimental consistió en seleccionar doce ratas adolescentes hembras de la cepa Wistar (180-200g) que fueron agrupadas proporcionalmente en tres grupos: 1) Grupo Control recibió agua y comida *ad libitum*, 2) Grupo DIA recibió alimento *ad libitum* y solución salina (2.5% de NaCl) y 3) Grupo de dieta restringida (FFR) recibió agua *ad libitum* y la misma cantidad de alimento que consumían en promedio el grupo DIA. El objetivo de este estudio fue investigar si la densidad de los astrocitos del estriado dorsal y núcleo accumbens se modifica por la anorexia. Los resultados mostraron que no hay diferencias significativas en la densidad de los astrocitos y la proporción astrocito-neurona en el estriado dorsal. Por otra parte, los resultados en el núcleo accumbens mostraron un incremento del 14.521% en la densidad de astrocitos en el grupo DIA pero sin diferencias significativas en el grupo de FFR. Adicionalmente, la proporción astrocito-neurona también se incrementó significativamente en el grupo DIA pero no en el FFR. Se concluye que la densidad de astrocitos se reduce en núcleo accumbens del grupo DIA como efecto de la deshidratación; la reducción en la ingesta de alimento no modifica la densidad de astrocitos.

ABSTRACT

Anorexia is the term for a psychiatric disorder characterized by refusal to eat and weight loss. The causes of anorexia and its prevalence in adolescent women justifies the use of murine models to investigate its neurobiology. The mouse model of anorexia induced dehydration (DIA) reproduces the voluntary decrease in food intake and body weight. Anorexia nervosa can disrupt the proper functioning of some brain regions. Recent funtional Magnetic Resonance Imaging (fMRI) studies on anorexic patients showed alterations in brain regions such as striatum. Changes in striatal volume may reflect changes in the density of nerve cells such glia, the most abundant cell group in the brain. Astrocytes are a type of glia that that regulate brain homeostasis by providing energy supplement to neurons and substrates for neurotransmission and actively participate in the physiology of the tripartite synapse.

[1] Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Psicología; Cerro de Las Campanas s/n, Las Campanas, C.P: 76010, Santiago de Querétaro, Querétaro, vamval01@gmail.com
[2] Instituto de Neurobiología, UNAM. Departamento de Neurobiología Molecular y Celular; Boulevard Juriquilla #3001 C.P: 76230, Juriquilla, Querétaro, dharo@unam.mx

The experimental protocol consisted of five days where twelve Wistar rats female adolescents, between 180-200g were kept in individual cages in light-dark normal cycle, were divided into three groups, the control group received food and water ad libitum, the DIA group received food ad libitum and 2.5% NaCl in water intake and restricted diet group (FFR) received water ad libitum and the same amount of food consumed on average DIA group. The aim of this study was to investigate whether the density of astrocytes dorsal striatum and nucleus accumbens is modified by anorexia. The results showed no significant differences in the density of astrocytes and astrocyte-neuron ratio ~~the~~ in the dorsal striatum. However, the results in the nucleus accumbens showed an increase of 14,521% in the density of astrocytes in the DIA group but no significant differences in the FFR group. Additionally, the astrocyte-neuron ratio was also significantly increased in the DIA group but not in the FFR group. It is concluded that the DIA group reduced astrocyte density only in nucleus accumbens as a result of dehydration; reduction in food intake does not change the density of astrocytes.

Palabras Clave: Anorexia, cuerpo estriado, neuroglia, astrocitos.

INTRODUCCIÓN

La anorexia es un trastorno psiquiátrico y alimenticio caracterizado por una considerable pérdida de masa y peso muscular, en conjunto con alteraciones en la salud mental y física. Las causas son variadas, sin embargo, la presión social juega un papel importante desde los estereotipos y modelos fuertemente arraigados, y algunas de las consecuencias son la desnutrición, disminución de glóbulos blancos, arritmias cardiacas por bajos niveles de potasio, debilitamiento óseo, entre otras (Marín, 2002). Las estadísticas muestran un alarmante incremento en incidencia de éste y otros trastornos alimenticios; tomando en cuenta que es una afección grave y en algunos casos puede resultar mortal, por ello es importante investigar sobre la neurobiología de la anorexia.

La acción de comer es regulada por distintas áreas del cerebro, el neurocircuito comienza con las entradas sensoriales gustativas en áreas corticales, las regiones límbicas como el tálamo e hipotálamo captan y transmiten energía de los macronutrientes mediante la señalización de las hormonas que estimulan el almacenamiento y reservas de nutrientes como la insulina y glucagón que alertan a las células de los niveles de glucemia para disponer de fuentes energéticas y emplear mecanismos homeostáticos, aunado a esto, el cuerpo estriado tiene un papel fundamental en la regulación de la ingesta de comida mediante mecanismos de recompensa y satisfacción desde los impulsos dopaminérgicos del área ventral del estriado, catalogando al núcleo accumbens como el “centro del placer”.

El cuerpo estriado está compuesto por el núcleo caudado, putamen y núcleo accumbens. Es la estructura principal de entrada de los ganglios basales, está conectado a través de vías directas e indirectas con los núcleos de salida; las proyecciones de retroalimentación dentro del circuito de los ganglios basales son a través del sistema dopaminérgico nigroestriatal, este proporciona una entrada dopaminérgica al área ventral del estriado. Sobre su organización celular más del 90 % son las neuronas espinosas de proyección media, por otro lado, se encuentran las neuronas piramidales corticales, estas utilizan glutamato como neurotransmisor y proporcionan la principal entrada excitadora para el cuerpo estriado, y las interneuronas que distribuyen los axones dentro del cuerpo estriado y la mayoría hacen contacto sináptico con las neuronas de proyección espinosa. (Paxinos, 2015). El núcleo accumbens es una estructura fundamental para la regulación de la ingesta de alimentos y deseo de comer (Benabid, 2013), por lo que trastornos alimenticios han sido fuertemente relacionados con la estructura del cuerpo estriado y específicamente del estriado ventral.

El estriado dorsal y el núcleo accumbens están implicados en la formación de hábitos. Ante esto, se ha relacionado la alteración en procesos de formación de hábitos y trastornos alimenticios mediante estudios de resonancia magnética en pacientes con anorexia que revelaron alteraciones en el sistema dopaminérgico del cuerpo estriado, con notables cambios en procesos de motivación y recompensa (Favaro et al, 2014). Finalmente estudios recientes de resonancia magnética funcional en pacientes

con anorexia reportaron cambios en el volumen del estriado ventral (Fladung et al., 2013), lo que podría reflejar cambios en la densidad de células nerviosas como la glía, el grupo más abundante del cerebro. Dentro de la glía encontramos a los astrocitos, células nerviosas que regulan la homeostasis del cerebro al proveer suplemento energético a las neuronas y sustratos para la neurotransmisión, además de participar activamente en la fisiología de la sinapsis tripartita. Uno de los modelos murinos experimentales que replican ciertas características de la anorexia nerviosa, como la disminución de peso por disminución en la ingesta voluntaria de alimento, es el de la anorexia inducida por deshidratación (DIA). En este estudio se utilizó el modelo DIA para investigar si la densidad de los astrocitos del estriado se ve afectada por la anorexia.

METODOLOGIA

Todos los procedimientos se realizaron siguiendo las normas éticas del Instituto de Neurobiología, U.N.A.M.

Se utilizaron 12 ratas wistar hembras adolescentes (180 – 200 g), generando tres grupos experimentales con cuatro ratas cada uno: grupo Control recibió agua y alimento *ad libitum*, el alimento se restablecía a 50g diariamente, grupo de anorexia inducida por deshidratación (DIA) recibió agua con NaCl al 2.5% (25g de NaCl por 1lt de agua) y alimento *ad libitum* y grupo de dieta restringida (FFR) control positivo que recibió en promedio la misma cantidad de comida ingerida por el grupo DIA y agua ad libitum. El protocolo experimental fue de cinco días en los que se mantuvieron en jaulas individuales en ciclo luz-oscuridad normal. Al finalizar el experimento, las ratas fueron perfundidas intracardialmente con un buffer de fosfatos adicionado con paraformaldehido al 4% (0.1M PBS + PFA 4%). Los cerebros fueron aislados y se criopreservaron a -20ºC. Se obtuvieron cortes histológicos sagitales de 30µm que incluyeran al cuerpo estriado, de acuerdo a la guía estereotáxica (Paxinos, 2015) en criostato (Leika). Posteriormente se realizó un protocolo de inmunohistofluorescencia con los anticuerpos para astrocitos (anti-GFAP, IgG rabbit [1:1000], Dako) y un marcador neuronal (anti-NeuN. IgG mouse [1:1000], Millipore). Los anticuerpos fueron revelados utilizando Alexa498 (Anti-IgG rabbit, 1:1000, Molecular Probes) y Alexa594 (Anti IgG mouse, 1:1000, Molecular Probes) y se realizó una contratinción para núcleos celulares con 4',6'-Diamidino-2-Phenylindole Dilactato (DAPI, 1:5000, Invitrogen). Al finalizar, los tejidos fueron montados en portaobjetos y conservados en medio de montaje para fluorescencia (Vectashield, Vector Labs), para su posterior observación por microscopía de fluorescencia (Nikkon).

El estriado se dividió en dos regiones para su análisis: estriado dorsal y núcleo accumbens (estriado ventral), de acuerdo a las especificaciones anatómicas del atlas (Paxinos, 2015), obteniendo fotografías con un área de 412 500μ^2. La cuantificación celular se realizó con el programa Cell Profiler, realizando una conversión de los datos crudos por un factor de 2.424242 para su presentación en mm^2.

RESULTADOS

Efecto de la anorexia sobre la densidad de astrocitos en el estriado dorsal

La estimación del porcentaje de astrocitos en el estriado dorsal para el grupo control fue de de 5.029 ±0.773 % de astrocitos//mm^2 (n=4), mientras que para los grupos DIA y FFR no se encontraron diferencias significativas [7.237±3.242 % (n=4) y 9.150±2.555 % (n=4), respectivamente p=0.686]. Por otra parte, se estimó el cociente de astrocito (GFAP) / neurona (NeuN) para el grupo control (0.093 ±0.014%; n=4) y tampoco se encontraron diferencias significativas respecto a los grupos DIA y FFR (0.140 ±0.072; n=4 y 0.181 ±0.053; n=4 respectivamente, p=0.69)

Efecto de la anorexia sobre la densidad de astrocitos en el núcleo accumbens

La estimación del porcentaje de astrocitos en el núcleo accumbens para el grupo control fue de 4.4196±1.059 % de astrocitos /mm2 (n=4), mientras que para el grupo DIA se estimó un incremento significativo (14.521±2.611 % astrocitos/mm^2; n=4; p=0.013). Sin embargo en el grupo FFR no se detectaron cambios respecto al control (4.560±0.790 % astrocitos / mm2; n=4; p=0.013). En conjunto

estos resultados indican que el incremento significativo estimado en el grupo DIA es producto de la deshidratación y no de la disminución en la ingesta de alimento, puesto que el grupo FFR no presentó cambios significativos respecto al control. Por otra parte, se estimó el cociente de astrocito (GFAP) / neurona (NeuN) para el grupo control (0.0887 ±0.0126; n=4), el cual se incrementó significativamente en el grupo DIA (0.419 ±0.107; n=4; p=0.047) pero no en el grupo FFR (0.119 ±0.020; n=4; p=0.047).

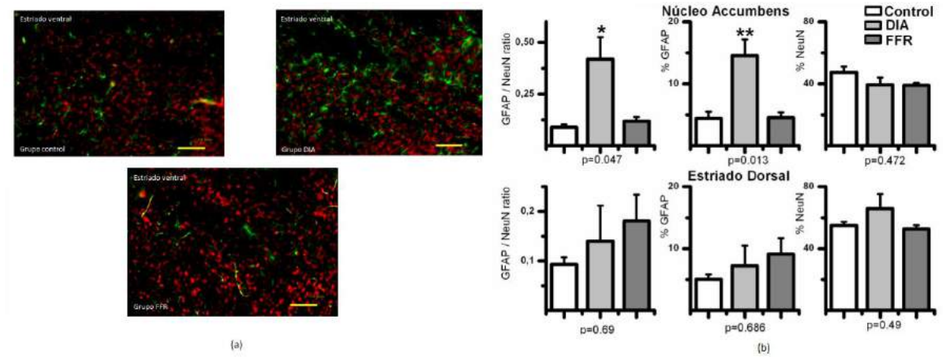


Figura 1. Efecto de la anorexia sobre la densidad de astrocitos, neuronas y la relación astrocito/neurona en el estriado. A, Imágenes de inmunofluorescencia en el núcleo accumbens (estriado ventral) que muestran a los astrocitos (GFAP+, en verde) y las neuronas (NeuN+, en rojo) para los tres grupos experimentales: control, DIA y FFR. B, Estimación del cociente astrocito/neurona, porcentaje de astrocitos y neuronas en los tres grupos experimentales (control, DIA y FFR) para el núcleo accumbens y el estriado dorsal. Los datos muestran un incremento significativo en la densidad de los astrocitos del grupo DIA respecto al control que también incrementa significativamente el cociente astrocito/neurona (p=0.013).

DISCUSIÓN

Existe un incremento gradual de astrocitos durante la vida adulta de las ratas, pero un incremento anormal de los astrocitos llamado astrogliosis es considerado como un indicador de neuroinflamación o de neurotoxicidad. Esta respuesta astrocitaria se debe principalmente por daños microambientales como agresiones físicas o químicas al organismo (García, 2009), ello explicaría la concentración de astrocitos en el grupo expuesto a deshidratación tomando en cuenta la irregularidad de nutrientes. Esto resulta importante ya que como se mencionó, los astrocitos intervienen para una correcta funcionalidad cerebral como regular el flujo sanguíneo de la actividad neuronal y mantener el microambiente metabólico.

La ingesta de alimentos está mediada por las vías cerebrales para la motivación y el refuerzo; los trastornos alimenticios suponen la desregulación de estas vías. El estriado ventral siendo parte del sistema mesolímbico dopaminérgico (que incluye regiones como el tálamo e hipotálamo) está relacionado con el procesamiento de recompensa y motivación al tener alcance en el núcleo accumbens. Los resultados encontrados en el grupo DIA indican que estos efectos se deben directamente por la deshidratación y no por inanición, sin embargo, tomando en cuenta las funciones de la región explorada, se sostiene que aspectos motivacionales y hedónicos de la alimentación se vieron igualmente afectados. (Avena, 2012).

Si bien este modelo animal sobre la anorexia es pionero dentro de los que se han realizado anteriormente al no tener restricción de alimento, sino que se reprodujeron las conductas de la anorexia mediante la deshidratación, la pérdida de nutrientes que esta conlleva presupone la influencia de las interneuronas del cuerpo estriado anteriormente mencionadas, asociadas con el cese de la alimentación; en tanto que se ha observado que responden a estímulos que anteceden una recompensa y están relacionadas con la organización y procesamiento de información que recibe y envía el estriado (Kimura et al, 1984).

Por otro lado, hay un factor presuntamente compartido a los otros modelos sobre el estrés al instigar comportamientos anoréxicos (Miller en Avena, 2012), de igual manera, se ha encontrado una correlación positiva entre pérdida de peso corporal y metabolismo lento en el estriado ventral (Van Kuyck en Avena, 2012).

CONCLUSIONES

Las investigaciones de modelos experimentales con ratas sobre procesos neurobiológicos en trastornos mentales como la anorexia, ayudan para documentar y prevenir las consecuencias que estas conductas pueden causar. En particular, los estudios de anorexia inducida por deshidratación producen un efecto fisiológico que reproduce la conducta observada en la anorexia.

Los resultados de esta investigación permiten observar que la densidad de astrocitos y la proporción neurona-astrocito no se ve afectada en el estriado dorsal. Por otro lado, en el núcelo accumbens (estriado ventral) la densidad de astrocitos y la proporción neurona-astrocito se incrementa significativamente en el grupo DIA pero no en el FFR, lo que indica que el efecto es producido por la deshidratación y no por la reducción en la ingesta de alimento.

BIBLIOGRAFIA

AVENA, N. (2012). “Dysregulation of Brain Reward Systems in Eating Disorders: Neurochemical Information from Animal Models of Binge Eating, Bulimia Nervosa, and Anorexia Nervosa” en Neuropharmacology, no. 63, vol. 1, [pp. 87-96]

BEKKEVOLD, C et al. (2013). “Dehydration Parameters and Standards for Laboratory Mice” en Journal of the American Association for Laboratory Animal Science, no. 3, vol. 52, [pp. 233-239].

BENABID, A. (2013). “Comment on ‘Treatment of Intractable Anorexia Nervosa with Inactivation of the Nucleus Accumbens Using Stereotactic Surgery’ en Stereotact Funct Neurosurg. Pág 1.

MARÍN, V. (2002). “Trastornos de la conducta alimentaria en escolares y adolescentes” en Revista chilena de nutrición, No. 2, pp. 86-91. Consultada en http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182002000200002 (fecha de consulta 11-07-2016).

FÁVARO, A et al. (2014). “Effects of obstetric complications on volumen and functional connectivity of Striatum in anorexia nervosa patients” en International Journal of Eating Disorders. No. 47, [pp. 686-695].

FLADUNG, A et al. (2013). “Role of the ventral striatum in developing anorexia nervosa” en Nature. Vol. 3, [pp. 1-6].

GARCÍA, S. (2009). Alteraciones de los astrocitos en el envejecimiento y en la enfermedad de Alzheimer. Universidad de Barcelona.

KIMURA, M et al. (1984) Tonically discharging putamen neurons exhibit set-dependent responses. Proc Natl Acad Sci, [pp. 4998-5001].

PAXINOS, G. (2004). The rat nervous system, Australia: Elsevier Editorial.

PAXINOS, G. (2015). The rat nervous system, Australia: Elsevier Editorial.

REYES, D et al. (2015). “Dehydration-Induced Anorexia Reduces Astrocyte Density in the Rat Corpus Callosum” en Neural Plasticity, Vol. 2015, Article ID 474917, [pp. 1-8].

INFLACIÓN Y CUERDAS

César Muro Cabral[1] y Oscar Loaiza Brito[2]

RESUMEN

En el presente trabajo se hace un análisis de la cuerda bosónica cerrada, su cuantización mediante el cono de luz, para luego obtener los estados de la cuerda junto con el espectro de masas y, una vez ahí, reconocer el gravitón (la partícula teórica portadora de la fuerza de gravedad). El trabajo es sólo de corte teórico. Su importancia radica en que es una buena introducción a la llamada teoría de cuerdas- hoy en día uno de los modelos más importantes de la física teórica. El resultado proyecto es una comprensión de la esencia de dicha teoría.

ABSTRACT

This paper presents a general introduction to strings theory by understanding the closed bosonic string. We start by giving a general idea about the graviton, subsequently the characteristics of a closed string, and the Polyakov action. We pursue to quantize by the light-cone coordinates, to obtain the Hamiltonian, the field equations and then we see that each oscillation state of the string is observed as a particle from the spacetime viewpoint. There, we’ll find the graviton.

Palabras Clave: Gravitón, Cuerda Cerrada, Acción de Polyakov, Cuantización, Estados de la cuerda.

INTRODUCCIÓN

La teoría de cuerdas es uno de los modelos más importantes de la física teórica. Su esencia es que la unidad fundamental del universo son objetos llamados cuerdas que, según sus estados de vibración, es como se manifiestan las partículas. Tales cuerdas tienen tamaño del orden de Planck y, según la teoría de supercuerdas, se mueven en 10 dimensiones- 9 espaciales y 1 temporal. En este trabajo se trata un modelo de cuerdas más pedagógico que realista, ya que el estado base son taquiones y los demás niveles del espectro son sólo bosones. Después de presentar al gravitón, se analizará la cuerda bosónica cerrada usando la acción de Polyakov. De tal acción se mencionan sus características, se cuantiza con las coordenadas del cono de luz, se obtiene su hamiltoniano, se re-expresa el anterior con las ecuaciones de campo para así llegar al espectro de masa de la cuerda cerrada, donde estará el gravitón. La mayoría de los cálculos fueron realizados, cosa que no se suele hallar en la bibliografía, pero por falta de espacio se omitirán.

MÉTODOS Y MATERIALES

Los materiales usados fueron puramente bibliográficos. El método de trabajo fue ir estudiando y entendiendo temas secuenciales estructurados y ordenados por el investigador anfitrión. Tal proceso se realizaba en base a lecturas recomendadas y continúas asesorías, en donde se buscaba primero dar un panorama general sobre lo que se iba a estudiar, luego para aclarar detalles y resolver dudas.

RESULTADOS

[1]Universidad Autónoma de Zacatecas, Unidad Académica de Física; Calzada Solidaridad esquina con paseo a la bufa S/N, Campus Universitario II, C.P: 98060, Zacatecas , Zacatecas, cmuroc@yahoo.com.mx
[2]Universidad de Guanajuato, División de Ciencias e Ingenierías; Lomas del Bosque #103, Lomas del Campestre. C.P: 37150, León, Guanajuato, oloaiza@fisica.ugto.mx

Obtengamos una visión general sobre el gravitón. Tomemos un campo gravitacional débil: un espacio de Minkowsky con una perturbación, es decir la métrica:

$$g_{\mu\nu} = \eta_{\mu\nu} + h_{\mu\nu} \quad con \left|h_{\mu\nu}\right| \ll 1 \qquad (1)$$

Después de linealizar con las ecuaciones de Einstein para obtener una ecuación de movimiento y usando las coordenadas del cono de luz, llegamos a que los grados de libertad de un campo D-dimensional gravitacional están llevados a cabo por el tensor de campo transversal, simétrico, sin traza h^{IJ}. Este tensor tiene tantas componentes como una matriz cuadrada, simétrica sin traza de tamaño (D-2). El número de componentes *n(D)* de tal matriz es:

$$n(D) = \frac{(D-2)(D-1)}{2} - 1 = D(D-3)/2 \qquad (2)$$

Para obtener los estados del gravitón, cada uno de los campos independientes clásicos h^{IJ} es expandido en términos de operadores de creación y aniquilación. Para hacerlo necesitamos osciladores (operadores de creación y aniquilación): $a^{IJ}_{p^+,p^T}$ y $a^{IJ^+}_{p^+,p^T}$.

Introducimos el vacío $[\omega >$ y una base de estados: $a^{IJ^+}_{p^+,p^T}[\omega >$

Un estado de un gravitón con momento (p^+, p^T) es una superposición lineal de tales estados*:*

$$\sum_{I,J=2}^{D-2} \varepsilon_{IJ}\, a^{IJ^+}_{p^+,p^T}[\omega > , \quad \varepsilon_{II} = 0 \qquad (3)$$

El vector transverso ε_{IJ} es llamado el vector de polarización.

Veamos sobre la cuerda bosónica cerrada. En general una cuerda, conforme se mueve en un espacio-tiempo D-dimensional, traza una superficie bidimensional. Tal superficie se le conoce como la hoja de mundo (worldsheet). Una cuerda cerrada va a trazar un tubo y una abierta una banda.

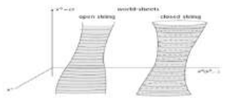


Figura 1

Parametrizamos la hoja de mundo con dos coordenadas: τ , σ .

Donde τ es el tiempo propio y σ es el espacio propio.

La incrustación de la cuerda en un espacio D-dimensional está dada por las ecuaciones de campo:

$$X_\mu = X_\mu(\tau,\sigma) \text{ con } \mu = 0,1,\dots,D-1. \qquad (4)$$

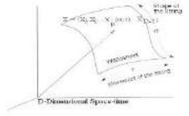


Figura 2

Podemos asumir que la métrica del espacio D-dimensional es Minkowsky.

Para cuerdas cerradas, el parámetro σ es periódico, es decir, tiene la condición de frontera:

$$X_\mu(\tau,\sigma) = X_\mu(\tau,\sigma+n) \qquad (5)$$

La acción natural para la configuración de la cuerda es la integral sobre el elemento de área sobre la hoja de mundo, en principio medido con la métrica del espacio-tiempo donde se mueve la cuerda h_{ab}. Así, la llamada acción de Nambu-Goto es:

$$S_{NG} = -1/2\pi\alpha' \int_\Sigma d^2\xi(-h)^{1/2} \qquad (6)$$

Donde denotamos a Σ como la hoja de mundo, a $\sigma\ y\ \tau$ como ξ^a $(con\ a = 1,2)$. Además $h = \det(h_{ab})$ y α' está relacionada con la tensión de la cuerda $T = \frac{1}{2\pi\alpha'}$.

Para la cuantización de la cuerda necesitamos usar una acción más conveniente, tal es la acción de Polyakov, que es equivalente a la acción de Nambu Goto. Introducimos otro grado de libertad sobre la hoja de mundo- una métrica inherente a la hoja de mundo $g_{ab}(\xi)$ que es en principio independiente de la métrica h_{ab} . Si tomamos a la métrica h_{ab} como Minkowsky, la acción natural (Polyakov) sobre la hoja de mundo es:

$$S_P = -1/4\pi\alpha' \int_\Sigma d^2\xi(-g)^{1/2} g^{ab}\partial_a X^\mu \partial_b X^\mu \eta_{\mu\nu} \qquad (7)$$

Donde igualmente denotamos a Σ como la hoja de mundo, y a $\sigma\ y\ \tau$ como $\xi^a, a = 1,2$. Si aplicamos la variación sobre g^{ab} $(\frac{\delta S_p}{\delta g^{ab}} = 0)$ sobre la acción, podemos reducir a la de Nambu-Goto.

La acción posee las siguientes importantes simetrías:

*Es invariante bajo transformaciones traslacionales y transformaciones de Lorentz:

$$X^\alpha \to X^\alpha + b^\alpha \quad \text{y} \quad X^\alpha \to X^\alpha + \Omega^\alpha_\beta X^\beta \qquad (8)\ y\ (9)$$

*Tiene simetría de Weyl. Podemos re-escalar el tensor métrico $(g_{ab} \to e^{-2\omega(x)} g_{ab})$ y la acción permanecerá invariante.

*La acción de Polyakov es invariante bajo reparametrizaciones $\tau \to \tau'(\tau,\sigma)\ y\ \sigma \to \sigma'(\tau,\sigma)$.

Con todas estas simetrías podemos fijar o calibrar de tal manera que la métrica inherente sea plana.

Primero vemos que de:

$$g_{\alpha\beta} = \begin{pmatrix} g_{00} & g_{01} \\ g_{10} & g_{11} \end{pmatrix} \qquad (\tau = 0, \sigma = 1) \qquad (10)$$

Tal es simétrica- tiene tres componentes independientes. Una reparametrización nos permite cambiar dos de las componentes independientes usando dos transformaciones de coordenadas: $g_{01} = g_{10} = 0$ y $g_{00} = \pm g_{11}$. De nuestra invarianza de la reparametización, vemos que nuestra métrica bidimensional es: $g(x)\eta_{\alpha\beta}$. Usando la transformación de Weyl removemos la función g(x) para así tener:

$$g_{\alpha\beta} = \eta_{\alpha\beta} = \begin{pmatrix} -1 & 0 \\ 0 & 1 \end{pmatrix} \qquad (11)$$

Nuestra acción de Polyakov se vuelve entonces:

$$S_P = -1/4\pi\alpha' \int_\Sigma d\sigma d\tau (X'^2 - \dot{X}^2) \qquad (12)$$

La cuantización de una cuerda relativista puede ser elaborada usando las coordenadas del cono de luz. Definimos las dos coordenadas $X^+ y\ X^-$ como dos combinaciones lineales independientes de la coordenada del tiempo y coordenadas espaciales conocidas.

$$X^+ = (1/\sqrt{2})(X^0 + X^1) \qquad (13)$$

$$X^- = (1/\sqrt{2})(X^0 - X^1) \qquad (14)$$

$$X^i \qquad i = 2,\dots,D-1$$

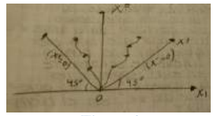


Figura 3

Para un espacio cuatro dimensional, suponiendo que la métrica donde se mueve la cuerda es Minkoswsky, de la invarianza de la métrica si $ds^2 = -(dX^0)^2 + (dX^1)^2 + (dX^2)^2 + (dX^3)^2$ y usando las ecuaciones *(14)* y *(15)* tenemos que la métrica del cono de luz es:

$$\widehat{\eta_{\mu\nu}} = \begin{pmatrix} 0 & -1 & 0 & 0 \\ -1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}$$

De donde se obtiene: $A_- = -A^+, A_+ = -A^-, A^i = A_i$ *(15)*

La calibración se sigue con varios pasos:

Fijamos el parámetro t estableciendo la llamada condición del cono de luz: $X^+(\sigma, t) = t$.

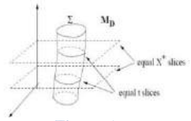


Figura 4

X^+ tiene el papel del tiempo en la hoja del mundo, y su conjugado $p_+ = -p^-$ de la energía de la hoja de mundo.

Escogemos una línea $\sigma_0(t)$ que intersecte todas las rebanadas ortogonales de t constante. A saber:

$$g_{t\sigma}(\sigma, t) = 0 \ \ en \ \ \sigma = \sigma_0(t) \qquad (16)$$

Para rebanadas de t constante, definimos una nueva coordenada espacial σ', que es definida como la distancia invariante a la línea de referencia a lo largo de la rebanada:

$$\sigma' = c(t) \int_{\sigma_0}^{\sigma} f(\sigma, t) d\sigma \qquad (17)$$

Donde: $f(\sigma) = (-g)^{\frac{1}{2}} g_{\sigma\sigma}(\sigma, t)$ *(18)*

$c(t)$ es un coeficiente independiente para imponer que la longitud de la cuerda es fija, una constante en t; llamémosla l.

Usamos la invarianza de Weyl para que imponer que $g = -1 \ \ \forall \sigma, t$. Así, desde que $f(\sigma)$ es un invariante de Weyl, se satisface que $\partial_\sigma f(\sigma, t) = 0$ y por tanto de la ecuación *(28)* se tiene que $\partial_\sigma g_{\sigma\sigma} = 0$.

Entonces la métrica y su inversa son:

$$g_{ab} = \begin{pmatrix} g_{\sigma\sigma}(t)^{-1}(-1 + g_{t\sigma}(\sigma, t)^2) & g_{t\sigma}(\sigma, t) \\ g_{t\sigma}(\sigma, t) & g_{\sigma\sigma} \end{pmatrix}; \ g^{ab} = \begin{pmatrix} -g_{\sigma\sigma}(t) & g_{t\sigma}(\sigma, t) \\ g_{t\sigma}(\sigma, t) & g_{\sigma\sigma}(t)^{-1}(-1 + g_{t\sigma}(\sigma, t)^2) \end{pmatrix}$$

Entonces el lagrangiano de Polyakov en las coordenadas del cono de luz es:

$$L = -1/4\pi\alpha' \int_0^l d\sigma \, [-2g^{tt}\partial_t X^+ \partial_t X^- + g^{tt}\partial_t X^i \partial_t X^i - 2g^{\sigma t}\partial_t X^+ \partial_\sigma X^- + 2g^{\sigma t}\partial_\sigma X^i \partial_t X^- + g^{\sigma\sigma}\partial_\sigma X^i \partial_\sigma X^i]$$

$$= -1/4\pi\alpha' \int_0^l d\sigma \, [g_{\sigma\sigma}(2\partial_t X^- - \partial_t X^i \partial_t X^i) - 2g_{\sigma t}(\partial_\sigma X^- - \partial_\sigma X^i \partial_t X^i) + g_{\sigma\sigma}{}^{-1}(1 - g_{\sigma t}{}^2)\partial_\sigma X^i \partial_\sigma X^i]$$

(19)

Definimos el centro de masa como: $x^-(t) = 1/l \int_0^l d\sigma X^-(\sigma, t)$ *(20)*

Y usando todo sobre la calibración anterior, el lagrangiano se reduce a:

$$L = \left(-\frac{l}{2\pi\alpha'}\right) g_{\sigma\sigma}\partial_t x^-(t) - (1/4\pi\alpha') \int_0^l d\sigma \, [g_{\sigma\sigma}\partial_t X^i \partial_t X^i - g_{\sigma\sigma}{}^{-1}\partial_\sigma X^i \partial_\sigma X^i] \qquad (21)$$

Los momentos conjugados para $x^-(t)$ y $X^i(\sigma, t)$ son, respectivamente:

$p_- = -p^+ = \frac{\partial L}{\partial(\partial_t x^-)} = -\frac{l}{2\pi\alpha'} g_{\sigma\sigma}$, $\Pi^i(\sigma, t) = \frac{\partial \mathcal{L}}{\partial(\partial_t X^i)} = \frac{l}{2\pi\alpha'} g_{\sigma\sigma}\partial_t X^i(\sigma, t) = \frac{p^+}{l}\partial_t X^i(\sigma, t)$ *(22), y (23)*

Por lo tanto el Hamiltoniano es:

$$H = p_-\partial_t x^-(t) + \int_0^l d\sigma \, \Pi^i \partial_t X^i(\sigma, t) - L = \frac{1}{4\pi\alpha'} \int_0^l d\sigma \, [g_{\sigma\sigma}\partial_t X^i(\sigma, t)\partial_t X^i(\sigma, t) + g_{\sigma\sigma}{}^{-1}\partial_\sigma X^i \partial_\sigma X^i] \qquad (24)$$

Usando *(23) y (24)* re-escribimos el hamiltoniano en términos de los momentos:

$$H = \frac{l}{4\pi\alpha' p^+} \int_0^l d\sigma \left[2\pi\alpha' \Pi_i \Pi_i + \frac{1}{2\pi\alpha'}\partial_\sigma X^i \partial_\sigma X^i\right] \qquad (25)$$

Las ecuaciones de movimiento para x^- y p^+ son:

$$\partial_t\left(x^-(t)\right) = \frac{\partial H}{\partial_t(-p^+)} = \frac{H}{p^+} \ , \ \partial_t\left(p^+(t)\right) = -\frac{\partial H}{\partial x^-} = 0 \qquad (26) \text{ y, } (27)$$

Las ecuaciones para X^i y Π^i se deben hacer sobre toda la cuerda, es decir:

$$\int_0^l d\sigma \partial_t X^i = \frac{\partial H}{\partial_t(\Pi_i)} = \frac{l}{4\pi\alpha' p^+} \frac{\partial}{\partial_t(\Pi_i)} \int_0^l d\sigma \left[2\pi\alpha' \Pi_i \Pi_i + \frac{1}{2\pi\alpha'}\partial_\sigma X^i \partial_\sigma X^i\right] = \frac{l}{2\pi\alpha' p^+} \int_0^l d\sigma \Pi_i =$$

$$c2\pi\alpha' \int_0^l d\sigma \Pi_i \ (28)$$

Para la otra ecuación se realiza una integración por partes en el segundo término dentro de la integral y aplicamos las condiciones de frontera de una cuerda cerrada:

$$\int_0^l d\sigma \, \partial_t \Pi_i = -\frac{\partial H}{\partial_t(X^i)} = -\frac{l}{4\pi\alpha' p^+} \frac{\partial}{\partial_t(X^i)} \int_0^l d\sigma \left[2\pi\alpha' \Pi_i \Pi_i + \frac{1}{2\pi\alpha'}\partial_\sigma X^i \partial_\sigma X^i\right] = -\frac{l}{4\pi\alpha' p^+} \frac{\partial}{\partial_t(X^i)} \Big[X^i \partial_\sigma X^i -$$

$$\int_0^l d\sigma X^i \partial^2{}_\sigma X^i\Big] = \frac{c}{2\pi\alpha'} \int_0^l d\sigma \partial^2{}_\sigma X^i$$

(29)

Tenemos para *(28)* y *(29)* la constante $c = \frac{l}{2\pi\alpha' p^+}$. Derivando la ecuación *(28)* respecto al tiempo e igualando con *(29)* obtenemos la ecuación de onda:

$$\partial^2{}_t X^i = c^2 \partial^2{}_\sigma X^i \qquad (30)$$

Es útil fijar $l = 2\pi\alpha' p^+$ y $c = 1$.

La solución general de la ecuación es una superposición de ondas a la derecha y a la izquierda que cumpla la condición de frontera que ya se han mencionado. Tenemos entonces que la solución de *(30)*:

$$X^i(\sigma,t) = X_L^i(\sigma+t) + X_R^i(\sigma-t) \qquad (31)$$

$$X_L^i(\sigma+t) = \frac{x^i}{2} + \frac{p^i}{2p^+}(t+\sigma) + i\sqrt{\frac{\alpha'}{2}}\sum_{n\epsilon Z-(0)}\frac{\alpha_n^i}{n}e^{\frac{-2\pi in(\sigma+t)}{l}} \qquad (32)$$

$$X_R^i(\sigma-t) = \frac{x^i}{2} + \frac{p^i}{2p^+}(t-\sigma) + i\sqrt{\frac{\alpha'}{2}}\sum_{n\epsilon Z-(0)}\frac{\tilde{\alpha}_n^i}{n}e^{\frac{2\pi in(\sigma-t)}{l}} \qquad (33)$$

Es fácil verificar que *(31)* (usando *(32)* y *(33)*) forman una solución de la ecuación (*30)*. Los coeficientes x^i y p^i denotan el centro de masa mientras que los dos conjuntos infinitos de coeficientes α_n^i y $\tilde{\alpha}_n^i$ denotan las amplitudes del momento n para los movimientos hacia la izquierda y hacia la derecha, respectivamente. Re-expresamos el Hamiltoniano usando la ecuación *(31)*. Se obtiene:

$$H = \frac{p^i p^i}{2p^+} + \frac{1}{2\alpha' p^+}\left[\sum_{n>0}(\alpha_{-n}^i\alpha_n^i + \tilde{\alpha}_{-n}^i\tilde{\alpha}_n^i) + E_0 + \tilde{E}_0\right] \qquad (34)$$

Conseguimos la mecánica cuántica del movimiento del centro de masa y de dos conjuntos infinitos de osciladores desacoplados. Tenemos los modos normales de creación y aniquilación, además de E_0 *y* $\tilde{E}_0$ que son los puntos cero de energía por cada estado.

El espacio de Hilbert de los estados se hace definiendo un vacío $[k\rangle = [k_-, k_i\rangle$ para así tener:

$$p^+|k\rangle = k_-|k\rangle,\ \ p^i|k\rangle = k_i|k\rangle,\ \ \alpha_n^i|k\rangle = \tilde{\alpha}_n^i|k\rangle = 0$$

Además actúan sobre tal vacío los operadores de creación $\tilde{\alpha}_{-n}^i$, y α_{-n}^i hacia la derecha y hacia la izquierda, respectivamente.

Desde el punto relativista cada oscilación es vista como una partícula con masa espacio tiempo. Entonces, de la relatividad especial y del vector momento:

$$M^2 = -p^2 = 2p^+p^- - p^ip^i \qquad (35)$$

Habiendo ya dicho que p^- es la energía de la hoja de mundo, es decir el hamiltoniano, sustituimos la ecuación *(34)* en *(35)* para obtener:

$$\alpha' M^2 = \sum_{n>0}(\alpha_{-n}^i\alpha_n^i + \tilde{\alpha}_{-n}^i\tilde{\alpha}_n^i) + E_0 + \tilde{E}_0 = N + \tilde{N} + E_0 + \tilde{E}_0 \qquad (36)$$

Donde se identifica que: $N = \sum_{n>0}(\alpha_{-n}^i\alpha_n^i)$ y $\tilde{N} = \sum_{n>0}\tilde{\alpha}_{-n}^i\tilde{\alpha}_n^i$.

Las masas de las partículas espacio tiempo se incrementan junto con el número de oscilaciones en el correspondiente estado (de la cuerda). Otro aspecto es que por conservación de la energía, el momento debe ser igual por la derecha como por la izquierda, lo que significa que $N = \tilde{N}$ y por tanto también $E_0 = \tilde{E}_0$.

Respecto a los valores de los puntos cero de energía $E_0 = \tilde{E}_0$ tenemos entonces que formalmente para cada i se tiene:

$$E_0^i = \frac{1}{2}\sum_{n=1}^{\infty} n \qquad (37)$$

Lo cual es infinito. Pero podemos reescribirlo tomando el límite de cuando $\epsilon \to 0$ de:

$$Z(\epsilon) = \frac{1}{2}\sum_{n=1}^{\infty} ne^{-n\epsilon} = \frac{-1}{2}\frac{d}{d\epsilon}\sum_{n=1}^{\infty} e^{-n\epsilon} \qquad (38)$$

Expandiendo la serie geométrica, para luego hacer la derivada, entonces aplicamos el límite y desechamos los infinitos para obtener los valores de los puntos cero de energía:

$$E_0^i = \tilde{E}_0^i = -\frac{1}{24} \qquad (39)$$

El desechar los infinitos es totalmente justificado porque el infinito no está presente en nuestra calibración con el cono de luz en la hoja de mundo.

Los grados de libertad son el centro de masa y las coordenadas transversas ($X^i,\ \ i = 2, \dots, D-1$), entonces tenemos $D-2$ grados de libertad, por tanto el espectro de masa de la cuerda es:

$$\alpha' M^2 = N + \tilde{N} - 2\frac{D-2}{24} \qquad (40)$$

Ahora obtengamos las partículas más ligeras del espectro de la cuerda. Obtengamos el estado base y dejemos actuar los dos operadores (osciladores, uno sobre el lado derecho y el otro sobre el izquierdo) sobre el vació que habíamos definido. Fijemos D=26 y discretizamos N:

$$N = \tilde{N} = 0 \qquad [k\rangle = [k_-, k_i\rangle \qquad \alpha' M^2 = -2$$
$$N = \tilde{N} = 1 \qquad \alpha_{-1}^I\tilde{\alpha}_{-1}^J[k\rangle = [k_-, k_i\rangle \qquad \alpha' M^2 = 0$$

Vemos que para el estado base tenemos una masa negativa, lo que significa que son taquiones. Para el siguiente estado excitado vemos que no hay masa. Desde que I, y J son arbitrarios, enlazados a dos distintos operadores, entonces el número de estados es $(D-2)^2$. Un estado general es una combinación lineal formada con todos operadores que actúan sobre un cierto estado excitado. Consideremos un estado general con este caso:

$$\sum_{I,J} R_{IJ}\,\alpha_{-1}^I\tilde{\alpha}_{-1}^J[k_-, k_i\rangle \qquad (41)$$

R_{IJ} son los elementos de una matriz $(D-2)^2$. A tal matriz, como se le puede hacer a toda matriz cuadrada, la dividimos en su parte simétrica S_{IJ} y en la antisimétrica A_{IJ}. Luego a la parte simétrica la podemos dividir en una matriz sin traza $\widehat{S_{IJ}}$ más la traza S'_{IJ}. Es decir:

$$R_{IJ} = \widehat{S_{IJ}} + A_{IJ} + S'_{IJ}. \qquad (42)$$

Entonces los estados de *(42)* se dividen en tres grupos:

$$\sum_{I,J}\widehat{S_{IJ}}\,\alpha_{-1}^I\tilde{\alpha}_{-1}^J[k_-, k_i\rangle,\quad \sum_{I,J} A_{IJ}\,\alpha_{-1}^I\tilde{\alpha}_{-1}^J[k_-, k_i\rangle,\quad \sum_{I,J} S'_{IJ}\,\alpha_{-1}^I\tilde{\alpha}_{-1}^J[k_-, k_i\rangle \qquad (43), (44)\ y\ (45)$$

Identificamos que los estados *(43)* son justamente los estados del gravitón, tal como los vimos en un principio. Las cuerdas cerradas tienen estados del gravitón. Gravedad aparece en teoría de cuerdas.

Los conjuntos en *(44)* corresponden a estados de una partícula del llamado campo Kalb-Ramond.

La parte que oscila *(45)* no tiene índices libres, es decir que representa a un solo estado. Este estado corresponde al de una partícula de un campo escalar sin masa conocida como el dilatón.

CONCLUSIONES

Se dió una introducción sencilla de la teoría de cuerdas. Se entendió parte de su esencia. En este modelo sencillo, teniendo 26 dimensiones, se verificó como uno de los estados de la cuerda es el gravitón- se cuantiza la gravedad.

BIBLIOGRAFÍA

Libros
ZWIEBACH, BARTON (2009). *A First Course in String Theory,* Published in the United States of America by Cambridge University Press, New York.
URANGA, ANGEL (2012) *Introduction to String Theory,* Universidad Autónoma de Madrid: Cambridge University Press.
McMAHON, DAVID (2009) *String Theory Demystified,* Copyright © 2009 by The McGraw-Hill Companies, Inc.

ELABORACIÒN DE UN NANOSOPORTE MAGNÈTICO PARA INMOVILIZACIÒN DE ENZIMAS

Carlos Alberto Nieto Arroyo[1] y Aldo Amaro Reyes[2]

RESUMEN

Se realizaron las pruebas a la enzima amilasa para evaluar su desempeño estando ésta inmovilizada en un soporte magnético. Se logró monitorear experimentalmente su actividad bajo diferentes condiciones de temperatura, ciclos de reutilización, niveles de agitación y tiempos continuos de reacción para establecer, en comparación con la enzima sin inmovilizar, lo efectiva que es la hidrólisis realizada.

ABSTRACT

Testing to the enzyme amylase were made to evaluate their performance being immobilized on a magnetic support. It was possible to evaluate experimentally their enzymatic activity under different temperature conditions, reuse cycles, continuous agitation levels and continuous reaction times in order to establish, in comparison with the enzyme without immobilizing, how effective is the hydrolysis carried out.

PALABRAS CLAVE: Inmovilización enzimática, actividad enzimática, hidrólisis.

INTRODUCCIÓN

La biotecnología se define como el empleo de organismos vivos o sus partes en la producción de bienes y servicios. Una de las herramientas empleadas por la biotecnología es la tecnología de enzimas, que consiste en el uso de aquéllas derivadas de organismos vivos para obtener algún producto o modificar algún proceso.

En los últimos años, la biotecnología ha experimentado grandes avances y, paralelamente sus aplicaciones industriales en la obtención de productos químicos, en la industria alimentaria y farmacéutica.

Los procesos catalizados por enzimas en la industria son cada día más numerosos, ya que presentan una serie de ventajas frente a los catalizadores convencionales no biológicos:

- Presentan una gran actividad catalítica;
- Muestran una gran especificidad de sustrato (incluso estereoselectividad y regioespecificidad);
- Son muy activos a temperatura ambiente y presión atmosférica.

A pesar de estas claras ventajas, el empleo de enzimas no se ha generalizado en los procesos químicos industriales debido a que la mayoría de las enzimas no son estables en las condiciones de trabajo.

[1] Instituto Tecnológico de Celaya, Departamento de Ingeniería Química, Antonio García Cubas Pte. #600 esq. Av. Tecnológico, Colonia FOVISSTE, C.P. 38010, Celaya, Guanajuato, carlos.a_nieto@hotmail.com
[2] Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Química, Cerro de las campanas s/n, Col. Las campanas C.P. 76010, Santiago de Querétaro, Querétaro, aldo.amaro@uaq.edu.mx

Por otra parte al ser solubles en agua, su separación de los sustratos y productos es difícil, y por tanto, no se pueden reutilizar. Con la inmovilización de las enzimas se han podido superar estos últimos inconvenientes, permitiendo que el proceso biotecnológico sea económicamente rentable.

En este proyecto se busca de manera específica lograr el diseño de un nanosoporte magnético para inmovilizar enzimas. La idea de que el soporte tenga un carácter magnético es para facilitar la recuperación de enzima soportada separándola con ayuda de un campo magnético.

MARCO TEÓRICO

La inmovilización de enzimas es un proceso en el que se confina o localiza a la enzima en una región definida del espacio, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y que pueden ser reutilizadas repetidamente.

Hablar detalladamente de los métodos de inmovilización sería un tratamiento muy extenso (para mayor información la segunda referencia bibliográfica desarrolla este tema), sin embargo no podemos dejar de señalar aún de manera muy general que existen numerosos métodos de inmovilización de enzimas y estos se encuentran esquematizados en la Figura 1.

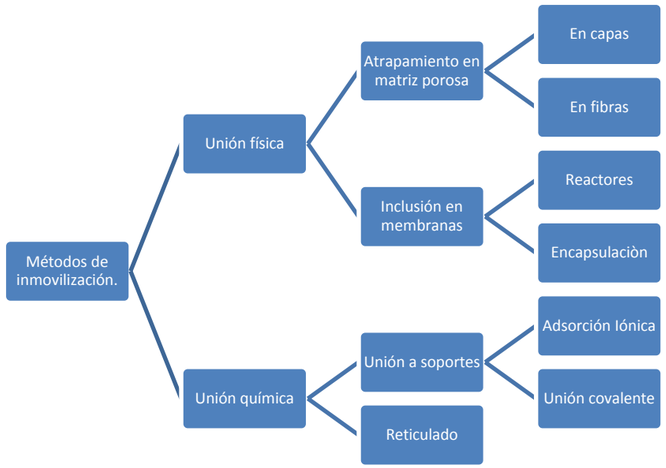


Figura 1. Esquema de los diferentes métodos de inmovilización de enzimas.

En el presente proyecto se trabajó la técnica de reticulado que consiste en uso de reactivos bifuncionales que originan uniones intermoleculares entre las moléculas de enzima. El resultado del reticulado son enzimas con enlaces intermoleculares irreversibles capaces de resistir condiciones extremas de pH y temperatura.

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

El soporte utilizado fue elaborado a base de una mezcla de cloruros de hierro II y III recubiertos de chitosan (un polisacárido con grupos amino) y genipin (un derivado de un glucósido) para lograr el entrecruzamiento de la enzima con el chitosan (la razón de no utilizar glutaraldehído como reticulante es su toxicidad).

MÉTODOS Y MATERIALES.

Se monitoreó el comportamiento de la enzima amilasa soportada en cloruros férrico y ferroso con chitosan y genipin. Para monitorearlo se realizó una hidrólisis de un sustrato específico y se cuantificaron los productos de la hidrólisis para reportar la actividad enzimática.

Materiales, reactivos y equipo:

- Baño seco termostatizado.
- Espectrofotómetro de microplatos.
- Cristalería común de laboratorio.
- Micropipetas de 100 y 1000 µL.
- Puntas de micropipetas.
- Tubos Eppendorf.
- Agitador Vórtex.
- Potenciómetro.
- NaOH 0.5 N
- Acido 3,5-dinitrosalicílico.
- Tartrato de sodio y potasio.
- Agua destilada.
- Solución de buffer pH 5
- Almidón grado reactivo.
- Cloruro de calcio.
- Glucosa grado reactivo.
- Pericarpio de maíz molido malla 20.

Primeramente se procedió a la preparación del reactivo DNS (250 mL) para cuantificar los azúcares reductores producto de la hidrólisis (para mayor detalle de su preparación véase referencia 3 de la bibliografía). Para la curva de calibración del reactivo se utilizaron soluciones estándar de glucosa con diferentes concentraciones de 2, 4, 6, 8, y 10 µg/L. Se leyó la absorbancia de la curva de calibración a una longitud de onda de 570 nm.

Monitoreo de actividad enzimática: Prueba de ciclos de reutilización.

Se tomaron 10 mg de enzima (amilasa) inmovilizada y se agregaron 200 µL de sustrato (en esta prueba nos referimos con sustrato a una solución de almidón al 1% y 40 mM de cloruro de calcio, el pH final de la solución fue de 5). Posteriormente la enzima y el sustrato se sometieron a un baño seco de 70ºC por 10 min.

Transcurrido el tiempo con ayuda de un imán se decantó la solución, dejando la enzima dentro del tubo. A la enzima que se decantó se le agregaron otros 200 µL de sustrato para continuar con otro ciclo de utilización. Este procedimiento fue realizado 15 veces. Es decir, 15 ciclos de uso de la misma enzima soportada. Del sobrenadante de cada ciclo tomó una alícuota de 100 µL y se agregaron 100 µL de reactivo DNS, se sometió a baño seco a 100ºC por 10 min., después se enfrió con hielo para interrumpir la reacción y se leyó la absorbancia de esta muestra a 570 nm para cuantificar la glucosa producto de la hidrólisis. Este mismo procedimiento fue repetido a 80ºC. Todas las pruebas se realizaron por triplicado.

Montaje de un reactor con agitación magnética para hidrólisis.

Se montó un sistema donde se mantuviera controlada la temperatura y la agitación fuese constante. La agitación se realizó con un imán que rodea el tubo Eppendorf que sirve como reactor batch (por lotes). El imán se montó en un oscilador de laboratorio y todo esto se introdujo en un horno de secado para ajustar la temperatura a 70ºC.

En el reactor se colocaron 10 mg de amilasa inmovilizada y se colocó 1 mL de sustrato (ene sta prueba nos referimos como sustrato a una solución de pericarpio de maíz con 40 mM de cloruro de

calcio y pH final de la solución de 5). Se controló la temperatura para mantenerla a 60ºC y se colocó la agitación en 30 oscilaciones por minuto (OPM). Se tomó una alícuota de 100 µL cada 10 min hasta completar 1 hora de reacción. A las muestras se les agregó 100 µL de DNS y se sometieron a baño seco de 100ºC durante 10 min., posteriormente se enfriaron con hielo para interrumpir la reacción y se leyó la absorbancia a 570 nm para cuantificar la actividad de la enzima.
Este procedimiento se repitió también a 50 y 70 OPM.
Toda esta prueba se realizó por duplicado.

RESULTADOS

En las Figuras 3, 4 y 5 podemos observar los resultados de la prueba de ciclos de reutilización.
Con la absorbancia obtenemos la concentración de glucosa, posteriormente calculamos la unidades de actividad enzimática U con la ecuación 1)

$$U = \frac{concentracion\ de\ azucares}{tiempo\ de\ reacción} \quad (1)$$

Dividimos la U entre el volumen de reacción para lograr una U/mL. Con esta U por unidad de volumen podemos calcular la actividad relativa con la ecuación 2)

$$Actividad\ relativa = \frac{Actividad\ enzimática}{Actividad\ enzimática\ mayor} \times 100\% \quad (2)$$

Esta medida de actividad relativa nos permite hacer las comparaciones a las diferentes temperaturas.

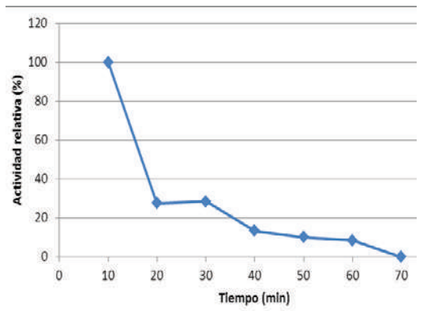


Figura 3. Ciclos de reutilización a 70ºC

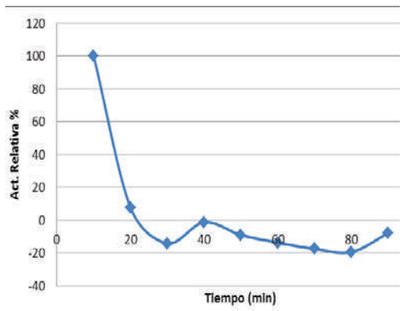


Figura 4. Ciclos de reutilización a 80ºC

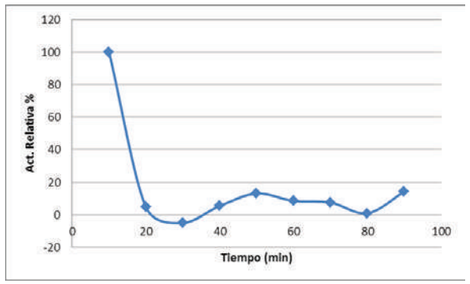


Figura 5. Ciclos de reutilización a 90ºC

Podemos observar que la mayor actividad relativa se registra a 70ºC puesto que en las otras dos temperaturas decae la actividad de la enzima, fenómeno que puede deberse a que la temperatura inhibe la actividad enzimática mientras más se aleja de su punto óptimo.. No se reportan todos los ciclos llevado a a cabo sencillamente porque después de lo que podemos ver en las figuras la actividad relativa se volvía cero. Los valores negativos se deben a las lecturas de absorbancia negativas de el aparato pero para fines prácticos ya se consideran cero.

En las Figuras 6, 7 y 8 podemos ver los resultados de la reacción batch con agitación magnética.

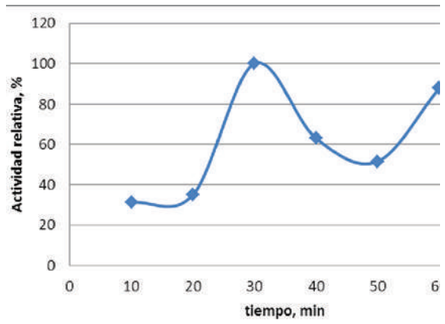


Figura 6. Actividad enzimática de reacción batch a 60ºC y 30 OPM

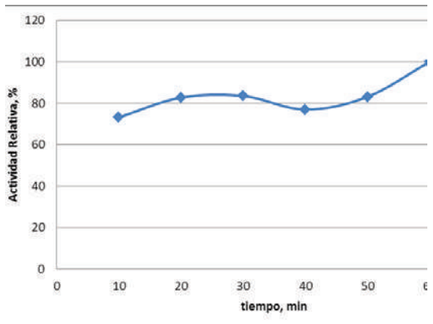


Figura 6. Actividad enzimática de reacción batch a 60ºC y 30 OPM

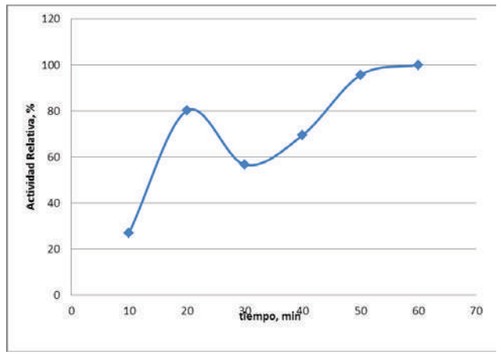


Figura 6. Actividad enzimática de reacción batch a 60ºC y 30 OPM.

Lo más lógico sería esperar en estos casos que la actividad enzimática aumentara debido a que la cantidad de sustrato disminuye al tomar la muestra y al mantener la cantidad de enzima constante de aumenta el nivel de hidrólisis. Podemos ver este comportamiento como tendencia en los tres casos, solamente que algunos puntos se desvían de la tendencia de los demás datos en las gráficas. Lo siguiente sería probar una reacción donde el volumen se mantuviera constante o una reacción en continuo de flujo constante para evaluar la actividad de la amilasa.

CONCLUSIONES.

Pudimos observar el comportamiento de la enzima inmovilizada en diferentes condiciones. El trabajo experimental desarrollado durante esta estancia servirá para comparar la actividad enzimática de amilasa inmovilizada y de amilasa sin inmovilizar, lo cual nos ayudará a evaluar la viabilidad de

inmovilizar la enzima. Por supuesto que esta comparación implica también análisis de costos, de eficiencia y rendimiento de una reacción frente a otra, pero de ser una alternativa viable supondría una innovación en los procesos biotecnológicos. Pudimos observar que el carácter magnético del soporte de inmovilización tiene la gran ventaja de ser de gran utilidad para separar la enzima de su medio de reacción, lo cual es una ventaja frente a otros soportes que necesitan algún tipo de separación más compleja.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Ospina, S A; (2011). ¿Todo tiempo pasado fue mejor? Cómo ha incidido la tecnología enzimática en el bienestar de la humanidad. *Revista Colombiana de Biotecnología, vol.* XII, núm. 1, pp. 5-7. Recuperado de http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=77621348001 (fecha de consulta 14-08-2016)
2. Arroyo, M; (1998). Inmovilización enzimática. Fundamentos, métodos y aplicaciones. Ars Pharmaceutica, núm. 39, pp. 23-39. Recuperado de http://farmacia.ugr.es/ars/pdf/125.pdf (fecha de consulta 14-08-2016)
3. Díaz Maqueira, Y; Bello Gil, D; Carrera Bocourt, E; (2006). Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, XL() 45-50. Recuperado de http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223120664006 (fecha de consulta 17-08-2016)

PROPAGACIÓN *IN VITRO* Y REGENERACIÓN DE *MORINGA OLEÍFERA*

Daniela Ontiveros Floriano[1] y José Francisco Morales Domínguez[2]

RESUMEN

Se propagaron explantes a partir de semillas con un 96% de germinación de la especie *Moringa oleífera*. Mediante este procedimiento se obtuvieron explantes enraizados para las pruebas de aclimatación. De plantas ya aclimatadas se tomó tejido para la extracción de ADN, con lo cual se comprobó que el procedimiento fue el óptimo para la utilización en esta especie, dando como resultado una cuantificación del 1.64% y 1.89% de pureza. Se realizaron pruebas de trasformación genética, probando distintas condiciones para su optimización. Así como también se probaron diferentes procedimientos para la proliferación de raíz a partir de hoja, de los cuales aún se está a la espera de los resultados.

ABSTRACT

Explants were propagated from seeds with 96% germination from the species *Moringa oleífera*. By this procedure, rooted explants were obtained for testing acclimatization. It was taken tissue from already acclimatized plants for DNA extraction, which proved that it was the optimum procedure to use for this species, resulting in 1.64% and 1.89% of purity. Genetic transformation tests were performed, testing different conditions for optimization. Different procedures for root proliferation were also tested from leaf, yet the results are expected.

Palabras Clave: *Moringa oleífera*, propagación, aclimatación, transformación.

INTRODUCCIÓN

Moringa oleífera es una especie proveniente de la familia de las *Moringáceas*. Puede presentarse en forma de arbusto o árbol, y es considerado de crecimiento rápido ya que durante su primer año puede llegar a crecer entre 3 y 5 metros de altura (Cannett, *et al*., 2014). Es originaria de zonas tropicales de India y África pero gracias a su facilidad de adaptación y reproducción, aun encontrándose en condiciones de sequía, ya se encuentra alrededor del mundo (Adedapo, *et al*., 2009). Su follaje es pináceo y con copas abiertas, y es conocido por brindar una gran cantidad de productos valiosos que se han aprovechado durante un largo tiempo. Las flores que proporciona son de color crema y aparecen principalmente en las épocas de sequía, da vainas como fruto, el cual es muy parecido a las legumbres, de unos 30 a 45 cm de longitud. Las semillas, vainas y flores son muy nutritivas y se consumen ya en muchas partes del mundo como parte de la dieta diaria. Inclusive las semillas se han utilizado para el tratamiento de aguas, al igual que el aceite extraído suele utilizarse en la producción de jabones, cosméticos y combustible para lámparas, así como también diferentes partes del árbol se utilizan como medicinas naturales (Folkard & Sutherland, 1996).

Debido a la demanda generada en la población por ésta planta, es importante buscar alternativas para ayudar a su proliferación y así para evitar su extinción. La tecnología de cultivo de tejido vegetal proporciona una alternativa valiosa para su recuperación. Actualmente se ha convertido en una herramienta importante en la selección, cruzamiento, control de enfermedades y producción de masa de cultivos de cosecha. El proceso inicia trasladando material vegetal *in vivo* en un medio de cultivo estéril,

[1] Universidad Autónoma de Coahuila, Facultad de Ciencias Biológicas ; Campus-Torreón, Blvd. Torreón-Matamoros, km 7.5, C.P:27104, Torreón, Coahuila, danielaontiveros4@gmail.com
[2] Universidad Autónoma de Aguascalientes, Departamento de química; Avenida Universidad #940, Fraccionamiento C.U, C.P: 20131, Aguascalientes, Aguascalientes, jfmoral@correo.uaa.mx

el cual requiere la disección de la planta bajo condiciones estrictamente estériles con el propósito de trasferir su punto de crecimiento o tejido dentro de un recipiente estéril sin introducir microorganismos contaminantes, al que además se le deben darse requerimientos externos como el de la luz, que debe ser suministrada a intensidades muy bajas (mucho más que el de la luz solar), y la temperatura, la cual debe ser controlada para estabilizar el crecimiento y mejora del desarrollo de los tejidos (Morgan, 2000). Para obtener un proceso completo se continúa con la aclimatación de las plántulas enraizadas, la cual es una etapa elemental en un sistema de micropropagación ya que de ella depende la eficiencia y calidad del proceso (Díaz *et al*., 2004). En esta fase las plantas sufren diferentes cambios que permitirán su adaptación para vivir en condiciones naturales (Castillo, 2004).

Es importante mencionar los diferentes usos que se le pueden dar a la planta, una de los cuales es la transformación genética, con la cual se puede lograr el mejoramiento para una función específica de interés. Neuhaus & Spangenberg (1990) explican que la transformación genética en plantas presenta varios métodos que permiten la introducción e integración de ADN foráneo en el genoma y así poder seleccionar eficientemente las células transformadas permitiendo la regeneración completa de las células transformadas, este ADN puede ser introducido a la planta de interés de diferentes maneras. El método más usado hace uso de un sistema de transferencia de ADN que ocurre naturalmente, basado en una bacteria del suelo llamada *Agrobacterium* que transfiere a través de su factor plasmídico inductor de tumores (Ti) una porción específica de su ADN a las células de la planta modificando su genoma (Sharry *et al*., 2015). *Agrobacterium* es uno de los pocos organismos capaces de transformar genéticamente una célula vegetal, utilizando un sistema para la transferencia e integración de genes. Por medio de una herida o daño producido en la zona del cuello de una planta susceptible esta bacteria es atraída por quimiotaxis en respuesta a sustancias liberadas el medio ambiente por las células de la planta dañada (Marconi & López, 2001).

El imprescindible el continuo estudio de *M. oleífera* debido a que no se tienen conocimientos suficientes en cuanto a los componentes exactos que contiene, lo que ayudaría a su utilización para combatir la hambruna en algunos lugares del mundo de una manera correcta, ya que es utilizado con gran aceptación. El hecho de tener reportada su evolución en condiciones de laboratorio ayudará a profundizar más en su estudio, por lo que en este proyecto se incluyen procedimientos de propagación, aclimatación, trasformación y proliferación de raíz a partir de hoja, así como también se incluye un procedimiento de extracción de ADN óptimo para la planta.

MÉTODOS Y MATERIALES

PROPAGACIÓN

En el laboratorio ya se contaba con semillas germinadas, las cuales ya contaban con el primer brote, por lo cual se podaron y con los explantes obtenidos se continuó este proceso hasta obtener un número considerable de los mismos para su utilización en las diferentes áreas del proyecto. En propagación se utilizaron dos procedimientos diferentes, el primero en medio MS sólido, y el segundo en medio líquido, en el cual, al momento de propagar los explantes, primero se llevó a cabo con un lavado, en el cual se pasaron por una solución de cloro en agua destilada estéril (1:100) durante 5 a 10 segundos aproximadamente, en seguida se pasaron por una solución de 3 gotas de BacDyn aprox. en 100 mL de agua destilada estéril. Se podaron los explantes, eliminando las hojas si era necesario. Si el explante era muy largo, se procedió a cortarlo en piezas de 1 cm aprox., para realizar los cortes se utilizó una caja Petri estéril y en seguida se sembraron en medio MS nuevo. Se continuó con este procedimiento durante toda la estancia.

ACLIMATACIÓN

Para la aclimatación de las plantas enraizadas se utilizó tierra negra (Nutrigarden), la cual se colocó en vasos plásticos con pequeños agujeros en la parte inferior, después se les colocó una bolsa de plástico para que el cambio no fuera tan drástico. Pasados 3 días se les realizó pequeños orificios a las bolsas

plásticas, siguiendo con este proceso hasta retirar por completo la bolsa. Posteriormente se cambiaron a bolsas adecuadas para su plantación. Se regaron continuamente.

TRANSFORMACIÓN

Infección: Se cortaron de 10 a 15 tallos y hojas ($^{c}/_{u}$) aproximadamente, los cuales se colocaron en medio MS sólido durante 24 horas para aclimatación. Posteriormente en una dilución con dos cepas de *A. rhizogenes* (K599 y ARqva1) en medio MS líquido (1:10) por separado, se pusieron los tallos y hojas, y se ubicaron en agitación durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo se retiraron y se colocaron en papel filtro estéril, después se pasaron a cajas Petri con medio MS sólido y se incubaron a 28°C durante 48 horas en oscuridad.

Desinfección: se retiraron los tallos y hojas del cultivo y se transfirieron a medio líquido adicionado con 500 mg/L de Cefatoxima y se incubaron durante 30 minutos en oscuridad y agitación. Posteriormente se colocan en papel filtro estéril para retirar el exceso de líquido, luego se distribuyen en cajas Petri con el medio de selección adicionado con 25 mg/L de kanamicina. Se incuban a 25°C en oscuridad durante 20 días, luego se cambian a fotoperiodo.

EXTRACCIÓN DE ADN

De una planta ya crecida y aclimatada, se tomó tejido y se pulverizó con ayuda de nitrógeno líquido, después se colocaron de 20 a 100 mg de tejido ya pulverizado en microtubos, inmediatamente, sin dejar descongelar se les añadió 800 µl de buffer de lisis y 2.4 µl de β-mercaptoetanol. Se mezclaron por inversión y se incubaron a 65°C durante 15 minutos. Se mezclaron esporádicamente. En seguida se colocaron los tubos en hielo durante 5 minutos y se les añadió 500 µl de fenol-cloroformo y se mezclaron hasta emulsificar. Se centrifugaron a 12,000 rpm por 5 minutos, posteriormente se recuperó la fase acuosa en microtubos limpios, luego se les añadió 1µl de RNAsa, se mezclaron por inversión y se incubaron a 37°C durante 20 minutos. Después se les agregó 0.5 mL de fenol-cloroformo, se emulsificaron y se centrifugaron 12,000 por 5 minutos, se recuperó la fase acuosa en tubos limpios, se les adicionó 0.5 mL de cloroformo alcohol isoamílico, se repitió el proceso de emulsificación y centrifugación. Se recuperó la fase acuosa y se agregó un volumen igual de isopropanol, se mezclaron por inversión durante 1 minuto y se incubaron a -20°C durante 10 minutos. Se centrifugaron a 12,000 rpm por 5 minutos y luego se deshecho el sobrenadante, posteriormente, a las pastillas se les agregó 0.2 mL de etanol al 70%, se mezclaron y se centrifugaron (12,000rpm/5min). Se eliminó el sobrenadante y las pastillas se secaron. Se resuspendieron en agua destilada estéril, de 30 a 100µl dependiendo del tamaño de la pastilla.

PROLIFERACIÓN DE RAÍZ

En medio 200 ml de medio MS sólido se adicionaron reguladores de crecimiento BA (200 µl) y AIA (40 µl), el cual se vació en cajas Petri, luego se colocaron alrededor de 10 y 15 hojas seleccionadas con anterioridad en cada caja, las cuales fueron las más sanas y grandes, se dejaron en oscuridad. Se repitió el mismo procedimiento pero en medio MS líquido, se prepararon dos matraces, dejándose uno en agitación y oscuridad, el restante se colocó en fotoperiodo, revisándose constantemente para evitar contaminación.

RESULTADOS

El procedimiento de propagación fue óptimo, dejando alrededor de 100 frascos con 5 explantes $^{c}/_{u}$ para la continuación del proceso, con un porcentaje de germinación del 96% en las semillas.

La aclimatación de los explantes no fue la esperada, ya que solo el 41.2% de las plantas sobrevivieron. Esto pudo deberse al tipo de tierra que se adquirió, la cual no contaba con las condiciones necesarias.

Para la transformación genética no se contó con las condiciones y el procedimiento adecuado, lo que dejó una contaminación excesiva en las hojas y tallos, por lo que se probó un procedimiento diferente cambiando algunas condiciones, del cual, aun se esperan los resultados.

Se probó un procedimiento para la extracción de ADN, el cual fue óptimo para la planta de *Moringa*, dejando un porcentaje de pureza el 1.89 y la cuantificación fue del 1.64%.

Las condiciones y proporciones en cuanto a la proliferación de raíz no fueron las óptimas, por lo que se modificaron. Se encuentra a la espera de resultados.

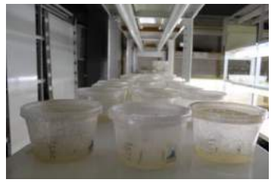


Figura 1. Proceso de propagación de Moringa

Figura 2. Aclimatación de explantes enraizados

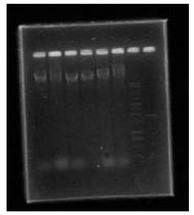


Figura 3. Electroforesis de extracción de ADN

CONCLUSIONES

Aunque se cuenta con procedimientos verificados en *Moringa* se tiene que continuar con las pruebas de los mismos, cambiando condiciones y/o proporciones, para optimizar los resultados lo más posible.

BIBLIOGRAFIA

ADEDAPO, A.A., MOGBOJURI, O.M. & EMIKPE, B.O. (2009). “Safety evaluetions of the aqueous extract of the leaves of *Moringa oleifera* in rats” en Journal of Medicinal Plants Research, Núm. 3, Vol. VIII [pp. 586-591].

CANETT, R.R., ARVAYO, M.K.L. & RUBALCAVA, G.N.V. (2014). “Aspectos Tóxicos más Relevantes de Moringa Oleífera” en Ciencias Biológicas y de la Salud, Núm. 16, Vol.II [pp. 36-43].

CASTILLO, A. (2004). *Propagación de plantas por cultivo in vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo*, Rincón del Colorado: INIA

DÍAZ, L.P., MEDINA, L.F., LATIFE, J., DIGONZELLI, P.A. & SOSA, S.B. (2004). “Aclimatación de plantas micropropagación de caña de azúcar utilizando el humus de lombriz” en RIA. Núm. 33. Vol. II [115-128]

FOLKARD, G. & SUTHERLAND, J. (1996). “Moringa oleífera, un árbol con enormes potencialidades” en Agroforestry Today, Núm. 8, Vol. III [pp. 5-8]

MARCONI, P.L. & LÓPEZ, J. (2001). “Organismos genéticamente modificados… desterrando mitos” en Ciencia Hoy, Núm. 11, Vol. LXII [pp. 1-9]

MORGAN, W.M. (2000). *Vegetal tissue culture*, Baltonsborough: International Plant Laboratories

NEUHAUS, G. & SPANGENBERG, G. (1990). “Plant transformation by microinjection techniques” en Physiologia Plantarum, Núm. 79 [pp. 213-217]

SHARRY, S., ADEMA, M. & ABEDINI W. (2015). *Plantas de Probeta. Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro*, Buenos Aires: REUN Editorial

STEINITZ, B., TABIB, Y., GABA, V., GEFEN, T. & VAKNIN Y. (2009). “Vegetative micro-cloning to sustain biodiversity of threatened Moringa species” en Society for In Vitro Biology, Núm 45 [pp. 65-71]

ADSORCION DE CROMO HEXAVALENTE POR MEDIO DE ADSORBENTES NO COMERCIALES

Israel Ortiz Anaya[1] y Ma Elena Calixto-Olalde[2]

RESUMEN

El cromo es un metal pesado que debido a su aplicación a nivel industrial en diversas áreas como; pinturas, soldaduras, y en una gran parte de la industria metal-mecánica, ha provocado un incremento en los mantos acuíferos con el tiempo, por lo cual se buscan diferentes formas de llevar a cabo su remoción del agua, por esta razón en este proyecto se realizó la preparación de materiales adsorbentes en forma de perlas de 3-5 mm mediante redes poliméricas interpenetradas QT/PVA, QT/NIPA y los nanocompósitos QT/NIPA/MMT-Na+ y QT/PVA/NTC.

Estos materiales adsorbentes fueron secados por liofilización.La adsorción de Cr (VI) se realizó utilizando una solución de Dicromato de potasio de 500 ppm. Se utilizaron en la adsorción 0.025 g de perlas en un volumen de 12.5 mL, a un pH 3 durante una hora.La cuantificación de cromo se realizó utilizando la Norma NMX-AA-044-SCFI-2014.

Los resultados obtenidos indican que los materiales adsorbentes de QT y QT/PVA fueron los que presentaron mayor porcentaje de adsorción 29 y 34% respectivamente. En lo que respecta a los nanocompósitos la combinación QT/PVA/NTC presentó el menor porcentaje de adsorción que fue de tan solo el 6.25%, esto ya que la incorporación de arcilla disminuye ligeramente la capacidad de adsorción del nanocompósito QT/NIPA/MMT-Na+ pero otorga mayor estabilidad y por ende aumenta la vida útil del adsorbente.

ABSTRACT

Chromium is a heavy metal in which its application at industrial level, such as paints, welds, and a great part of metal mechanic industry, has increased its presence within groundwater over time. It is for this reason that different ways of carrying out its removal of water are sought and for this project was performed the preparation of 3-5 mm bead shaped adsorbent materials through QT/PVA, QT/NIPA interpenetrated polymer networks and QT/NIPA/MMT-Na+ y QT/PVA/NTC nanocomposites.

These adsorbents were dried by lyophilization. Cr (VI) adsorption was carried out using a 500 ppm potassium dichromate solution. The adsorption took place using 0.025 g of beads in a volume of 12.5 mL with a pH 3 during one hour. Chromium quantification was performed according to the NMX-AA-044-SCFI-2014 Standard.

The obtained results show that the QT and QT / PVA adsorbents were those with the highest percentage of adsorption, 29% and 34% respectively. Regarding the nanocomposites, the QT / PVA / NTC combination had the lowest adsorption percentage with only 6.25% due to the fact that the addition of clay slightly reduces the adsorption capacity of the nanocomposite QT/NIPA/MMT-Na+ but provides greater stability and therefore increases the life of the adsorbent.

Palabras Clave: Adsorción, Cromo VI, Quitosano, N-Isopropilacrilamida, Montmorillonita

[1]Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Facultad de Ciencias Químicas; Av. Dr. Manuel Nava No.6 - Zona Universitaria, C.P: 78210, San Luis Potosí, S.L.P., Israel-OA@hotmail.com
[2]Instituto Tecnológico Superior de Irapuato, Departamento de Materiales; Carretera Irapuato - Silao km 12.5, Col. El Copal, C.P: 36821, Irapuato, Guanajuato, macalixto@itesi.edu.mx

INTRODUCCIÓN

Una de las formas más común para la obtención de agua, ya sea para uso doméstico, industrial, agrícola, etc; siempre ha sido por medio de la perforación de pozos, los cuales permiten acceder a ésta, que se ha filtrado hacia el subsuelo y que es relativamente limpia. Lamentablemente debido al uso constante de algunos metales en la industria, como lo es el cromo, que es usado en pinturas, soldaduras, y en una gran parte de la industria metal-mecánica, los mantos acuíferos se han ido contaminando de éstos con el tiempo.

La contaminación por cromo hexavalente que se ha dado en algunos de los mantos acuíferos, se debe principalmente a una característica de este metal, que es su alta solubilidad en el agua. La alta solubilidad del cromo en agua propicia que éste se filtre muy fácilmente usando al agua como conducto hacia los mantos freáticos. Esto es un grave problema ya que una gran cantidad del agua de uso común en todos los sectores proviene del subsuelo.

El cromo hexavalente en particular es un grave problema para la salud pública ya que la interacción con este metal puede ocasionar desde lesiones cutáneas hasta cáncer, y en casos extremos la muerte.

Ya que el cromo se ha convertido en un problema, se ha buscado la manera de removerlo del agua para consumo hasta el límite admitido por la secretaria de salud pública (.05ppm), sin embargo, cuando éste se encuentra en bajas concentraciones es difícil hacerlo, por lo que se ha optado por adsorción como método de remoción. La ventaja de la adsorción para remover metales pesados del agua es que ésta puede remover de bajas hasta muy altas concentraciones del metal.

MARCO TEORICO

La adsorción es un proceso por el cual átomos, iones o moléculas son atrapados o retenidos en la superficie de un material. Cuando el lecho del material adsorbente está casi saturado, el flujo se detiene y el lecho se regenera térmicamente o por otros métodos, de modo que ocurre una desorción. Así se recupera el material adsorbido (adsorbato) y el adsorbente sólido queda listo para otro ciclo de adsorción.

Los adsorbentes suelen tener forma de pelotitas, pequeñas cuentas o gránulos cuyo tamaño va de cerca de 0.1 mm a 12 mm, y las partículas más grandes se usan en los lechos empacados. Una partícula de adsorbente tiene una estructura muy porosa, con numerosos poros muy finos, cuyo volumen alcanza hasta el 50% del volumen total de la partícula. La adsorción suele ocurrir como una mono-capa sobre la superficie de los poros, pero a veces se forman varias capas.

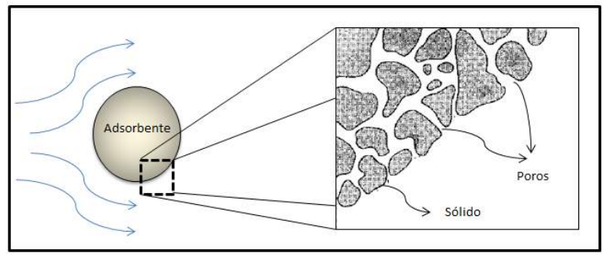


Figura 1. Estructura ampliada de una perla adsorbente.

MÉTODOS Y MATERIALES

Preparación del adsorbente:

La preparación del adsorbente fue realiza por medio de redes poliméricas interpenetradas secuenciales y su obtención en forma de perlas por coacervación en NaOH 1.5M. Para la preparación de los materiales adsorbentes en forma de perlas se utilizó un volumen final de solución de 15 mL, el quitosano (QT) al 98% se disolvió en una solución de ácido acético al 2%.
El orden de adición de los reactivos fue el siguiente; en el volumen especificado anteriormente se adicionó N-isopropilacrilamida (NIPA) al 0.35M y N-N-Metilen-bis-acrilamida (1%) como agentes de entrecruzamiento, la solución resultante se mantuvo en agitación hasta la completa disolución de los componentes, para posteriormente adicionar en pequeñas fracciones el quitosano, continuando con la agitación durante 30 minutos. Después de éste tiempo se adicionaron 3.1 mg de persulfato de amonio como iniciador y 18 microlitros de N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina como acelerador de la reacción. Después de medio minuto de agitación vigorosa, la suspensión se goteo sobre una solución de NaOH 1.5M la cual permitió formación de las perlas y en ella se mantienen durante 24 h. Finalmente las perlas se retiran de la solución de NaOH y se lavan hasta pH neutro. Las perlas húmedas son entrecruzadas con glutaraldehído al 0.5% durante 1 h. El secado de las perlas se realizó mediante liofilización.
En el caso de los nancompósitos con nanotubos de carbono (NTC), estos fueron incorporados en la solución ácida manteniéndose en agitación mecánica para favorecer su dispersión y la secuencia de preparación a partir de esto es igual a la antes mencionada. Para las perlas con PVA, éste polímero se disuelve en agua a 80°C durante una hora y ya frío se incorporara en lugar de la NIPA posterior a esto la secuencia es la misma mencionada.

Proceso de adsorción:

La adsorción de Cr (VI) se realizó utilizando una solución de Dicromato de potasio. La concentración utilizada fue de 500 ppm. Se utilizó 0.025 g de perlas en un volumen de 12.5 mL, a un pH 3 durante 75 minutos y una agitación de 200 rpm.

Cuantificación de Cromo:

Para realizar la determinación de la cantidad de cromo hexavalente que las perlas adsorbentes fueron capaces de retener, se realizó bajo la norma NOM NMX-AA-044-SCFI-2014 en un espectrofotómetro UV-Vis Cary®50 con luz de Xenon, obteniéndose como resultado una curva de calibración de cromo VI con coeficiente de correlación lineal de 0.999421253 como se muestra en la figura 2.

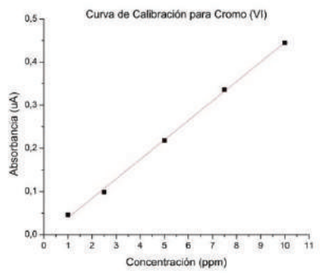


Figura 2. Curva de calibración para cromo hexavalente.

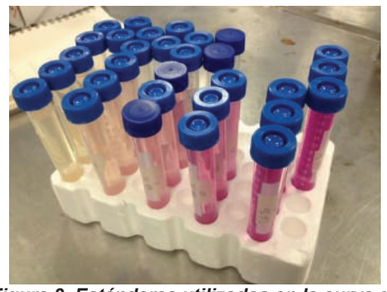


Figura 3. Estándares utilizados en la curva de calibración.

RESULTADOS

Se obtuvieron cinco diferentes materiales adsorbentes basados en quitosano e incorporando PVA o NIPA para formar la red polimérica interpenetrada y como agentes reforzantes nanotubos de carbono y montmorillonita. Se pudo observar que la presencia del PVA disminuyó la fragilidad de las perlas obtenidas, mientras con lo que respecta a los nanocompósitos la fragilidad de las perlas fue mayor en las que se utilizaron los NTC como reforzante observándose también un incrementó en su estabilidad dimensional con la incorporación de la montmorillonita.

En lo que respecta a la adsorción, las perlas sufren un cambio de coloración, como puede observarse en las figuras 4 y 5.

Figura 4. Perlas adsorbentes antes de someterlas al proceso de adsorción.

Figura 5. Perlas adsorbentes después de someterlas al proceso de adsorción.

En la figura 6 se muestran los resultados obtenidos únicamente para la adsorción a una hora bajo las condiciones establecidas, encontrándose que las redes interpentradas de QT/PVA y de QT son las que más adsorben en mayor porcentaje. Se considera que el PVA favorece la difusión del adsorbato hacia el adsorbente.

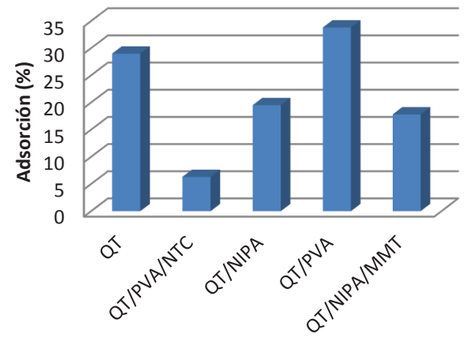


Figura 6. Porcentaje de adsorción con respecto a cada adsorbente.

CONCLUSIONES

Todos los adsorbentes fabricados han probado tener la capacidad de retener al cromo VI dentro de su estructura porosa, sin embargo entre más entrecruzado está el material mayor es la disminución de la capacidad de adsorción de éste. A pesar de disminuir la capacidad de adsorción al entrecruzar el material, también se observó una mayor estabilidad de éste, es el caso de QT/NIPA/MMT. Una excepción a lo antes dicho es el caso de QT/PVA, que a pesar de estar entrecruzado aumentó su capacidad de adsorción al igual que su estabilidad. También es importante considerar que el incremento de la fragilidad con la incorporación de los NTC puede atribuirse a una no homogénea dispersión en la matriz, por ello es que se incrementa la fragilidad, es importante que en la optimización de la composición se considere la incorporación de algún agente surfactante o bien modificar la composición de PVA o incorporarlo en los nanocomoósitos.

Se sabe de diversos estudios que se han realizado en otras investigaciones, que la capacidad de adsorción de un material depende de varios factores tales como; composición química del material adsorbente, relación gramos de adsorbente/volumen de disolución (mL), concentración de la solución a adsorber, pH principalmente yes importante considerarlo al comparar con otros trabajos, ciertamente los resultados obtenidos en este trabajo darán la pauta para buscar condiciones que favorezcan el incremento en la capacidad de adsorción de cromo del material adsorbente así como su reutilización, lo cual resulta fundamental para que se vuelva un proceso sustentable. Es importante resaltar

el efecto que tiene el uso de la interpenetración para la modificación de propiedades, en esta trabajo se pudo observar que el PVA disminuye la fragilidad con respecto al QT puro y que la incorporación de agentes de reforzamiento pueden no ser favorable en cuanto al incremento en la fragilidad, como fue el caso de los NTC.

BIBLIOGRAFIA

ABDEL-MOHSEN, A., ALY, A., HARDINA, R., MONTASER, A. y HEBEISH,A (2011). *Eco-Synthesis of PVA/Chitosan hydrogels for biomedical application*. Journal of Polymers and Environment.

ALICIA PARDO BONANOMI, M. M. (2014). *Adsorción de cromo por quitosano elaborado a partir de desechos de una industria cangrejera.* Revista Investigaciones científicas unermb (ne).

ROMERO, A. G. (2015). *Obtención de un hidrogel de quitosano mediante la irradiación con un haz de electrones acelerados para determinar su aplicación en la adsorción de cromo*. Ecuador.

GEANKOPLIS C.J. (1998). *Procesos de Transporte y Operaciones Unitarias,* México: Compañía Editorial Continental

Esteban Marina A.U. (2015). "ANÁLISIS DE AGUA.- MEDICIÓN DE CROMO HEXAVALENTE EN AGUAS NATURALES, SALINAS, RESIDUALES Y RESIDUALE TRATADAS- MÉTODO DE PRUEBA. Consultada en http://www.conagua.gob.mx/CONAGUA07/Noticias/NMX-AA-044-SCFI-2014.pdf

Olaiz Fernández G. (2000). "NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-127-SSA1-1994, "SALUD AMBIENTAL, AGUA PARA USO Y CONSUMO HUMANO-LIMITES PERMISIBLES DE CALIDAD Y TRATAMIENTOS A QUE DEBE SOMETERSE EL AGUA PARA SU POTABILIZACION. Consultada en http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/127ssa14.html

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE PELÍCULAS DELGADAS DE CeO2 Y DE CeO2-Gd POR EL MÉTODO SPIN COATING

Ortiz Estrada Juan José[1] y Rodríguez Vázquez Ángel Gabriel[2]

RESUMEN

Se prepararon películas delgadas de óxido de cerio (CeO_2) sobre un sustrato metálico por el método Spin Coating variando las concentraciones de Ce y utilizando dos disolventes. Posteriormente, las películas delgadas fueron caracterizadas por espectroscopia Raman, espectroscopia infrarroja de la transformada de Fourier (FT-IR), microscopía electrónica de barrido (SEM) y fotoluminiscencia (PL). Se estudió el efecto del disolvente en la cristalinidad de las películas delgadas de CeO_2 utilizando metanol y etanol. Los resultados de la microscopía SEM muestran que el metanol es el mejor disolvente para obtener películas delgadas con mayor grado de cristalinidad en comparación con el etanol. Por otro lado, se prepararon películas delgadas de CeO_2 dopado con gadolinio (GDC) para mejorar las propiedades ópticas de la película. Con la finalidad de obtener uniones n-p de CeO_2 y silicio, se pretende realizar un crecimiento de Si sobre la película delgada de CeO_2 por el método de sputtering RF.

ABSTRACT

Cerium dioxide (CeO_2) thin films with different Ce concentrations, and dissolvent, were synthesized; and deposited on metal substrates using spin coating. Later, thin films were characterized by Raman spectroscopy, Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), scanning electron microscopy (SEM) and photoluminescence (PL). The dissolvent effect in the CeO_2 thin films crystallinity with methanol and ethanol was studied. SEM microscopy results shows that the methanol is the best dissolvent to obtain thin films with higher crystallinity than ethanol. On the other hand, thin films gadolinium doped CeO_2 (GDC) were synthetized to improve the optical properties in the thing. In order to obtain n-p junctions of CeO_2 and silicon, it is to realize silicon growth on CeO_2 thin film by the sputtering RF method.
Palabras clave: películas delgadas, spin coating, óxido de cerio, gadolinio.

INTRODUCCIÓN

Durante las últimas décadas, los semiconductores de óxidos metálicos han llegado a ser importantes materiales, con numerosas publicaciones centradas en diferentes tipos de estos materiales como: In_2O_3, TiO_2, SnO_2 y CeO_2. Recientemente, ha habido un creciente interés en el uso de CeO_2 debido a sus prometedoras características, incluyendo: (i) es un semiconductor tipo n con un ban-gap de 3.2 eV, (ii) es altamente transparente en la región visible (400-800 nm), y (iii) es barato. Estas ventajas mejoran el potencial del CeO_2 para ser usado ampliamente en un rango de aplicaciones, tales como almacenamiento de oxígeno, ventanas inteligentes, displays electroquímicos, filtros UV, y catálisis. Para las aplicaciones anteriores, se utilizan con mayor frecuencia películas delgadas de CeO_2 debido a su flexibilidad de uso, consideraciones de costo y facilidad de preparación. Las películas delgadas de CeO_2 pueden ser preparadas por varias técnicas, incluyendo spray pirolisis, deposición por láser pulsado, sputtering, y spin coating. Éste último es una de las técnicas más ventajosas debido a su versatilidad, eficiencia y

[1] Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Ingeniería; Cerro de las Campanas s/n, C.P:76010, Querétaro, Querétaro, juanjo0163@hotmail.com.
[2] Laboratorio Nacional CIACYT- Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Sierra Leona 550, Col. Lomas 2ª Sección, C.P: 78210, San Luis Potosí, S.L.P., angel.rodriguez@uaslp.mx.

factibilidad. Por otra parte, el proceso se puede realizar en condiciones ambientales y por lo tanto un sistema de vacío no se requiere. En el presente trabajo se pretende sintetizar películas delgadas de CeO_2 con etanol debido a su bajo costo en comparación con el metanol. Así mismo, se pretende elegir el mejor solvente para su uso en la síntesis de películas delgadas de GDC, misma que se usará para hacer uniones n-p con Si por el método físico de sputtering RF en trabajos futuros.

MÉTODOS Y MATERIALES

Para la solución precursora de la síntesis de películas delgadas de CeO_2 se utilizó cloruro de cerio heptahidratado ($CeCl_3 \cdot 7H_2O$) disuelto en etanol y metanol con agitación magnética. Para la reparación de esta disolución se utilizaron 5 mL del disolvente. La disolución de cloruro de cerio heptahidratado y disolvente se agitan por cinco minutos y posteriormente se agrega el ácido cítrico –de igual manera se pone en agitación magnética- para obtener las concentraciones requeridas. La metodología se comparó con la que reporta Channei D. et. al.Estas disoluciones se guardan en viales y se dejan reposar por un día. El orden de las muestras se aprecia en la siguiente tabla:

Tabla 1. Muestras de películas delgadas de CeO_2 a diferentes concentraciones y empleando distinto disolvente.

Muestra	Concentración (M)	Disolvente
1	0.4	Metanol
2	0.4	Etanol
3	0.3	Etanol

Se realizó spin coating (Laurell WS-65023) depositando rápidamente ~0.1 mL (cinco gotas consecutivas) de la disolución sobre un sustrato de hastealloy C276[3]. El equipo se programó a 2400 rpm por 30 segundos. Este procedimiento se realizó 3 veces a cada muestra para aumentar el espesor de la película. Las películas obtenidas se secaron a 500°C por 5 h en una mufla (incremento de temperatura 300°C/h, enfriamiento natural).

Posteriormente, se llevó a cabo la síntesis de la película delgada de CeO_2-Gd sobre el mismo sustrato metálico y las mismas condiciones del equipo para spin coating de las películas de CeO_2 correspondientes a las muestras de la tabla 1.

RESULTADOS

En la figura 1 se muestran las micrografías SEM de las películas delgadas correspondientes a la muestra 1 y 2. Este análisis de morfología superficial se realizó en un SEM (INSPECT F50) para las muestras mencionadas. Además, se trabajó con un voltaje de 20 kV en un vacío de orden de magnitud de 10^{-5} mbar. En las micrografías a) y b), que están a 200 µm, podemos observar que para la muestra 1 se presenta una superficie más lisa y no se logra apreciar fracturas como en el caso de la muestra 2. Ahora bien, en las micrografías c) y d), que corresponden a 20 µm de escala, ya se nota una gran diferencia en la microestructura superficial de ambas muestras; en la c) apenas se logran apreciar las fracturas superficiales, mientras que en la d) las fracturas tienen ~2.5 µm de espesor.

Estos resultados demuestran que las películas que se sintetizaron con etanol no son adecuadas para su aplicación como película delgada debido a que presentan muchas fracturas en comparación con las

[3] Este sustrato metálico se limpia con una disolución de ácido cítrico en etanol por 5 min y posteriormente en puro etanol por 5 min.

sintetizadas con metanol; esto es, las grietas no permiten una unión n-p uniforme de los semiconductores (CeO_2 y silicio). Por otra parte, podemos observar que las micrografías de la muestra 2 de la figura 1 pertenecen a un material con mayor área superficial en comparación con la muestra 1. Este resultado, aunque parece desfavorable para la aplicación en películas delgadas (muestra 1), se puede investigar para las propiedades de funcionalización de superficies para catálisis, donde el área superficial adquiere gran importancia.

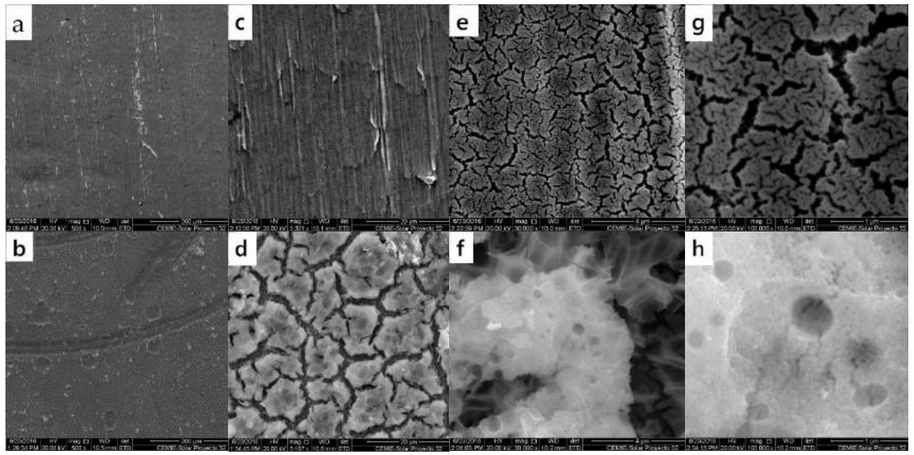


Figura 1. Micrografías SEM de películas delgadas de CeO_2 sobre un sustrato de hastealloy; a), c), e) y g) (muestra 1), 0.4 M de CeO_2 en metanol; b), d), f) y g) (muestra 2), 0.4 M de CeO_2 en etanol.

Los resultados de espectrometría Raman se presentan en la figura 2; aquí se tiene los espectros de las tres muestras de la tabla 1. Según Weber et. al. el CeO_2 policristalino que correspondiente a la estructura de fluorita presenta tres modos de vibración a frecuencias de 272, 595 y 464 cm^{-1}, siendo esta última la de mayor intensidad. Analizando los espectros de las películas delgadas sintetizadas por spin coating podemos apreciar que también presentan tres picos de intensidad correspondiente a los modos de vibración Raman que se reporta en la literatura. Siendo los resultados experimentales correspondientes a 223.45, 584.60 y 454.02 cm^{-1}.

El espectro Raman también nos ayuda a determinar la cristalinidad de las tres muestras de la tabla 1. La intensidad Raman de la muestra 1 (concentración 0.4 M en metanol) resulta ser la mayor, con lo que podemos asegurar un mayor grado de cristalinidad, resultado que se comprueba con los análisis SEM de la morfología de la muestra en comparación con la muestra 2. De igual manera, para la muestra 2 (0.4 M en etanol) se espera un grado de cristalinidad mayor que para la muestra 3 (0.3 M en etanol) debido a la intensidad que muestra el análisis Raman de la figura 2.

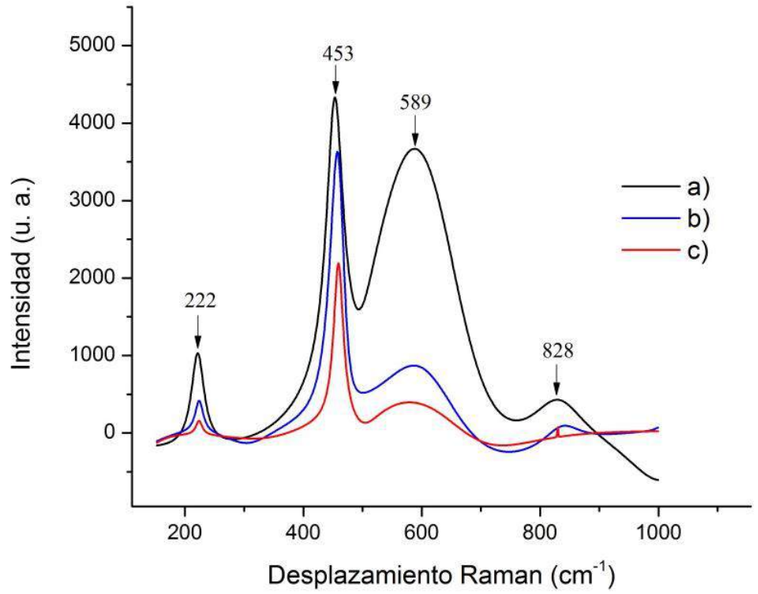


Figura 2. Espectros Raman de películas delgadas de CeO_2 variando la concentración de Ce en metanol y etanol como disolventes: a) correspondiente a una concentración 0.4 M de Ce en metanol, b) a una concentración 0.4 M de Ce en etanol y c) concentración 0.3 M en etanol.

En la figura 3 se muestran los resultados del espectro FTIR de la película delgada de GDC. Los picos observados en la región de 802-490 cm^{-1} corresponden a las vibraciones del enlace Gd-O, el espectro obtenido presenta una banda intensa en ~800 cm^{-1} correspondiente a los modos vibracionales del enlace gadolinio-oxígeno presentes en la red cristalina de la película delgada de GDC aunque Chandradass J. et al reporta que en la región 850-400 cm^{-1} del espectro IR los picos observados pueden ser atribuidos a las vibraciones características del enlace Ce-O. El pico a ~1258 cm^{-1} corresponden a modos vibracionales de grupos NO_3. Las bandas de absorción a 1251-1097 cm^{-1} se beben probablemente a la vibración de tensión del enlace CH-OH.

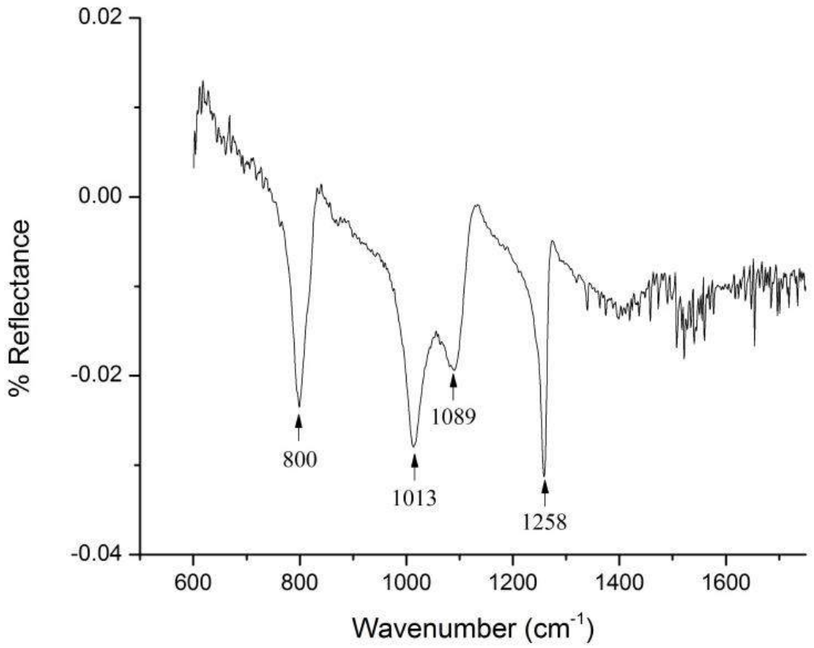


Figura 3. Espectro FT-IR de la película delgada de GDC.

Para analizar la reflexión de luz en el rango ultravioleta (UV) que el Gd le confiere al CeO_2 se realizó un análisis de fotoluminiscencia con un láser de 355 nm, a temperatura ambiente. El espectro PL de la figura 4 muestra los cinco picos más pronunciados; el pico más intenso está a ~543.6 nm (1.78 eV), el siguiente pico más pronunciado está a ~611 nm (2.01 eV) y los de menor intensidad se presentan a ~695 nm (2.28 eV), ~587.142 nm (2.11 eV) y ~ 491 nm (2.52 eV). Estas emisiones de luz de las películas delgadas de GDC corresponden a los parámetros de transición para el estado $5p^5 4f^7$.

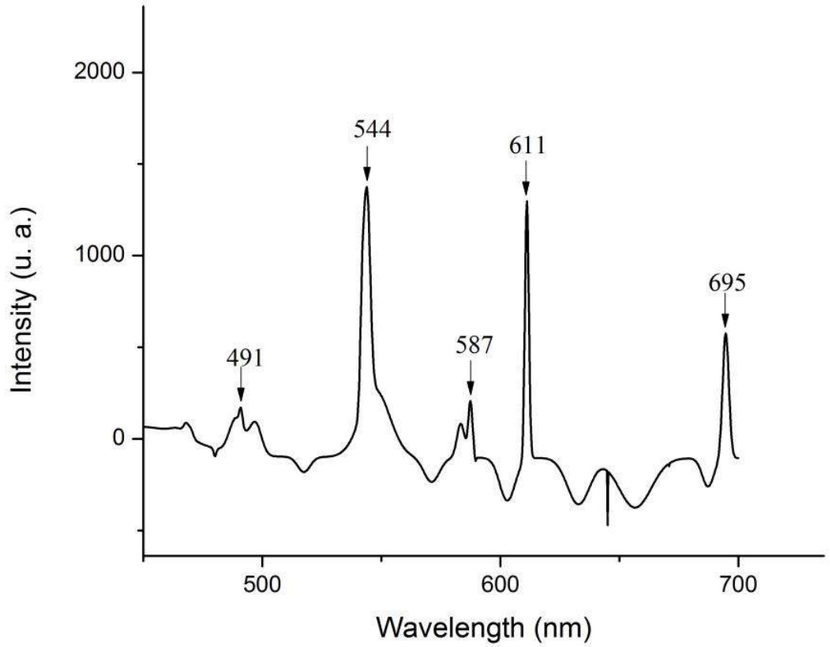


Figura 4. Espectro de fotoluminiscencia de la película delgada de GDC.

CONCLUSIONES

En este trabajo, como muestran las imágenes SEM, se determina que el solvente tiene gran influencia en la síntesis de las películas delgadas. Se utilizó etanol y metanol a diferentes concentraciones; el primer solvente se usó con la finalidad de reducir el costo de la síntesis de películas delgadas.

Sin embargo, el metanol resulta ser el mejor solvente. A pesar de que no se presentan resultados cristalográficos, como análisis de difracción de rayos X (XRD), se puede comparar la cristalinidad de las tres muestras de películas delgadas de CeO_2 con base en el análisis Raman. Los resultados de PL nos demuestran que las películas delgadas de GDC poseen buenas propiedades ópticas de emisión de luz en el UV a temperatura ambiente, siendo películas delgadas con gran interés para realizar uniones de semiconductores n-p para contactos en circuitos electrónicos.

BIBLIOGRAFÍA

Channei D., Nakaruk A., Phanichphant S., Koshy P. & Sorrell C. (2012). “Ceria dioxide thin films using spin coating” en *Journal of Chemistry*, Vol. 2013.

Wang S., Wang W., Zuo J. & Qian Y. (2000). “Study of the Raman spectrum of CeO_2 nanometer thin films” en *Materials Chemistry and Physics*. 68 (2001) 246–248.

Weber W. H., Hass K. C. & McBride J. R. (1993). “Raman study of CeO_2: Second-order scattering, lattice dynamics, and particle-size effects” en *Physical Review B*, Num. 1, Vol. 48, Julio, [pp. 178-185].

Chandradass J., Nam B. & Kim B. H. (2009). “Fine tuning of gadolinium doped ceria electrolyte nanoparticles via reverse microemulsion process” en *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspect,* Vol. 348; [pp. 130–136].

Accardo G., Ferone C., Cioffi R., Frattini D., Spiridigliozzi L. & Dell’Agli G. (2016). “Electrical and microstructural characterization of ceramic gadolinium-doped ceria electrolytes for ITSOFCs by sol-gel route” en J Appl Biomater Funct Mater; 14(1): [pp. 35-41].

A SEARCH FOR DOUBLE-LOBED RADIO EMISSION FROM GALACTIC STARS AND SPIRAL GALAXIES

Abiel Felipe Ortiz Martínez[1] y Heinz Andernach[2]

RESUMEN

Se presenta una búsqueda sistemática de dos tipos de objetos astronómicos con inusuales características: estrellas y galaxias espirales, emitiendo chorros dobles en radio, lo cual sugiere la eyección de estos chorros dobles desde el objeto óptico. Se usó una muestra de 878,031 de estrellas y 675,874 galaxias candidatas a espirales que se combinaron desde varias fuentes de la literatura. Se aplicó un algoritmo para buscar pares de radiofuentes en lados opuestos de éstos. Se encontraron tres nuevos ejemplos de radio estrellas con fuentes dobles, mientras para galaxias espirales sólo se redescubrió una fuente doble conocida, confirmando que estos objetos son extremadamente raros.

ABSTRACT

We present a systematic search for two types of extremely rare astronomical objects: Galactic stars and spiral galaxies with "double radio lobes", i.e. radio emission on opposite sides of the optical object, suggesting the ejection of jets from them. We used unprecedented samples of 878,031 Galactic stars and 675,874 spiral galaxy candidates which we composed from various literature sources. Applying our own algorithm to search for pairs of radio sources straddling these objects, we found three new examples of double-lobed radio stars, while for the spiral galaxies we only rediscovered one known such double source, confirming that the latter objects are extremely rare.

Palabras Clave: astrofísica extragaláctica, galaxias espirales, estrellas, radiogalaxias

INTRODUCTION

Double-lobed radio sources that originate either from stars or from spiral galaxies are extremely rare. We thus performed a new search for more examples of these types of objects.

Within the citizen science project “Radio Galaxy Zoo” (RGZ, radio.galaxyzoo.org), launched in 2013, and of which one of us (HA) is a founding member, several spectroscopically confirmed Galactic stars were found to lie on the axis connecting two radio sources. These suspected “radio lobes” are often extended along the axis between the lobes, very similar to the morphology of the radio emission of classical double radio galaxies. However, different from the latter, the stars usually do not present a radio nucleus at the position of the star. The discovery by a RGZ volunteer of a V~9 mag star (BD+40 2030) motivated one of us (HA) to search the best available radio source catalogue (FIRST, Helfand et al. 2015) performed at 1.4 GHz with an angular resolution of 5.4´´ for double radio sources straddling the position of V<10 mag stars within ~30´. We found a total of five such cases, four of them brighter than V~10 mag. The only known type of double-lobed radio stars are the so-called microquasars (Mirabel & Rodríguez 1999), which are stars that have dark companions (black holes or neutron stars) causing the ejection of radio lobes through mass donation from the visible star onto the dark companion, creating an accretion disk around the latter. All of these are close to the Galactic plane and are copious X-ray emitters, very unlike the double-lobed radio stars found by us to coincide with spectroscopically normal

1 Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Facultad de Ciencias, Álvaro Obregón #64, Col. Centro, C.P. 78000, San Luis Potosí, S.L.P. México, abielpumasbicampeon@hotmail.com
2 Universidad de Guanajuato, Departamento de Astronomía, DCNE, Cjón. de Jalisco s/n, Col. Valenciana, C.P: 36240, Guanajuato, GTO, heinz@astro.ugto.mx

stars, all X-ray quiet and at high Galactic latitudes. Three of the latter stars have been followed up in a spectroscopic monitoring program at TIGRE observatory (Schmitt et al. 2014) at La Luz, Guanajuato, in order to search for possible dark companions, but so far no radial velocity changes have been observed, suggesting that any such companion must be in a much wider orbit with a much longer orbital period. In the present work we extend the search for such stars to fainter magnitudes, by searching for radio emission different from point sources, since the latter type of emission has been known for several decades to occur in certain types of active stars. A thorough search for radio-emitting stars in the FIRST radio survey was done by Helfand et al. (1999) and Kimball et al. (2009). However, the first paper was restricted to brighter stars, and did not reveal any radio double sources, while the latter authors only searched stars in the i-band magnitude range from 15 to 19.1 mag, finding candidates for unresolved radio emission in 112 stars, of which however 108±13 are expected to occur by chance. They also reported resolved or more complex emission around another 76 stars. For the unresolved sources these authors restricted their radio source search within a separation of at most 1´´ from the star, while for the more complex radio sources they visually inspected an area of 2´ x 2´ around these.

On the other hand, the so-called “classical” radio galaxies are found to be almost exclusively hosted in massive, gas-poor elliptical galaxies (e.g. Best et al. 2005). However, since the work of Ledlow, Owen & Keel (1998) about half a dozen spiral galaxies have been found (see Mao et al. 2015 for a review). Recently Singh et al. (2015) used a sample of 187,005 spiral galaxies, to search for extended radio sources within 3´ on opposite sides of these galaxies which could indicate double radio lobes ejected from the central active nucleus of the spirals, They found only four examples, three of which had been known before. In the present work we apply a similar search algorithm to a three times larger sample of candidate spirals, but without the restrictions imposed by Singh et al. (2015) of having a radio source at their nuclei and that the lobes must be extended. Moreover, we searched for possible lobes out to an angular distance of 6', i.e. twice that of Singh et al. (2015).

METHODS AND MATERIALS

A. The Search Algorithm

For both of the searches, around stars and around spiral galaxies, we adapted a FORTRAN code originally written by M. A. Jiménez Valencia (Univ. de Sonora, Mexico) during a summer research project with one of us (HA) in 2015. Our code detects all the sources for a given field and places them in an auxiliary file which is then used to calculate, for each radio source, the angular distance from the central star or galaxy, and the orientation of the radius vector from the central object to the radio source (the position angle). For each pair of radio sources three parameters are calculated, namely the so-called “armlength ratio” (ALR) of the distance between central object and the radio sources on each side, as well as the difference between the two position angles (the so-called “misalignment” or bending angle, or DPA), as well as the ratio of integrated flux densities as listed in the FIRST catalog (the so-called flux ratio, FLR). Only source pairs which lie on opposite sides of the central object, within a given tolerance of armlength ratio, bending angle and flux ratio were kept for further inspection. In our initial inspection we concentrated on the most symmetric and aligned objects, with ALR and FLR closest to unity and DPA closest to 0°.

B. Stars

For our search for double-lobed radio stars we used the Sloan Digital Sky Survey Data Release 12 (SDSS DR12, (Alam et al. 2015) which contains 998,703 spectra classified as Galactic stars. We eliminated all duplicate objects within an angular distance of 1´´, leading to a reduced sample of 878,031 stars. For the current exploratory search, and based on the experience of our previous search for bright stars, we restricted our search to radio sources within 1´ (i.e. 60´´) from the star position, and extracted from the latest (2014-Dec-17) version of the FIRST source catalog (Helfand, White, & Becker, 2015) containing 946,432 radio sources.

C. Spiral Galaxies

Samples of spiral galaxies were extracted from four different sources.
Firstly, Kuminski & Shamir (2016, KS16) applied an automated algorithm to classify ~3,000,000 galaxies of which ~900,000 were considered spirals and ~600,000 ellipticals. From their spectral sample we selected those classified as spiral (S), having redshift $z > 0.003$, a probability of being a star (p_{star}) of <0.01, and a probability of being a spiral (p_{spi}) of >0.80. Inspection on the SDSS server (skyserver.sdss.org/DR13//en/tools/explore/summary.aspx) led us to select 170,823 further objects with the $0.6 < p_{spi} < 0.8$, and $p_{star} < 0.1$, and $z>0.002$. No upper redshift limit was imposed since a visual inspection of several supposedly high-z objects revealed faint low-surface brightness objects with wrongly determined redshift. From the non-spectral sample we selected all objects with $p_{spi} > 0.6$. A cleaning of all duplicate objects within 1.5" using TOPCAT (Taylor 2013) resulted in a clean sample of 575,486 supposedly unique objects. Secondly, Willett et al. (2013) have used the votes of over 87,000 volunteers of the Galaxy Zoo 2 (GZ2) project to classify 304,122 galaxies bright enough to allow morphological classification from visual inspection.

We considered all objects whose so-called gz2_class, the "most common consensus classification for each galaxy" started with the letter S, indicating any sub-type of a spiral galaxy. After removal of identical objects contained in different subsamples of GZ2 this resulted in 167,249 spiral galaxy candidates. Thirdly, Huertas-Company et al. (2011, HC11) used support vector machines to classify 698,420 galaxies into 4 morphological types (E, S0, Sab, Scd). They also list the so-called "Automatic Spectroscopic K-means based (ASK) classification" as derived by Sánchez-Almeida et al. (2010) only from optical spectra of these galaxies. We selected all galaxies with a probability of at least 0.7 for being Sab or Scd. From all the remaining galaxies we selected those with ASK > 14, which according to Sánchez Almeida et al. (2010) is a good indicator of a late-type spiral. We then excluded all objects with probabilities > 0.5 of being either an E/S0 or S0 type, leaving 129,527 galaxies. Finally, to complete our spiral galaxy sample for the brightest objects, we selected from HyperLEDA (http://leda.univ-lyon1.fr) all galaxies with btc < 16 mag, morphological type T>2.0 and an uncertainty in this type of $\Delta T<0.5$, which resulted in 1150 galaxies in the region observed by the FIRST radio survey. Excluding all duplicates within 2.5" with the KS16 sample, and those between the GZ2, HC11, and HyperLEDA samples, we ended up with 675,874 spiral candidates. This may include a few objects corresponding to different bright regions in the same spiral galaxy. Our final sample is thus ~3.6 times larger than the sample size of Singh et al. (2015). Moreover we searched an area around these objects four times as large, corresponding to a search ~14 times larger than the largest previous systematic search.

RESULTS

A. Stars

Using TOPCAT we extracted all radio sources from the FIRST catalog within 1′ of the sample of 878,031 stars, keeping only those 7192 stars which had at least two such radio sources. We applied our algorithm to these 16,693 radio sources and found 524 radio source pairs showing a high level of symmetry. Initially we included all objects with ALR >10 in order to find possibly one-sided radio sources for which one source coincided with the star and the other may be ejected from the star. The few cases we had time to inspect did not show evidence for a one-sided ejection, but we could confirm about a dozen unresolved radio sources coinciding with stars that had already been identified by Kimball et al. (2009).

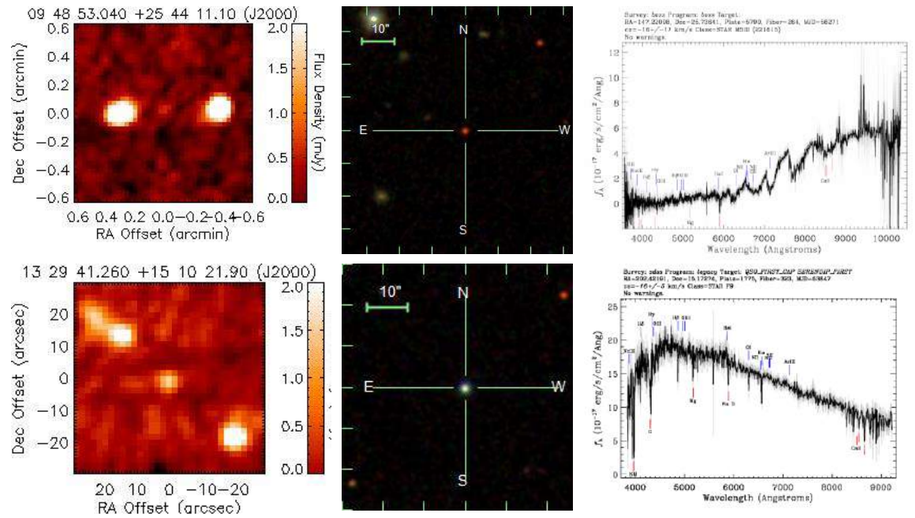
In order to concentrate on the most promising candidates for double-lobed sources, we visually inspected all 38 cases which fulfilled the conditions $0.5 \leq FLR \leq 2.0$, $0.5 \leq ALR \leq 2.0$ and $DPA \leq 5°$. A total of 3 convincing examples were found, which we present in Fig. 1. The upper row shows SDSS J132941.25+151021.8, an r=18.17 mag F9 star with a radio core and two symmetrically placed lobes

which have no optical or infrared counterpart. This star had been reported as having complex radio emission by Kimball et al. (2009) but without mentioning its symmetric triple structure. The middle row shows SDSS J094853.03+254411.0, an M5 star with a faint radio core of ~0.6 mJy and two radio lobes 43" apart, not only symmetrically placed on opposite sides of the star, but being extended along the major axis of the entire source. The optical spectrum leaves no doubt about its stellar nature. The bottom row shows the K3 star SDSS J154013.86+312125.0 within ~2" of the center of a symmetrical double radio source of size ~45". While the optical spectrum leaves no doubt about the stellar nature, the optical image of this object shows some gradient from green in the NW to red color in the SE, and leaves a possibility that this is a superposition of a brighter star and a fainter galaxy.

B. Spiral Galaxies

We extracted all radio sources from FIRST within 6.0′ around the 675,874 spiral candidates. Running our source code to look for source pairs aligned with the spiral candidates, we reduced the resulting sample to the most promising pairs with the smallest DPA, ALR and FLR closest to unity and radio flux > 2.5 mJy. We discarded all cases where one of the radio sources coincided with an optical object from SDSS within 2.4". We inspected a total of 115 such source pairs, but did not find any evidence for a relation with the spiral galaxy except for a single case, previously reported by Mao et al. (2015). This is the face-on spiral SDSS J164924.01+263502.5 with a classical double radio sources known as B2 1647+26A.

Of those spirals with only a single source within 6', about 1290 fell within 1.5" of the SDSS position, and thus are very likely the true radio nuclei of these spirals. We inspected all 70 radio sources with either a deconvolved size of at least 10", or larger than 5" and integrated flux above 10 mJy, All sources were compatible with the radio emission confined within the plane of the galaxies, and thus being due to star formation activity. No single case was found in which the radio orientation indicated a jet-like feature corresponding to a classical radio galaxy oriented perpendicular to the galaxy major axis, again confirming the extreme rareness of these objects.



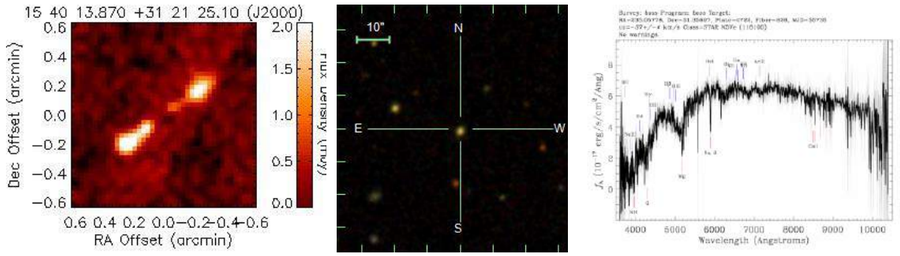


Fig. 1. Examples of 3 radio stars with double-lobed radio emission found by us; each row shows the radio image on the left, the optical image at center, and the optical spectrum at right (see text for details)

CONCLUSIONS

Using unprecedented samples of 878,031 Galactic stars and 675,874 spiral galaxy candidates we designed an algorithm to search for pairs of radio sources suggesting the emission of radio jets from them, similar to those known in classical radio galaxies. We found three new examples of double-lobed radio stars, while for the spiral galaxies we only rediscovered one previously known double source, confirming that the latter objects are extremely rare. As an aside, we found that the detection of radio emission matching an SDSS object classified as a spectroscopic star, is an efficient method to detect misclassified optical spectra, either very noisy or with wrongly identified spectral lines.

The period of 5 weeks for this research project did not allow us to inspect more candidates we found with our algorithm. We plan to clean these large lists further, e.g. by eliminating all radio lobes having an optical counterpart in SDSS, and/or by including in our analysis the orientation of those suspected radio lobes that are listed as extended nearly along the major axis of the pair of lobes straddling the central object. Moreover, our algorithm may be applied to other existing and future radio surveys or new optical samples like spectroscopic stars or spiral galaxies.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to M. A. Jiménez Valencia (Univ. de Sonora, Mexico) for sharing his FORTRAN code to search for radio source alignments around arbitrary sky positions.

BIBLIOGRAPHY

ALAM, S., ALBARETI, F.D., ALLENDE PRIETO, C., ANDERS, F., ANDERSON, S.F., ANDERTON, T., ANDREWS, B.H., ARMENGAUD, E., AUBOURG, É., and 296 coauthors (2015). "The Eleventh and Twelfth Data Releases of the Sloan Digital Sky Survey: Final Data from SDSS-III" in Astrophys. J. Suppl. Ser. 219, Art.12.

BECKER, R.H., WHITE, R.L., HELFAND, D.J., (1995). The FIRST Survey: Faint Images of the Radio Sky at Twenty Centimeters, Astrophys. J., 450, 559-577

BEST, P.N., KAUFFMANN, G., HECKMAN, T.M., IVEZIĆ, Ž., (2005), A sample of radio-loud active galactic nuclei in the Sloan Digital Sky Survey, Mon. Not. Roy. astron. Soc. 362, 9-24

HELFAND, D.J., SCHNEE, S., BECKER, R.H., WHITE, R.L., McMAHON, R.G., (1999). The FIRST Unbiased Survey for Radio Stars, Astron. J, 117, 1568-1577

HELFAND, D.J., WHITE, R.L., BECKER, R.H., (2015). The Last of FIRST: The Final Catalog and Source Identifications, Astrophys. J., 801, Art. 26

HUERTAS-COMPANY, M., AGUERRI, J.A.L., BERNARDI, M., MEI, S., SÁNCHEZ ALMEIDA, J., (2001). Revisiting the Hubble sequence in the SDSS DR7 spectroscopic sample: a publicly available Bayesian automated classification, Astron. Astrophys. 525, A157

KIMBALL, A.E., KNAPP, G.R., IVEZIĆ, Ž., WEST, A.A., BOCHANSKI, J.J., PLOTKIN, R.M., GORDON, M., (2009), A Sample of Candidate Radio Stars in First and SDSS, Astrophys. J., 701, 535-546

KUMINSKI, E., SHAMIR, L., (2016). Computer-generated visual morphology catalog of ~3,000,000 SDSS galaxies, Astrophys. J. Suppl. Ser. 223, Art. 20

LEDLOW, M.J., OWEN, F.N., KEEL, W. C., (1998). An Unusual Radio Galaxy in Abell 428: A Large, Powerful FR I Source in a Disk-dominated Host, Astrophys. J., 495, 227-238

MAO, M.Y., OWEN, F.N., DUFFIN, R., KEEL, W.C., LACY, M., MOMJIAN, E., MORRISON, G., MROCZKOWSKI, T., NEFF, S., NORRIS, R.P., SCHMITT, H., TOY, V., VEILLEUX, S., (2015), Mon. Not. Roy. astron. Soc. 446, 4176-4185

MIRABEL, I.F, RODRÍGUEZ, L.F., (1999). Sources of Relativistic Jets in the Galaxy, Ann. Rev. Astron. & Astroph. 37, 409-443

SÁNCHEZ ALMEIDA, J., AGUERRI, J.A.L., MUÑOZ, C., de VICENTE, A., (2010). Automatic Unsupervised Classification of All Sloan Digital Sky Survey Data Release 7 Galaxy Spectra, Astrophys. J. 714, 487-504

SCHMITT, J.H.M.M., SCHRÖDER, K.-P., RAUW, G., HEMPELMANN, A., MITTAG, M., GONZÁLEZ-PÉREZ, J.N., CZESLA, S., WOLTER, U., JACK, D., EENENS, P., TRINIDAD, M.A., (2014). TIGRE: A new robotic spectroscopy telescope at Guanajuato, Mexico, Astron. Nachr., 335, 787-796

SINGH, V., ISHWARA-CHANDRA, C.H., SIEVERS, J., WADADEKAR, Y., HILTON, M., BEELEN, A., (2015), Mon. Not. Roy. astron. Soc. 454, 1556-1572

TAYLOR, M., (2013). TOPCAT - Tool for OPerations on Catalogues And Tables, Starlink User Note 253 (see also http://www.star.bris.ac.uk/~mbt/topcat)

WILLETT, K.W., LINTOTT, C.J., BAMFORD, S.P., MASTERS, K.L., SIMMONS, B.D., CASTEELS, K.R.V., EDMONDSON, E.M., FORTSON, L.F., KAVIRAJ, S., KEEL, W.C., MELVIN, T., NICHOL, R.C., RADDICK, M.J., SCHAWINSKI, K., SIMPSON, R.J., SKIBBA, R.A., SMITH, A.M., THOMAS, D., (2013).

DETERMINACIÓN DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN PLÁNTULAS REGADAS CON AGUA DESINFECTADA

Iván Padrón Azúa[1] y Ana Angélica Feregrino Pérez[2]

RESUMEN

La agricultura es una de las actividades económicas que tienen un mayor consumo de agua provocando un impacto al ambiente pero a su vez es necesaria la producción de alimentos por lo que se propone el uso de agua desinfectada (residuales tratadas por fotocatálisis de TiO_2 dopado con Ag) para el riego de las mismas, esta agua sería recuperada dándole un segundo uso disminuyendo el consumo de agua directo de afluentes naturales teniendo como objetivo evaluar la diferencia de capacidad antioxidante y equivalentes de ácido gálico en ambos tratamientos. Se determinaron fenoles por el método Folin-Ciocalteau DPPH (Burda y Oleszek, 2001), ABTS por el método Pellegrini y %ARA en plántulas de espinaca y zanahoria regadas con agua desinfectada mostrando que no hay diferencia significativa contra el control de agua corriente tomada de la red pública.

ABSTRACT

Agriculture is one of the economic activities that have a high water consumption causing an impact to the environment but it is necesary for food production so the use of disinfected water is proposed (wastewater treated by photocatalysis of TiO_2 doped with Ag is necessary) to irrigate them, this water would be recovered giving a second use decreasing water consumption of natural sources aiming evaluate the difference in antioxidant capacity and gallic acid equivalents in both treatments. phenols were determined by the Folin-Ciocalteu DPPH method (Burda and Oleszek, 2001), ABTS by the method Pellegrini and% ARA in seedlings of spinach and carrots irrigated with water disinfected showing no significant difference against the control of tap water taken from the public network.

Palabras Clave: TiO_2, Capacidad antioxidante, Riego de cultivos, Fenoles.

INTRODUCCIÓN

El recurso natural más importante a nivel mundial es el agua, la cual atraviesa por una crisis de contaminación y mientras la población mundial sigue creciendo también la demanda de agua lo cual ha provocado consecuencias para el ambiente (Teh-Rahman, 2011) por lo que se propone el uso de aguas residuales tratadas por fotocatálisis con TiO_2 dopado con Ag para el riego de plantas cuya finalidad es el consumo humano. Las nanopartículas de TiO_2 pueden utilizar la radiación UV proveniente de la luz solar para desencadenar la fotocatálisis y degradar compuestos orgánicos (Teh-Rahman, 2011). Además que la Ag potencia su efecto (Seery *et al.,* 2007; Thiel *et al.,* 2007), mejorando la producción de ERO generando un estrés oxidativo que lleva a la muerte celular confiriéndole efecto antibacteriano (Panda *et al.,* 2011) contra *Eschericha coli*, (Pérez 2014; Wang *et al.,* 2006; Machida *et al.,* 2005), *Staphylococcus*

[1] Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Unidad Académica Multidisciplinaria Zona Huasteca, Romualdo del Campo #501, Fraccionamiento Rafael Curiel CP 79060 Ciudad Valles, S.L.P. ivan_padron@live.com.mx
[2] Universidad Autónoma de Querétaro, Campus Aeropuerto, Laboratorio de metabolitos secundarios y metabolómica. Biosistemas. Fac. de Ingeniería. Carretera a Chichimequillas, Ejido Bolaños, Querétaro, Qro CP 76140. E-mail: feregrino.angge@hotmail.com

aureus y *Klebsiella pneumoniae*, (Kedziora *et al.,* 2012) endoesporas bacterianas (Foster *et al.,* 2011) e inactivación de virus (Liga *et al.,* 2011) por lo que tiene un gran potencial para proveer una buena opción para combatir la transmisión de enfermedades infecciosas y tratar las aguas residuales.

En cuanto a su toxicidad, debido a la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) sugiere un daño a las membranas celulares de plantas (Ghosh *et al.,* 2010), ratones (Naya *et al.,* 2012; Lindberg *et al.,* 2012) y ligeramente en células humanas (Shukla *et al.,* 2011; Di Virgilio *et al.,* 2010) además de considerar las características de las nanopartículas ya que las nanopartículas de anastasa de 20 nm son genotóxicas mientras que a 200 nm no induce toxicidad (Di Virgilio *et al.,* 2010).

Las ERO también son producidas naturalmente por un metabolismo aeróbico normal por lo que naturalmente cuenta con enzimas antioxidantes para proteger las células del estrés oxidativo que puede dañar al ADN, ARN, proteínas y lípidos de membrana (Nantasenamat et al., 2008). Muchos antioxidantes naturales están basados en compuestos fenólicos (Nantasenamat *et al*., 2008; Hamood-Hossain 2015) ya que actúan como antioxidantes debido a que reaccionan y desactivan radicales libres lo cual conlleva beneficios para salud (Stewart, *et* al 2008; Dang *et al.,*2015) protegiendo de los efectos del estrés oxidativo por lo que puede bajar la incidencia en cáncer y enfermedades cardiacas (Mandave *et al.,* 2014) por lo que se tiene como objetivo evaluar la diferencia de capacidad antioxidante y compuestos fenólicos en equivalentes de ácido gálico en ambos tratamientos. Lo anterior proporcionara un aproximado del comportamiento del agua desinfectada en el desarrollo de metabolitos secundarios Vs el agua potable. Los metabolitos secundarios se expresan cuando la planta es sometida a un proceso de estrés de tipo biótico o abiótico, estos metabolitos y de manera particular los fenoles contribuyen a la salud (Rakotomanomana *et al*., 2016). Se ha encontrado que en alimentos con alta concentración de fenoles funciona como un fuerte antioxidante (Moreira *et al*., 2008) además funciona como conservador alimenticio previniendo la oxidación de lípidos y alarga su vida de anaquel (Hamdy *et al*., 2013). Si se logran obtener compuestos bioactivos como lo son los compuestos fenólicos al regar con agua desinfectada en la misma proporción que el agua de la red pública, sería un indicador que este tipo de agua no genera estrés en la plántula y pudiera ser una alternativa de uso en el sector agrícola.

METODOS Y MATERIALES

El desarrollo experimental se llevó a cabo en el Campus Aeropuerto en el Laboratorio de Metabolitos Secundarios y Metabolómica de la Facultad de Ingeniería., UAQ. Ubicado en carretera a Chichimequillas, Ejido Bolaños, Querétaro, Qro. En un periodo del 6 de Junio al 15 de Julio del 2016.

Obtención de plántulas

Se sembraron semillas de zanahoria y espinacas de la marca Germinal ® en almácigos de poliestireno expandido de 26 x 13 pozos con sustrato. Los almácigos se dividieron en dos partes iguales de 13 x 13 en la que una parte se regó con 5 ml de agua corriente (control negativo) y la otra parte con 5 ml de agua desinfectada previamente tratada, con una concentración de plata <30 ppm proporcionada por el laboratorio de Materiales Nanoestructurales y Funcionales de La Universidad Autónoma de Querétaro Campus Aeropuerto cada tercer día durante 3 semanas hasta la obtención de la plántula. Se desarrolló en un invernadero comercial compuesto de una estructura de tubular con dimensiones de 1 x 1 x 2 m con una cubierta plástica impermeable teniendo una temperatura promedio de 27.5°C.

Preparación de la muestra

Una vez que las plántulas obtuvieron de un tamaño promedio de 4cm, después de las hojas verdaderas se procesaron las muestras. La extracción se realizó con 200 mg de muestra y se adicionaron 10 ml de metanol. Se cubrió de la luz la muestra con papel aluminio y se agita durante 24 h. Centrifugando a 4000 rpm por 10 min, desechando la pastilla formada, quedando el sobrenadante.

Determinación de Fenoles Totales
Se determinó según el método de Folin-Ciocalteau. Se realizó una curva de calibración utilizando concentraciones de (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 µg/ml de ácido gálico) por triplicado.

Determinación de Capacidad antioxidante por DPPH
El método modificado adaptado para su uso en mircroplaca. Este método se basa en la disminución de la absorbancia del radical libre $DPPH^{\cdot}$, ya que cuando sufre reducción por un antioxidante, lo que proporciona un índice para estimar la capacidad del compuesto de prueba para atrapar radicales por la donación de hidrógeno. La actividad antirradical (ARA) se calcula como porcentaje de decoloración de DPPH, usando la siguiente ecuación (Burda y Oleszek, 2001):

$$ARA = 100 \times (1 - A_{muestra} / A_{control})$$

Donde ARA= actividad antirradical, $A_{muestra}$ es la absorbancia de la muestra a 520nm y $A_{control}$ es la absorbancia del control (ausencia de antioxidante).

Determinación de capacidad antioxidante por ABTS
El método de Pellegrini *et al,* (1999) fue desarrollado usando el 2,2'-asinobis (ácido-6-sulfónico-3-etilbenzotiazolina (ABTS) modificado para microplaca basándose en la disminución de la absorbancia del radical libre ABTS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El contenido de µg equivalentes de ácido gálico/g de muestra fresca entre los dos tratamientos (Agua corriente y desinfectada) entre la misma especie (Tabla 1), es similar sin presentar diferencia significativa (Std Error=4.3149) al igual que los mM equivalentes de trolox/g de muestra por DPPH (Std Error=1.7849) y por ABTS (Std Error=2.6988) y el %ARA (Tabla 2 y 3) entre los dos tratamientos de la misma especie (α=0.05) por lo que se sugiere que tienen una actividad antioxidante similar entre los dos tratamientos mostrando un comportamiento distinto al que reporta Ascensao 2003 que logró incrementar la cantidad de compuestos fenólicos al exponer plantas a membranas de patógenos por lo que no funciona como elicitor.

Tabla. 1. Contenido de equivalentes de ácido gálico a distintos tratamientos.

	Zanahoria		Espinaca A	
	Corriente	Desinfectada	Corriente	Desinfectada
µg eq. Ac. Gal	71.6909621	75.0728863	34.2954325	42.01166181
Std Error	+/- 1.5680	+/- 5.4609	+/- 0.5911	+/- 7.4125

Tabla. 2. Equivalentes de trolox y %ARA a distintos tratamientos mediante ABTS.

	Zanahoria		Espinaca A		Espinaca B	
	Corriente	Desinfectada	Corriente	Desinfectada	Corriente	Desinfectada
mM eq. Trolox	117.9695673	116.1578697	131.0984308	131.3266762	104.151213	93.75653828
Std Error	+/- 1.7701	+/- 2.6064	+/- 0.6557	+/- 4.4288	+/- 3.6198	+/- 0.7930
% ARA	97.10199615	95.66431455	107.5204709	107.7015962	86.1363722	77.88762688

Tabla. 3. Equivalentes de trolox y %ARA a distintos tratamientos mediante DPPH.

	Zanahoria		Espinaca A		Espinaca B	
	Corriente	Desinfectada	Corriente	Desinfectada	Corriente	Desinfectada
mM eq. Trolox	55.84117032	60.01044932	56.87565308	80.78369906	39.6238245	31.57784744
Std Error	+/- 1.6667	+/- 1.6433	+/- 2.4557	+/- 0-2435	+/- 2.0614	+/- 1.8110
% ARA	235.6193927	239.0614217	236.47343	256.2111801	222.230849	215.5883368

CONCLUSIONES

Al no encontrarse diferencias significativas en los parámetros evaluados puede sugerirse que el agua desinfectada no funge como elicitor en las plantas por lo tanto no les genera estrés mayor al que pudiera generar el agua corriente llevándose el desarrollo de las plántulas similar en ambos tratamientos. Estos resultados sugieren que el agua desinfectada puede ser una alternativa viable en la agricultura.

BIBLIOGRAFÍA

- Ascensao A., Dubery I. (2003) "Soluble and Wall-bound phenolics and phenolic plolymers ins *Musa acuminata* roots exposed to elicitors from *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense"*en *Phytochemistry* Vol 63 [pp 679-686]
- Di Virgilio A., Reigosa M., Arnal P., Fernández M. (2012) Comparative study of the cytotoxic and genotoxic effects of titanium oxide and aluminium oxide nanoparticles in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells. Journal of Hazardous Materials Vol 177.
- Foster H., Ditta I., Varghese S. (2011) Photocatalytic disinfection using titanium dioxide: spectrum and mechanism of antimicrobial activity. Applied Microbiology and Biotechnology Vol. 90.
- Ghosh M, Bandyopadhyay M., Mukherjee A. (2010) Genotoxicity of titanium dioxide (TiO2) nanoparticles at two trophic levels: plant and human lymphocytes. Chemosphere Vol. 81.
- Kedziora A., Strek W., Kepinski L., Bugla-Ploskonska G., Doroszkiewiecz W. (2012) Synthesis and antibacterial activity of novel titanium dioxide doped with silver. Journal of Sol-Gel Science and Technology 62:79-86.
- Liga M., Bryant E., Colvin V., Li Q. (2011) Virus inactivation by silver doped titanium dioxide nanoparticles for drinking wáter treatment. Water Research Vol. 45.
- Lindberg K., Falck M., Catalán J., Koivisto A., Suhonen S., Järvetaus H., Rossi M., Nykäsenoja H., Peltonen Y., Moreno C., Alenius H., Tuomi T., Savolainen M. Norppa H. Genotoxicity of inhaled nanosized TiO2 in mice. Mutation Research Vol. 745.
- Machida M., Norimoto K., Kimura T. (2005) Antibacterial Activity of Photocatalytic Titanium Dioxide Thin Films with Photodeposited Silver on Surface of Sanitary Ware. Journal of American Ceramic Society Vol. 88.
- Min T. C., Rahman M. A. (2011), Roles of titanium dioxide and ion-doped titanium dioxide on photocatalytic degradation of organic pollants (phenolic compounds and dyes) in aqueous solutions: A review. Journal of Alloys and Compounds Vol. 509.
- Naya M., Kobayashi N., Ema M., Kasamoto S., Fukumuro M., Takami S., Nakajima M., Hayashi M., Nakanishi J. (2012) In vivo genotoxicity study of titanium dioxide nanoparticles using comet assay following intratracheal instillation in rats. Regulatory Toxicology and Pharmacology Vol. 62
- Panda K., Achary M., Krishnaveni R., Padhi K., Sachindra N. (2011) In vitro biosyntesis and genotoxicity bioassay of silver nanoparticles using plants. Toxicology in vitro Vol 25.
- Pérez R. (2014) Tesis Doctoral Incorporación de plata para incrementar las propiedades antimicrobianas de aleaciones de titanio. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Medicina. Madrid, España.
- Seery M., Reenamole G., Floris P., Pillai S. (2007) Silver doped titanium dioxide nanomaterials for enhaned visible light photocatalysis. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry Vol. 189.
- Shukla R., Sharma V., Pandey A., Singh S., Sultana S., Dhawan A. (2011) ROS-mediated genotoxocity induced by titanium dioxide nanoparticles in human epidermal cells. Toxicology in vitro Vol. 25.
- Thiel J., Pakstis L., Buzby S., Raffi M., Ni C., Pochan D., Shah I. (2007) Antibacterial Properties of Silver-Doped Titania. Journal Small Vol. 3.

- Wang Q., Yu H., Zhong L., Liu J., Sun J. Shen J. (2006) Incorporation of Silver Ions into Ultrathin Titanium Phosphate Films: In Situ Reduction to Prepare Silver Nanoparticles and Their Antibacterial Activity. Chemistry of Materials Vol. 18.
- Stewart A. J. (2008) "Phenols", Enciclopedia of Ecology, Earth Systems and Enviromental Sciences. [pp. 2682 – 2689]
- Nantasenamat C., Isarankura-Na-Ayudhya C., Naenna T. (2008) "Prediction of bond dissociation enthalpy of antioxidant phenols by support vector machin" en *Journal of Molecular Graphics and Modelling* Vol. 27 [pp. 188-196].
- Moreira L., Dias L., Pereira J., Estevinho L. (2008) "Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal" en *Food and Chemical Toxicology* Vol. 46 [pp. 3482 – 3485].
- Mandave P., Pawar P., Ranjekar P., Mantri N., Kuvalekar A. (2014) "Comprehensive evaluation of *in vitro* antioxidant activity, total phenols and chemical profiles of two comercially important strawberry varieties" en *Scientia Horticulturae* Vol 172 [pp. 124 – 134].
- Hamdy M., Sarhan M., Abdel-Hamed K., Khalel K. (2013) "Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris L.*), sage (*Salvia officinalis L.*), and majoram (*Origanum majorana L.*) extracts" en *Industrial Crops and Products* Vol 43 [827 – 831].
- Rakotomanomana S., Madani K., Dangels O. (2016) "Antioxidant activity of olive phenols and other dietary phenols in model gastric conditions: scavenging of the free radical DPPH and inhibition pf the haem-induced peroxidation of the lineolic acid" en *Food Chemistry* Accepted Manuscript.
- Dang J., Tao Y., Shao Y., Mei L., Zhang L., Wang Q. (2015) "Antioxidative extracts and phenols isolated from Qinghai-Tibet Plateu medicinal plant *Saxifraga tangutica* Engl" en *Industrial Crops and Products* Vol. 78 [pp. 13-18].
- Hamood A., Hossain M. (2015) "Total phenols, total flavonoids contents and free radical scavenging activity of sedes crude extracts of pigeon pea traditionally used in Oman for the treatment of several chronic diseases" en *Asian Pacific Journal of tropical disease* Vol. 5 [pp. 316 – 321]

ANALISIS COMPARATIVO DE LOS EXTRACTOS DE PLANTAS ORIGINARIAS DEL ESTADO DE GUANAJUATO CON EL USO PARA CONTROL DE LA HIPERGLUCEMIA

Eva Yasmin Palomino Saldaña[1] y Gabriel Herrera Pérez[2]

RESUMEN

En este trabajo se considera las plantas como biomateriales ya que el origen biológico de esta materia sólida tiene una aplicación directa, el analizar y escudriñar con mayor detalle estos materiales llevan a un conocimiento básico sustancialmente importante, teniendo un impacto directo tanto en el tema de la salud popular como en la extracción de activos muy específicos y de gran demanda. En ocasiones al paso de tiempo el conocimiento popular se va transformado de una manera propia que puede llegar a originar cambios significativos en el mismo conocimiento por lo que en ocasiones detallar en él tiene un gran impacto en el saber popular originando una clara resistencia a ser al menos considerado. El caso de la Chaya y Níspero que presumiblemente se asume que puede ser nativas del Estado de Guanajuato por su relativa significativa abundancia y consumo como plantas para el control hipoglucémico tengan otro origen. Esto hace importante de las características de la adaptabilidad que pueden llevar con ello cambios estructurales de n las sustancias activa como de su concentración. Después de una búsqueda importante en la literatura científica y de difusión científica se identifica de manera directa y clara.

ABSTRACT

This paper considers the plants as biomaterials since the biological origin of this solid matter has a direct application analyze and examine in greater detail these materials lead to a substantially important basic knowledge, having a direct impact on both the issue of popular health and extraction of very specific assets and in high demand. Sometimes the passage of time the popular knowledge is being transformed in a way itself which can even cause significant changes in the same knowledge so sometimes detail in it has a big impact on popular knowledge resulting in a clear resistance to be at less considered. The case of Chaya and Nispero which presumably can be assumed that native State of Guanajuato for significant relative abundance and consumption as hypoglycemic plants for control are another source. This makes it important characteristics of adaptability that may lead to structural changes thus the active substances as n its concentration. After a major search scientific literature and scientific dissemination is identified directly and clearly.

Palabras Clave: Etnobotánica, Chaya, Níspero, Hiperglucemia.

INTRODUCCIÓN

No sabemos cómo se comenzaron a utilizar las plantas medicinales pero sí desde cuándo: en la Prehistoria, hace unos 60,000 años atrás. En aquellos días, donde no existían las grandes cadenas de hipermercados o farmacias con servicio de 24 horas, el hombre tenía que satisfacer todas sus necesidades con los recursos que la naturaleza le ofrecía. Seguramente, la búsqueda de alimento en el reino vegetal, lo llevó a descubrir por azar que algunas plantas en lugar de ser comestibles eran venenosas, mientras que otras le producían efectos diversos: aliviar el dolor de una articulación, aumentar el sudor o les hacían defecar con mayor facilidad (Barquero, A. A. 2007).

[1]Instituto Tecnológico Superior de Purísima del Rincón (ITSPR), Departamento de Ingeniería Bioquímica; Boulevard del Valle 2301, Colonia Guardarrayas, C.P. 36425, Purísima del Rincón, Guanajuato. mita_evita@hotmail.com
[2]Instituto Tecnológico Superior de Irapuato (ITESI), Departamento de Ingeniería en Materiales; Carretera Irapuato-Silao Km. 12.5, El Copal, C.P. 36821, Irapuato, Guanajuato. gaherrera@itesi.edu.mx.

Las plantas medicinales son aquellas que obtienen uno o más principios activos que son los que contienen la actividad medicinal. Muchos de estos compuestos o grupos, pueden provocar variaciones no tóxicas en el organismo, su toxicidad depende de la parte empleada (hojas, tallos, flores) y dosis consumida. El uso de plantas medicinales es el medio de tratamiento más común en la medicina tradicional en todo el mundo. Las plantas con cualidades curativas se obtienen mediante la recolección de variedades silvestres o el cultivo de variedades domesticadas (cultivadas), para su consumo o ya sea de uso medicinal (Morales 2012). De acuerdo a la definición de la Organización Mundial de la Salud (OMS). **La medicina tradicional** es la suma de conocimientos, técnicas y prácticas fundamentadas en las teorías, creencias y experiencias propias de diferentes culturas, y que se utilizan para mantener la salud, tanto física como mental. La medicina tradicional en países de América Latina ha entrado en una nueva etapa. Actualmente, la medicina tradicional representa una opción importante de repuesta ante las necesidades de atención a la salud en diferentes países de América Latina y el Caribe a pesar de su presencia subordinada en los sistemas oficiales de salud y de la situación de ilegalidad que comúnmente guardan (Valenzuela Soto, R. 2014).

El término etnobotánica (*ethnos*: pueblo, *botane*: hierba) fue utilizado por primera vez en 1896 por el profesor John W. Harshberger, para referirse al "estudio de las plantas usadas por los pueblos primitivos y aborígenes". Las definiciones que mayor consenso presentan en la actualidad se propusieron hacia finales del siglo XX "*La ciencia de la interacción de los pueblos con las plantas*" (Menendez Baceta, G. 2015). Investigaciones etnobotánicas realizadas en México, reportan que la población utiliza entre 150 y 269 especies de plantas utilizadas empíricamente para el control de la diabetes mellitus. Algunas investigaciones sugieren que es necesario un estudio más exhaustivo de este tipo de plantas medicinales, para poder demostrar su utilidad en el manejo de la diabetes mellitus no insulinodependiente (Ibarra Salas, M. D. J. 2009).

La diabetes mellitus es una enfermedad crónico-degenerativa con prevalencia de 6.5 y 10 millones de personas en México. En los últimos años se ha incrementado el interés de las plantas medicinales como una opción para la obtención de nuevos productos farmacéuticos con menores efectos adversos en la salud de pacientes. Estudios recientes han demostrado que los compuestos activos presentes en extractos de plantas tienen propiedades antioxidantes. Por otro lado, Marles & Farnsworth (1995) estimaron que existen alrededor de 1200 especies vegetales que se vienen usando mundialmente en la medicina tradicional contra la diabetes, con actividad hipoglucemiante. Dicha actividad se atribuye a que contienen compuestos fenólicos, flavonoides, terpenoides, cumarinas, alcaloides y otros constituyentes, los cuales han demostrado su poder de reducir la glucosa en la sangre (Hurtado, J. D. C. G.2015).

En América se encuentran alrededor de 50 especies pertenecientes a los géneros C*nidoscolus,* las cuales se encuentran distribuidas desde México hasta el norte de América del Sur. Algunos de los principales usos que se reportan de las plantas C. *chayamansa,* incluyen el consumo de hojas y cogollos cocinados, además de su uso en alimentación de animales como cabras y cerdos. Las hojas de estas plantas han sido utilizadas con fines medicinales. Están planta es una verdura cultivada en la región Maya de Guatemala, Belice, el Sureste de México, península de Yucatán y partes de Honduras. Y la cual se encuentra en gran parte de la república mexicana en un estudio de 582 plantas recolectadas de parcelas de 13 estados en ellos incluido Guanajuato, el 64.43% fueron de Aguascalientes y un 35.57% de otros estados (Campeche, Coahuila, Colima, Campeche, Jalisco, Guanajuato, Puebla, Oaxaca, Querétaro, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán) de lo cual resulto que la especie chayamansa es la de mayor distribución en el estado de Aguascalientes y los demás estados de la republica que fueron muestreados (Tristán, T. Q.). Aunque es poco conocida afuera de esta región, la evidencia sugiere que la chaya era una planta importante para los antiguos Mayas de la península de Yucatán y tal vez en otras partes de la región Maya. Dada la facilidad de cultivarla, su productividad potencial, y sobre todo alto valor nutritivo, se ha propuesto a la chaya como cultivo potencial para regiones afuera de Mesoamérica (Valenzuela Soto, R. 2014).

Ross-Ibarra y Molina-Cruz (2002) formaron cuatro variedades cultivadas dentro de la subespecie *aconitifolius*, las cuales se muestran en la Figura 1. En la imagen se muestra que las variedades Chaymansa y Redonda muestran morfologías de hoja totalmente distintas de lo que se encuentra en el material silvestre, tanto como Estrella y Picuda muestran morfologías que no las distinguen de plantas silvestres. La chaya, la cual pertenece a la División: Magnoliophyta, Clase: Magnoliopsida, Orden: Malpighiales, Familia: Euphorbiaceae, Subfamilia: Crotonoideae, Tribu: Manihoteae, Género: Cnidoscolus, Especie: C. chayamansa.

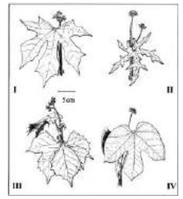


Figura 1. Las cuatro variedades cultivadas de chaya. I Estrella, II Picuda, III C.Chayamansa y IV Redonda.

El níspero japonés es originario del sudeste de china, donde se conoce desde hace 2,000 años. De allí paso a japon, país en el cual se cultiva desde 1180, en México se produce principalmente en los estados de México, Guerrero y Oaxaca. Este fruto además de aportar vitaminas y minerales contiene cantidades importantes de compuestos fenólicos, a los cuales se les ha atribuido importantes actividades benéficas en el organismo.

El corresponde a la División: Magnoliophyta, Clase: Magnoliopsida, Orden: Rosales, Familia: Rosaceae, Género: Eriobotrya, Especie: japónica (Prada 2003). Desde un punto de vista botánico se observan dos tipos de níspero, como se observa en la figura 2 el níspero europeo (Mespilus Germanica), cultivado ya desde hace más de 3,000 años en la regióndel mar Caspio y extendido por los romanos a toda Europa, ahora casi desaparecido y el níspero japonés (Eriobotrya japónica), que es le cultivado actualmente. Ambos pertenecen a diferentes especies, aunque toma el mismo nombre (Berrios, 2003).

Figura 2. Tipos de níspero. Izquierda níspero europeo, derecha níspero japonés

El níspero japonés es una especie de clima subtropical o templado-cálido, de inviernos suaves, ya que en esta época florece y se desarrolla el fruto. En zonas con clima muy frío o excesivamente cálido y húmedo, crece como planta ornamental, con lo cual no es posible optar a producciones comerciales aceptables tolera temperaturas de 10 ºC, los frutos se dañan a -3 ºC, la temperatura letal para las yemas florales es de -7,2 ºC y para flores abiertas, de -3,3 ºC. Si bien el níspero no es endémico de México tiene la capacidad de adaptarse y crecer fructíferamente en suelos mexicanos, ya que México es un país con una diversidad de climas y suelos lo que motiva a un mejor aprovechamiento tanto en su consumo como en su comercialización (LOPEZ LOPEZ, E. A. 2012). Actualmente es muy cultivado en regiones templadas de México. Guanajuato cuenta con zonas templadas como muestra la figura 3 por lo que es probable que exista que la especie tenga presencia de forma cultivada en el estado (CONABIO, 2014, Castillo Espinosa, J. C. 2014).

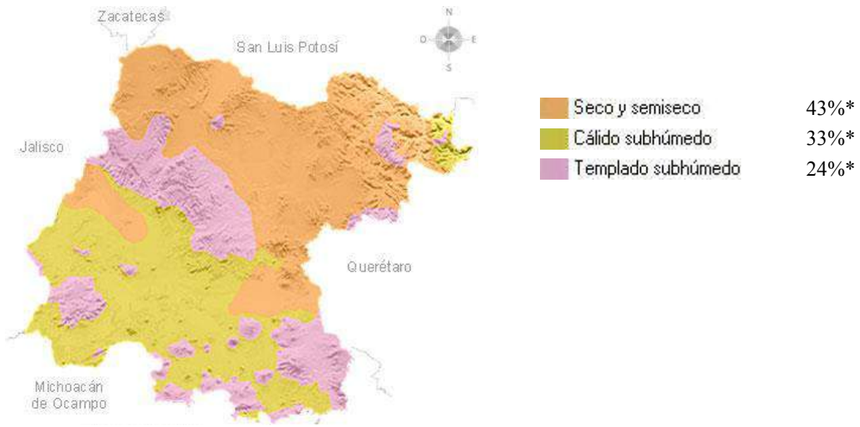


Figura 3. Identificación de micro climas del estado de Guanajuato. *Referido al total de la superficie estatal. Fuente: INEGI.

En México se conocen alrededor de 150 plantas que se han utilizado tradicionalmente para el tratamiento de la diabetes, que incluye a la *Cnidoscolus chayamansa* (chaya), la cual contiene principalmente compuestos fenólicos con efecto hipoglucemiante de la infusión evaluada puede ser atribuido a su contenido de catequina y rutina, los cuales son compuestos reportados en otros estudios *in vivo* (Lima *et al*., 2009; Fernandes *et al*., 2010; Seron y Furlan, 2010; Fuentes *et al*., 2013) como agentes hipoglucemiantes de las hojas de la chaya (Soto, R. V., Rubio). El *Eriobotrya japonica* (níspero) sus hojas son utilizadas en el tratamiento de enfermedades de la piel y diabetes mellitus, ya que contiene principalmente compuestos biológicamente activos como los flavonoides.

Los polifenoles son generalmente subdivididos en taninos hidrolizables, que son ésteres de ácido gálico de glucosa y otros azúcares y fenilpropanoides, como la lignina, flavonoides y taninos condensados Figura 4. Los cuales constituyen un grupo de compuestos que desempeñan una importante función en prácticamente todas las interacciones que una planta establece con su entorno, sus propiedades antioxidantes justifican muchas de sus efectos benéficos.

Los fenoles de (Figura 5), son una amplia familia que posee más de 4.500 miembros. Dentro del grupo de los fenoles están los ácidos fenólicos y la amplia familia de los flavonoides entre otros (Pérez, E. P 2014). Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la polución ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, etc.

Los flavonoides se ubican principalmente en las hojas y en el exterior de las plantas. El organismo humano no puede producir estas sustancias químicas protectoras, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos. Los flavonoides contienen en su estructura se muestra la imagen de la estructura general en la figura 4, química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante. Por ello, desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo, y tienen efectos terapéuticos en un elevado número de patologías, tales como diabetes mellitus. (Martínez-Flórez 2002) La importancia de los fenoles radica en que producen soporte mecánico a las plantas, contribuyen en la coloración de las flores y frutos, protegen contra patógenos y herbívoros y

tienen una gran efectividad protegiendo los tejidos frente a la radiación ultravioleta (Strack, 1997); además, estos compuestos presentan propiedades relacionadas con la salud humana, debido a su actividad antioxidante (Cartaya y Reynaldo, 2001; Kuskoski et al., 2005).

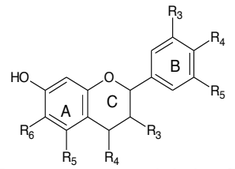


Figura 4. Estructura general de los flavonoides

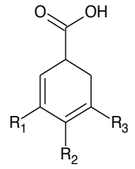


Figura 5. Estructura general de los fenoles

El análisis a realizar de extractos acuosos de dos tipos de chaya y el níspero, será identificar compuestos con capacidad hipoglucemiante, como los polifenoles que ya en investigaciones se han encontrado en estas plantas. Los extractos vegetales son compuestos a base de plantas en este caso la chaya y el níspero de las cuales se extraen compuestos activos mediante varias técnicas como es la maceración e infusión con la ayuda de solventes como agua, etanol, acetona, etc. La concentración y calidad de las sustancias activas depende mucho de la temporada o de la localización. Los compuestos activos se encuentran con mayor frecuencia en hojas, flores y semillas. Comúnmente la extracción de compuestos se hace con agua.

MÉTODOS Y MATERIALES

La técnica de extracción será calentar 3 porciones de 100 mL agua a 30, 60 y 90 °C. Después de 30 min se medirá la absorbancia UV-Vis e Infrarrojo cada 5 min en un espectrofotómetros Lambda 859 marca Perkín Elmer en un intervalo de longitud de onda de 180 a 850 nm con una velocidad de barrida de 0.01. Durante toda la extracción se debe mantener a condiciones isotérmicas.

RESULTADOS

Para esta primera etapa del proyecto se actualiza y concentran los datos que sustenta el control de varias potencialmente que afectarán la naturaleza de la planta, conociendo el estado el arte y además confirmado el origen de estas plantas permitirá tener una información actualizada sobre ellas.

CONCLUSIONES

El clima del estado de Guanajuato ofrece condiciones favorables para el crecimiento y desarrollo de tanto de la Chaya como del Nípero, aun sin ser plantas nativas de la región.

BIBLIOGRAFIA

ALARCÓN FJ, ROMÁN R, FLORES JL. 1993. “Plantas medicinales usadas en el control de la diabetes mellitus”. *Ciencia* 44(3): 363-381.
PRADA BERRIOS FIDEL ANGEL. “Cultivo del níspero”. *Centro nacional de tecnología agropecuaria y forestal. CENTA guía técnica*. La libertad, San Andrés 2003. No 12, pp. 34
FLORES, O. R. R., CENTENO, E. A. T., BETANCO, R. A. V., & VALDIVIA, M. S. N. A. G. Plantas utilizadas para el tratamiento de enfermedades en los animales domésticos, Reserva Natural El Tisey, Estelí.
IBARRA SALAS, M. D. J. (2009). “Efecto hipoglucemiante de tecoma stans y eriobotrya japónica y su relación con la presencia del cromo como factor de tolerancia a la glucosa” (Doctoral dissertation) Universidad Autónoma de Nuevo León).

BARQUERO, A. A. (2007). "Plantas Sanadoras: Pasado, Presente y Futuro". *Revista QuímicaViva*, 6(2).
HERNÁNDEZ GE, AGUILAR CA, AGUILAR S L, ROMÁN RR, CHÁVEZ MAA, GARCÍA VLM, FLORES SJL, ALARCÓN AFJ. 2002. Studies on hypoglycemic activity of Mexican Medicinal Plants. Proc West Pharmacol Soc 45:118-124.
Morales, M. L. C., Díaz, J. M. D., Mora, D. C. M., Pérez, Y. M. M., & Pérez, R. E. V. (2012). Uso de plantas medicinales en el cuidado de la salud por las familias del municipio de San Gil. *Revista Universalud*, *2*.
VALENZUELA SOTO, R. (2014). Compuestos activos con capacidad hipoglucemiante en cnidoscolus chayamansa (chaya), euphorbia prostrata (hierba de la golondrina) y jatropha dioica (sangre de drago).
MARTÍNEZ-FLÓREZ, S., GONZÁLEZ-GALLEGO, J., & CULEBRAS, J. M. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición hospitalaria*, *17*(n06).
PÉREZ, E. P., ETTIENE, G., MARÍN, M., PADRÓN, A. C., SILVA, N., RAGA, J., ... & MEDINA, D. (2014). "Determinación de fenoles y flavonoides totales en hojas de guayabo (Psidium guajava L.)". *Revista de la Facultad de Agronomía*, 31(1).
HURTADO, J. D. C. G., APONTE, G. L., AZAHUANCHE, F. R. P., ÁVALOS, F. R., & RUBIO, Z. M. O. (2015). "Aislamiento y Caracterización Estructural De Los Principios Activos Hipoglucemiantes De Rubus Floribundus Kunth (Rosaceae) Zarzamora". *Arnaldoa*, 22(2), 381-394.
MARLES, R. J. & N. R. FARNSWORTH. 1995. "Antidiabetic plants and their active constituents". Phytomedicine. 2:137-139.
SOTO, R. V., RUBIO, M. E. M., STAR, M. J. V., CÁRDENAS, A. O., PRECIADO-RANGEL, P., GONZÁLEZ, J. A., & ESPARZA-RIVERA, J. R. "Cnidoscolus chayamansa hidropónica orgánica y su capacidad hipoglucemiante, calidad nutraceutica y toxicidad* Cnidoscolus chayamansa organic hydroponic and its hypoglycemic capacity, nutraceutical quality and toxicity". 2014
LÓPEZ LÓPEZ, E. A. (2012). Caracterización Bioquímica Del Níspero (Eriobotrya Japonica): Cinética De La Polifenoloxidasa e Identificación de Compuestos Fenólicos (Doctoral Dissertation).
TRISTÁN, T. Q. Características Morfológica de las Hojas de Chaya (Cnidoscolus Spp) Colectadas En 13 Estados De La Republica.
CASTILLO ESPINOSA, J. C. (2014). *Determinación del efecto vasodilatador de plantas y propóleos utilizados en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares* (Doctoral dissertation).
ROSS-IBARRA, J., & MOLINA-CRUZ, A. (2002). "The ethnobotany of chaya (Cnidoscolus aconitifolius ssp. aconitifolius Breckon): a nutritious maya vegetable". *Economic Botany*, *56*(4), 350-365.
CONABIO, Comisión nacional para el conocimiento de la biodivercidad. "Biodiversidad mexicana". Níspero. Consultada
http://www.biodiversidad.gob.mx/Difusion/cienciaCiudadana/aurbanos/pdf/GuiaArboles_v3.pdf
m=Eriobotrya japónica (fecha de consulta 13-07-2016).

ESTUDIO DE LA FORMACION DE SISTEMAS DE EXTRACCION BIFASICOS EN FUNCIÓN DE ACTIVIDAD DE AGUA, PARA LA EXTRACCION DE ACIDOS DEBILES

Patlán Álvarez Edgar Miguel[1] y Ávila Rodríguez Mario[2]

RESUMEN

El objeto de este trabajo fue obtener información acerca de equilibrios líquido-líquido en curvas de solubilidad formados por polietilenglicol y sal, los sistemas son muy amigables con el ambiente. Estos sistemas, separa dos zonas con base en la curva de solubilidad: sistemas bifásicos y monofásicos. Se obtuvo la solubilidad del polietilenglicol en función de la actividad de agua para estudiar su comportamiento. Se extrajo H_3PO_4 de sistemas formados, así como determinar la cantidad de agua de cada fase. Se usó la regla de Zdanovskii para encontrar medios equivalentes en solución para actividades de agua constante.

ABSTRACT

The purpose of this study was to obtain information about liquid-liquid equilibria solubility curves formed by polyethylene glycol and salt, the systems are very environmentally friendly. These systems, separates two areas based on the solubility curve: biphasic and monophasic systems. The solubility of polyethylene glycol based on the water activity was obtained to study their behavior. H_3PO_4 of systems formed was extracted, also determine the amount of water in each phase. Zdanovskii rule was used to find equivalent means in solution for constant water activities.

Palabras Clave

Polietilenglicol (PEG)
Sistemas acuosos de dos fases (ATPS)

INTRODUCCIÓN

La extracción de ácidos débiles usando ATPS es una herramienta usada para la separación y análisis de especies químicas. Estos ATPS son formados cuando son mezcladas soluciones acuosas de un polímero y una sal por encima de una concentración característica. En este caso espontáneamente se originan dos fases, una rica en polímero y la otra rica en sal. Los sistemas más empleados son los polietilenglicoles con fosfato de potasio [1]. La Figura 1 muestra la formación de ATPS con PEG 1000 y sulfato de sodio.

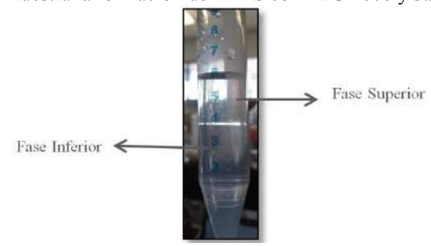


Figura 1. ATPS Polietilenglicol y sulfato de sodio en solución de ácido fosfórico 2 M. Fase Superior rica en PEG; fase inferior rica en sulfato.

[1]Universidad de Guanajuato, División de Ciencias Naturales y Exactas, Noria Alta S/N, Noria Alta, 36050, Guanajuato, Guanajuato, eledis_2@hotmail.com
[2]Universidad de Guanajuato, Departamento de Química, Cerro de la Venada S/N, Pueblito de Rocha, 36040, Guanajuato, Guanajuato, avilam@ugto.mx

Polietilenglicol es un nombre genérico para mezclas por condensación de polímeros de óxido de etileno y agua. Se representa por la fórmula general: $H(OCH_2CH_2)$ OH. Hay una interacción directa entre el tamaño del anión y catión de la sal con el PEG, así como la carga que presentan, para la formación de la curva de solubilidad [2]. En este trabajo se analiza la solubilidad del polietilenglicol como función de la actividad del agua según el porcentaje de sal en fase, como si se tratase de una función que depende de la actividad de agua. Como segunda parte del trabajo se construyeron ATPS para la extracción de ácidos débiles (ácido fosfórico). Se usó la regla de Zdanovskii para el caso de dos o más electrolitos en solución para observar si se obtenía la misma actividad de agua.

MARCO TEORICO.

Los ATPS están siendo utilizados en el área de investigación biológica para la purificación y separación de biomoleculas, organelos celulares y virus en sistemas acuosos de dos fases [3] o algunas veces metales iónicos [4]. Las curvas de solubilidad pueden ser obtenidas por PEG y diferentes tipos de sal [5], el equilibrio que se obtiene para el mismo tipo de PEG difiere del tipo de sal que se esté usando, las diferencias que presentan son debidas a efectos del anión, catión, temperatura y pH [2], los sistemas son obtenidos debido a las propiedades físicas que poseen tanto el PEG como la sal al ser disueltos en agua, al llegar a un punto de equilibrio las fases son separadas, obteniendo una fase superior rica en polímero y la otra fase inferior rica en sal [1]. Los ATPS contienen más del 40 % en peso de agua en cada una de las fases, aunque en sistemas con tan solo 10 % de agua en peso en la fase de menor cantidad de mezcla también es considerado como ATPS [5].

En este trabajo se utliza la actividad de agua (a_w) como parámetro de medida de la concentración de sales. La actividad de agua puede obtenerse experimentalmente por medio de la medida de la presión de vapor del agua que contiene una sal, con respecto a la presión de vapor del agua pura, ambos permaneciendo a la misma temperatura. Su unidad de medida va de 0 a 1. Los valores de actividad de agua de una gran cantidad de soluciones binarias (electroilito /agua), se encuentran reportados en la literatura. En mezclas con más de un electrolito se utiliza la regla de Zdanovskii para tener un medio equivalente en a_w con respecto a una solución binaria. La regla de Zdanovskii indica que al mezclar dos soluciones con la misma actividad de agua, la solución resultante tendrá la misma actividad de agua, siempre y cuando no haya interacciones químicas entre los electrolitos en la mezcla final obtenida.

METODOLOGIA

1. Efecto de la actividad de agua en los ATPS.
Basándose en las curvas binodiales de solubilidad con PEG 1000 en peso molecular y diferentes tipos de sal (Sulfato de Amonio, Sulfato de Sodio, Carbonato de Sodio, Fosfato de Sodio y Sulfato de Magnesio) se busca la actividad de agua para cada una de ellas reportadas por Victor M. M. Lobo [6]. La actividad de agua para una sal está directamente relacionada con la fuerza iónica así como el coeficiente osmótico. Para muchas de las sales no se encuentra reportada directamente la actividad de agua por lo que se calculó de la ecuación 1),

$$\Phi = \frac{-m_s * ln(a_w)}{\sum_i^n \upsilon_i * m_i} \qquad (1)$$

donde Φ es el coeficiente molal osmótico, m_s es la masa molal del solvente, m_i la molalidad del electrolito, υ_i el número de iones en la solución y la cantidad de electrolitos presentes en la solución.

De los datos de la ***Tabla 1*** se obtuvo la molalidad de electrolito analizado, con base a estos datos se calculó mediante interpolación tanto el coeficiente osmótico como la actividad de agua, estos datos se reportan en la ***Tabla 2.***

***Tabla 1 Composición de sistemas sal-PEG 1000. Reportados por Steven M. et al** [7].*

% de Polímero PEG	Porcentaje de Sal en Fase				
	Na_2SO_4	$(NH_4)_2SO_4$	K_3PO_4	Na_2CO_3	$MgSO_4$
40.000	1.550	4.800	3.100	1.250	----
35.000	2.220	5.923	3.800	1.800	3.000
30.000	3.220	7.077	4.700	2.500	3.400
25.000	4.660	8.364	6.020	3.500	4.800
20.000	6.330	10.200	7.800	4.700	6.500
15.000	8.220	12.200	9.900	6.100	8.300
10.000	10.330	15.000	12.700	7.800	11.000
5.000	13.550	18.500	16.700	10.700	14.000

Se utilizó la regla de Zdanosvskii 2) para determinar la actividad de agua de un electrolito diferente en solucion.

$$\sum_i \frac{m_i}{m_i^*} = 1 \quad a \quad a_w = constante \qquad (2)$$

Donde para una concentración molal inicial de electrolito debe cumplirse que la actividad de agua permanesca constante en la mezcla.

2. Extracción de H_3PO_4 como ácido débil en APTS.
Se prepararon soluciones de PEG con peso molecular entre 950-1050 g/mol de la marca Karal, S.A de C.V. de diferentes concentraciones en porcentaje en peso con agua desionizada, y soluciones de Na_2SO_4 con peso molecular de 142.04 g/mol de la marca Karal, S.A de C.V. de diferentes concentraciones en porcentaje en peso con una solución 2 molar de H_3PO_4 con peso molecular de 93.8 g/mol y densidad de 1.69 L/kg, se mezclaron las soluciones según las concentraciones iniciales y se agitaron por 30 minutos para obtener la separación de las fases. En cada una de las fases se cuantificó por titulación la concentración de H_3PO_4 con una solución estándar de NaOH 0.5 molar con titulador automático 798 MPT Titrino (Metrohm). La cantidad de agua presente en cada una de las fases se determinó por el método de Karl-Fischer, con atuda del equipo 701 KF Titrino (Metrohm).

RESULTADOS Y DISCUSION

1. Efecto de la actividad de agua en los ATPS.
A partir de las curvas binodiales de PEG 1000 reportadas por Steven M. et al [7], con diferentes tipos de sal, se obtuvo la concentración molal de cada sal para la misma cantidad de polímero en la fase. Con base en esta concentración se calculó la actividad de agua para cada una de las soluciones acuosas rica en sal.
La Figura 2, muestra el comportamiento de la solubilidad del PEG con diferentes sales en función del porcentaje de la sal, apreciando diferencias que existentes entre las curvas, lo que se analiza es el efecto del anión como del catión.

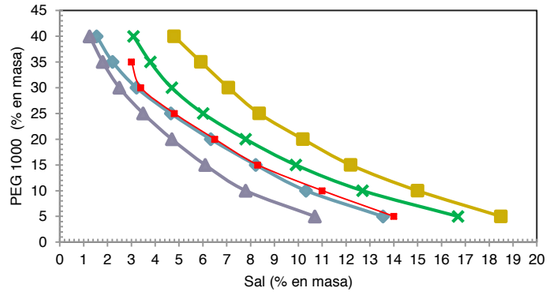


Figura 2. Diagrama de fases PEG 1000 con Na_2SO_4 (—◆—), PEG 1000 con $(NH_4)_2SO_4$ (—■—), PEG 1000 con Na_2CO_3 (—▲—), PEG 1000 con K_3PO_4 (—✕—), PEG 1000 con $MgSO_4$ (—●—).

1.1 Efecto del Catión.
Analizando el catión sodio, se observa que hay una desviación de las curvas formadas por el Na_2SO_4 como por Na_2CO_3 hacia la izquierda, ambas curvas permanecen muy cercana entre ellas, la desviación que hay entre ellas se debe a la influencia del anión que se analizara después. Los cationes presentes en estos diagramas son: Na^+, K^+, Mg^{2+}, $(NH_4)^+$. La diferencia que hay entre ellos es el tamaño del catión hidratado así como su concentración en la solución. Se observa que entre más grande es el catión (amonio) la curva se desplaza hacia la derecha y entre más chico es el catión (sodio) la curva es desplazada hacia la izquierda.

1.2. Efecto del Anión.
El tamaño como la carga del anión también suele influir en la formación de la curva de solubilidad. Se observa que para un mismo anión, la curva se ve modificada por el catión que se encuentra en solución. Comparando el Na_2SO_4 con el Na_2CO_3, observamos que ambas sales tienen en común el catión sodio en la misma proporción, de esta manera la desviación de la curva es debida al anión. Los aniones comparados son SO_4^{2-} y CO_3^{2-} los dos presentan la misma carga, pero la diferencia es su tamaño, entre más chico es el tamaño del anión la curva se desvía hacia la izquierda mientras que si es mayor se desvía hacia la derecha. La ***Tabla. 2*** se presentan los valores de molalidad del electrolito en cada fase así como la actividad de agua correspondiente a dicha concentración. El gráfico de solubilidad de PEG 1000 en función de la actividad de agua para cada uno de los electrolitos se puede ver en la ***Figura 3***.

Tabla 2. Composición de sistemas sal-PEG 1000, molalidad y actividad de agua.

% de Polímero PEG	Molalidad (mol/Kg)					Actividad de agua				
	Na_2SO_4	$(NH_4)_2SO_4$	K_3PO_4	Na_2CO_3	$MgSO_4$	Na_2SO_4	$(NH_4)_2SO_4$	K_3PO_4	Na_2CO_3	$MgSO_4$
40.000	0.187	0.659	0.257	0.199	----	0.9924	0.9767	0.9877	0.9916	----
35.000	0.249	0.760	0.293	0.266	0.402	0.9901	0.9735	0.9860	0.9889	0.9924
30.000	0.340	0.852	0.340	0.346	0.424	0.9869	0.9706	0.9839	0.9859	0.9920
25.000	0.467	0.951	0.412	0.457	0.568	0.9826	0.9675	0.9807	0.9817	0.9894
20.000	0.605	1.107	0.510	0.583	0.735	0.9780	0.9627	0.9762	0.9773	0.9869
15.000	0.754	1.270	0.622	0.723	0.900	0.9734	0.9577	0.9711	0.9726	0.9832
10.000	0.913	1.515	0.775	0.887	1.157	0.9685	0.9501	0.9642	0.9671	0.9777
5.000	1.172	1.832	1.006	1.186	1.437	0.9606	0.9402	----	0.9572	0.9708

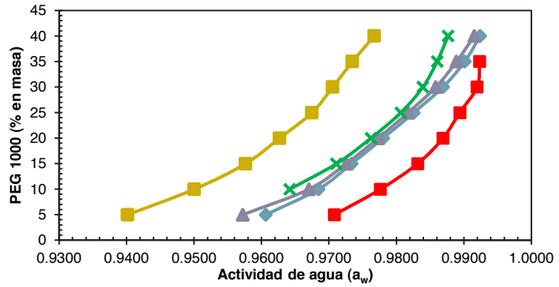


Figura 4. Diagrama de fases en actividad de agua de en sal de; PEG 1000 con Na_2SO_4 (—◆—), PEG 1000 con $(NH_4)_2SO_4$ (—■—), PEG 1000 con Na_2CO_3 (—▲—), PEG 1000 con K_3PO_4 (—✕—), PEG 1000 con $MgSO_4$ (—●—).

Se debe diferenciar que la región por arriba de la curva corresponde a dos fases y la inferior a sistema monofásico. Para un mismo tipo de catión las curvas se mantienen muy cercanas, es poco el efecto ejercido por el anión. Esto se puede ver al hacer una comparación por la curva descrita con Na_2SO_4 y Na_2CO_3 ambas curvas son muy cercanas. Las curvas aparecen según el tamaño del catión, iniciando por izquierda el $(NH_4)^+$, K^+, Na^+, Mg^{2+}, se mantiene el comportamiento según el tamaño del catión. El Magnesio esta desplazado hacia la derecha por tener mayor carga y tamaño. En el caso del anión es poco el efecto que se tiene en el desplazamiento por lo que la dependencia es debida al catión.

Con la regla de Zdanosvskii, se buscaba encontrar medios equivalentes en actividad de agua, es decir que para la misma actividad de agua se obtenga la misma solubilidad de PEG 1000. Se puede observar en la Figura 3 que este efecto se presenta en el caso de las sales de Na_2SO_4, Na_2CO_3 y K_3PO_4 en donde las curvas de solubilidad soy muy similares. En tanto que en el caso de las sales Mg_2SO_4 y $(NH_4)_2SO_4$, no se observa el mismo comportamiento, ya que para una misma actividad de agua la molalidad obtenida del otro electrolito correspondía para una cantidad diferente de molalidad. Esto es para la solubilidad de PEG 1000, 15% en peso se requiere una concentración 0.754 molal de Na_2SO_4 el cual tiene una actividad de agua igual a 0.9734, para la misma actividad de agua, la concentración molal de $(NH_4)_2SO_4$ es de 0.9899 mol/kg, el cual corresponde para una solubilidad de 35% de PEG 1000 por lo que no corresponden las cantidades de polímero para solubilizar. Esta de diferencia de comportamiento puede ser debida a que existen interacciones diferentes entre el PEG y las sales y no solamente entre el PEG y el H_2O.

2. Extracción de H_3PO_4 como ácido débil en APTS.
Los resultados que se obtuvieron de las fases en solución acuosa se pueden apreciar en la ***Tabla 3***, en la cual se diferencia FS y FI, fase superior y fase inferior respectivamente. En la 3ra y 4ta columna son colocados los valores iniciales en gramos de la cantidad de PEG 1000 y Na_2SO_4 que hay presente en las dos fases. De la ***Tabla 3*** se puede observar que en efecto, la extracción de ácido fosfórico es llevada a cabo de forma satisfactoria obteniendo aproximadamente el mismo porcentaje en masa de ácido fosfórico en cada una de las fases, el porcentaje de agua en las fases es más del 40 % como bien sabíamos, la cuantificación de polímero y sulfato nos ayudaría a construir una curva de solubilidad de PEG en presencia de ácido fosfórico.

Tabla 3. Cuantificación de H_3PO_4 y H_2O en cada una de las fases formadas.

Fase	Volumen de fase (mL)	PEG 1000 inicial (g)	Na_2SO_4 inicial (g)	Densidad (g/mL)	Fase total (g)	H_3PO_4 (g)	$[H_3PO_4]$ (mol/L)	Agua (g)	% H_3PO_4 En masa (w/w)	% Agua En masa (w/w)
TP	0.4000	0.4776	1.576	1.1266	0.4506	0.0557	1.4203	0.2601	12.3547	57.7105
BP	6.9000			1.3020	8.9838	1.0383	1.5356	6.2437	11.5580	69.4995

TP	1.0000	0.8582	1.3366	1.2100	1.2100	0.1400	1.4283	0.7478	11.5679	61.7975
BP	4.2000			1.2966	5.4457	0.6172	1.4995	3.6801	11.3339	67.5780
TP	1.5000	1.1346	1.1859	1.2050	1.8075	0.2003	1.3628	1.1508	11.0831	63.6653
BP	6.0000			1.2563	7.5378	0.8822	1.5003	5.3360	11.7034	70.7899
TP	3.0000	1.2908	1.2862	1.1966	3.5898	0.3322	1.1300	2.0050	9.2544	55.8527
BP	5.0000			1.2453	6.2265	0.7441	1.5186	4.4647	11.9504	71.7043

FS: Fase Superior, **FI:** Fase Inferior. La 3ra y 4ta columna corresponden a la masa en gramos iniciales distribuidos en ambas fases de PEG 1000 y Na_2SO_4 respectivamente.

Se observa que la cantidad de PEG y sulfatos se ve disminuido en cada una de las fases por el porcentaje de ácido ocupado en estas fases. La formación de las fases es obtenida en proporciones diferentes de las soluciones colocadas inicialmente ya que el equilibrio químico que se obtiene es debido a las interacciones que se desconocen entre los componentes presentes en la mezcla, los cuales alcanzan un equilibrio con base en su concentración..

CONCLUSIONES

Los ATPS son una herramienta muy utilizada para la extracción de biomoleculas, permite una obtención de una curva de solubilidad en el presente trabajo los ATPS fueron de ayuda analizar la extracción de ácido fosfórico de estos sistemas en el cual se observó que hay una disminución de cantidad de polímero y sulfato en cada fase por la cantidad de ácido presente en la fase remplazando la cantidad de sal, la cantidad de agua en la fase permanece aproximadamente en la misma proporción por arriba del 40 % en cada fase, la curva de solubilidad.

Se analizó la influencia de la actividad de agua en la formación de ATPS, en el cual el efecto del anión tiene poco efecto sobre el desplazamiento de la curva comparado al efecto que presenta el catión, por lo que se concluye que el catión tiene más efecto sobre la formación de los ATPS. Por la regla de Zdanosvskii se comprobó que no se tienen medios equivalentes en ATPS ya que sistemas similares presentan diferente valor de actividad de agua. Son sistemas muy amigables con el ambiente.

BIBLIOGRAFIA

Artículos de revistas

[1] MG Bertoluzzo- SM Bertoluzzo- Rubén Rigatuso- G. Picó. (2005). CARACTERIZACION DEL EQUILIBRIO LIQUIDO- LIQUIDO EN SISTEMAS BIFASICOS ACUOSOS. 303-ANALES AFA, 17, 321-324.
[2] Thomas Reschke, Christoph Brandenbusch, Gabriele Sadowski. (12/febrero/2014). Modeling aqueous two-phase systems: I. Polyethylene glycol andinorganic salts as ATPS former. Elsevier, 368, 91-103.
[3] Walter, H., Brooks, D.E., Fisher, D., 1985. Partitioning in Aqueous Two-phase Systems: Theory, Methods, Uses and Applications in Biotechnology. Academic Press, Orlando.
Albertsson, P.A., 1986. Partition of Cell Particles and Macromolecules, 3rd Edition. Wiley, New York.
Zaslavsky, B.Y., 1995. Aqueous Two-phase Partitioning. Marcel Dekker, New York.
[4] L. Bulgariu, D. Bulgariu, Sep. Purif. Technol. 80 (2011) 620–625.
[5] M.-K. Ahahbazinasab. F Rahimpour, J. Chem. Eng. Data 57 (2012) 1867-1874
[6] Victor M. M. Lobo. (1989). Handbook of electrolyte solutions. Universidad de California: Elsevier
[7] Steven M. Snyder, Kenneth D. Cole,' and Davld C. Szlag. (1992). Phase Compositions, Viscosities, and Densities for Aqueous Two-Phase Systems Composed of Polyethylene Glycol and Various Salts at 25 O C. J. Chem. Eng., 37, 268-274.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Guanajuato, por formar parte de los veranos de investigación de la región centro y a las corporaciones e instituciones que hacen posible este tipo de actividades. Por los recursos que brindaron para que este trabajo pudiera ser posible. Muy en especial a la Q. Lupita Falcon Millan, investigadora en sistemas de extracción bifásico por asesorarme directamente sobre la construcción de los diagramas por su apoyo, dedicación y motivación.

CARACTERIZACIÓN DEL COMPLEJO Hst1-Sum1 COMO FACTOR DE VIRULENCIA EN CANDIDA GLABRATA

Juan Pablo Porras Estala[1] y Alejandro de las Peñas Nava[2]

RESUMEN

En *Cándida glabrata*, la sirtuina Hst1 controla la expresión un amplio número de genes. Esta sirtuina se puede inactivar durante la infección. Se sabe que la supresión de Hst1 disminuye la susceptibilidad de *Cándida glabrata* al fluconazol. El factor de transcripción Pdr1 y el transportador ABC cdr1 (bombas de flujo de fármacos) le proporcionan resistencia a fluconazol. El Hst1 se une al Sum1, formando un complejo que regula negativamente Pdr1 y cdr1. Como en Cándida glabrata no se ha caracterizado muy bien este complejo nosotros realizamos unas cepas con el SUM1 de L. Klayveri para observar si se puede formar este complejo y poder caracterizar este complejo.

Palabras clave: Susceptibilidad, resistencia a fluconazol, Complejo Sum1-Hst1, *C. glabrata*, bombas de flujos de fármacos

ABSTRACT

In *Cándida glabrata*, the sirtuin HSt1 control the expression of a wide number of genes. This sirtuin can be inactivated during infection, This sirtuin can inactivate during infection. It is known that deletion of Hst1 decreases susceptibility of *Candida glabrata* fluconazole. The transcription factor cdr1 Pdr1 and ABC transporter cdr1 (drug efflux pumps) will provide resistance to fluconazole. The joins Hst1-Sum1, forming a complex that negatively regulates Pdr1 and cdr1. In Candida glabrata, has not been well characterized this complex we performed some strains of L. SUM1 with Klayveri to see if they can form this complex and to characterize this complex.

Keywords: Susceptibility, resistance to fluconazole, Sum1-Hst1 Complex, *C.glabrata*, drug efflux pumps

INTRODUCCIÓN

La *Cándida glabrata* es un patógeno oportunista en pacientes inmunocomprometidos. En las últimas tres décadas, *C. glabrata* se ha convertido en el segundo agente causal más frecuente en infecciones orofaringeas, infecciones del tracto urinario y de infecciones fúngicas del torrente sanguíneo (Richardson y Lass-Florl, 2008). Los cambios en el programa de transcripción son una importante estrategia de *C. glabrata* a adaptarse a entornos hostiles. Por ejemplo, *C. glabrata* induce las bombas de flujo de fármacos que abarcan la membrana en presencia de fluconazol, que se asocia a la resistencia a múltiples fármacos. La respuesta a los estímulos del medio ambiente es esencial no sólo para asegurar la supervivencia de *C. glabrata* dentro del huésped, sino también para detectar condiciones que favorecen la infección (Domergue *et al*., 2005; Orta-Zavalza *et al*, 2013). En C. glabrata, el complejo Sir (Sir2, Sir3 y Sir4) es esencial para el silenciamiento subtelomérico (De Las Penas et al., 2003). Según Orta-Zavalza el componente enzimático

[1] Instituto Tecnológico Superior de Purísima del Rincón, Ing. Bioquímica. Blvd. del Valle # 2301 Guardarrayas, C.P: 36413, Purísima del Rincón, Guanajuato, juanabloporrasestala@hotmail.com
[2] Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, División de Biología Molecular, Camino a la Presa San José # 2055, Lomas 4ª. Sección, C.P: 78216, San Luis Potosí, San Luis Potosí, cano@ipicyt.edu.mx

del complejo Sir es Sir2, una histona deacetilasa que utiliza NAD + como cofactor para mantener la cromatina reprimida transcripcionalmente. Las sirtuinas son una familia de NAD + dependientes de proteínas desacetilasas presentes en todos los organismos. *C. glabrata* contiene cinco genes sirtuinas que incluyen SIR2 y cuatro homólogos de SIR2 llamados HST1 - HST4. HST1 es el parálogo más cercano de SIR2 y ambos están implicados en la represión transcripcional, pero, estas proteínas no superponen funciones (Orta-Zavalza *et al,* 2013). La mayoría de los genes inducidos transcripcionalmente por la limitación de la niacina son regulados por Hst1 (Ma *et al*., 2009). El Hst1 controla la transcripción de genes que codifican para transportadores de niacina de alta afinidad (TNA1, TNR1 y TNR2) obligados a mantener NAD + para la homeostasis en *C. glabrata*. Cuando C. glabrata tiene deficienciade niacina el Hst1pierde su actividad (Orta-Zavalza *et al,* 2013). En *S. cerevisiae,* Hst1 también actúa como un sensor que regula los niveles de NAD +, pero principalmente en regular la biosíntesis de NAD + (Bedalov et al., 2003).

Hablando de *S. cerevisiae*, los genes intermedios de la meiosis son reprimidos durante el crecimiento vegetativo y en las primeras etapas meióticas por el Sum1p, que se une al elemento de esporulación intermedia (MSE), el MSE está presente en todos los genes intermedios, (Pierkarsa *et al,* 2010; Xie et al., 1999). El Sum1p recluta el NAD+ dependiente de la histona deacetilasa y al Hst1, por lo tanto promueve una estructura que inactiva la cromatina, impidiendo la transcripción (Xie *et al.,* 1999). La interacción entre Sum1p y Hst1p depende de Rfm1p que es esencial para represión Sum1p mediada (McCord *et al.,* 2003). Este complejo regula el gen NDT80 que es el regulador de la expresión de los genes intermedios El complejo Hst1-Sum1 en *C. glabrata* se conoce que se encarga de regular negativamente la expresión de bombas de flujo de fármacos.

MARCO TEÓRICO

Transportadores ABC

Los transportadores ABC se encuentran en todas las células de todos los organismos, por lo regular en la membrana plasmática, pero también en las membranas de los orgánulos. Su función es la de transportar sustancias a través de la membrana (D. Cannon *et al*, 2009). Algunas proteínas ABC transportan algo específico, mientras que otras, en particular de mamífero P-gp, es el responsable de la resistencia de las células cancerosas a los agentes quimioterapéuticos, también ha evolucionado ampliamente y específicamente para los compuestos hidrofóbicos, incluidos los medicamentos, que generalmente se conoce como resistencia a múltiples fármacos (MDR) (Cannon *et al*, 2009). Las proteínas ABC en *S. cerevisiae* se han clasificado en tres subfamilias principales, la resistencia a los medicamentos pleiotrópicos (PDR), resistentes a múltiples fármacos (MDR), y la resistencia a múltiples fármacos asociada a proteínas (MRP). La subfamilia de proteínas ABC fúngicas asocia más frecuentemente con resistencia a los fármacos antifúngicos es el grupo PDR de los transportadores, con el arquetipo siendo el Pdr5 en *S. cerevisiae* (Cannon *et al*, 2009).

La resistencia de *C. glabrata* a los fármacos mediante su expulsión

La resistencia a azoles en C. glabrata en aislamientos clínicos se asocia con una mayor expresión de bombas de flujo de drogas, en este caso, CgCdr1p y CgCdr2p. Esta sobreexpresión le confiere resistencia a los azoles antifúngicos pero su eliminación hace susceptible a la célula a los azoles. Estas bombas de flujo de fármacos requieren la fosforilación de proteínas para expulsar los xenobíticos de la célula (Cannon *et al*, 2009).

MATERIALES Y METODOLOGÍA

Extracción de plásmido por miniprep

Se realizó un cultivo de *E. coli* que contenía nuestro plásmido pVF31 (el cual está integrado por región promotora de *C. glabrata* el SUM1 de L. Klayveri, el terminador de *C. glabrata*, el cassette URA3 y βla) para posteriormente extraer 2.5 mL del cultivo LB y ponerlo en un tubo eppendorf y se agregaron 100 µL de buffer de lisis y se centrifugó por un minuto (el buffer de lisis rompe las células y degrada el ADN). Posteriormente agregamos 350 µL de buffer neutralizador, se centrifugó 1 minuto (para neutralización del buffer de lisis). Después agregamos 200 µL de endo-wash buffer y se centrifugó por 15 segundos. Se agregó 400 µL de zyppy wash buffer y se centrifugó por 30 segundos y se tranfirió la columna a una limpia. Posteriormente se adicionó buffer Tris 10 mM y se centrifugó a 13.2 rpp durante 1 minuto para eluir la membrana (eluir es el proceso en el cual el Tris 10 mM limpia la membrana).

Electroforesis de ADN plasmídico

Se preparó un gel de agarosa al 0.8%, se cargó el marcador de peso molecular y las muestras de plásmido con azul de bromofenol (buffer de carga) dentro de la cámara de electroforesis a 110 volts durante 30 minutos. Posteriormente el gel se reveló en el fotodocumentador y se tomó evidencia de la imagen. Una vez comprobada la presencia de ADN plasmídico, se realizó un cálculo con base de 10 unidades por cada 1µg de ADN (Enz.-1µL, y Buffer 10X-5µL para 50µL) en 30 µL para cada una de las muestras. Para la digestión de diagnóstico, se utilizó BamH1/Sal1 y Stu1 (son 3 muestras y se puso en 3 columnas) y se hizó otra reacción de digestión para linealizar (cortar) con Pac1 y nuevamente otra electroforesis para comprobar si se obtuvo ADN del tamaño deseado.

Transformación en levadura usando DMSO

Una vez extraído el nuestro plásmido, inoculamos en 5 mL de medio YPD (tubos de vidrio grande) las cepas a transformar, se tomaron con un palillo estéril contenidas en glicerol (agitar en vortex a baja potencia) y se incubaron a 28°C, con agitación toda la noche (12 horas aproximadamente). Se incluyó un control sin inoculo. Posteriormente se inoculó 30 mL de YPD con 300 µL del inóculo de 12 horas, y se agitó a 28°C, hasta que alcance una OD (Densidad Óptica, tarda aproximadamente 3 horas) de 0.6-1.0. Para tomar la densidad óptica se diluyó la muestra: con 500 µL de inoculo y 500 µL de YPD y leyó a 600 nm. Posteriormente se transfirió la muestra a tubos falcon y centrifugamos a 3500 rpm por 5 minutos y desechó el sobrenadante. Después se lavó adicionando 25 mL de agua estéril, centrifugamos a 3500 rpm por 5 min y desechamos el sobrenadante. Además adicionamos 1 mL de LiOAc 100mM (0.1M) (fresco, diluido de un stock 1M) para resuspender la pastilla; agitamos en vortex (se le adiciona LiOAc a 0.1M para preparar a la célula para una mayor concentración de LiOAc 1M) y transferimos a tubos eppendorf. Después centrifugamos por 30 segundos; desechamos el sobrenadante. Resuspendemos en 300µL de LiOAc 100mM (0.1M) con la ayuda del vortex y transferimos 50µL en cada tubo ependorf (1 tubo por cada ADN más 1 control sin ADN) y adicionamos la mezcla de transformación a cada tubo (en orden exacto).

Al control añadirle TE, en lugar de ADN plasmídico.

- 240µL PEG 50% (PM 4000) (aumenta la eficiencia de la trasformación).
- 36µL LiOAc 1M (permeabiliza a la célula).
- 25µL ssADN 2mg/mL (ADN de esperma de salmón de cadena simple, precalentado a 100°C por 5min y pasarlo en hielo y sirve para aumentar la tasa de éxito de la trasformación, debido a que no se degrade nuestro ADN por las DNAsas)
- 50µL ADN plasmídico (3µL de plásmido más 47 de TE 10/0.1)

Posteriormente se agitó en vortex hasta que se mezclar bien y se incubó a 28°C por 45 minutos. Después se adicionó 43µL de DMSO a cada tubo (agitar un poco en vortex, esto incrementa la eficiencia de transformación). A continuación sometió a choque térmico en un bloque de 42°C por 15 minutos y centrifugamos por 30 segundos para quitar el PEG y se desechó el sobrenadante. Enseguida añadimos 600 µL de agua estéril y se resuspendió pipeteando. Posteriormente se colocó 300 µL dentro de una caje petri con perlas de vidrio y lo dejó incubar a 30°C por 2 días. Se incuba con tres tipos de medios de cultivo, YPD (medio rico), CAA (Sin uracilo), 5-FOA (Ácido 5-fluororotico. Orotidina 5-Fosfato descarboxilasa del URA3 que cataliza la sexta etapa enzimática en la biosíntesis de novo de las pirimidinas, la conversión de Orotidina 5-Fosfato descarboxilasa en monofosfato de uridina; convierte 5-FOA en 5-fluorouracilo, que es un compuesto tóxico).

Extracción de ADN genómico

Después de 2 días, se inoculó con 5 mL de medio liquido YPD en tubos de vidrio grandes con las cepas transformantes e incubamos a 30°C toda la noche. Después se colectaron las células 3 veces en tubos eppendorf de 2 mL y se centrifugó a 13,000 rpm por un minuto, se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 500 µl de buffer A, con ayuda del vortex. Posteriormente añadimos 500 µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamilico 25:24:1, mezclamos e incubamos en un bloque a 42°C por 15 min. Se colocó en el Fast Prep por 1 segundo para después centrifugar por 10 minutos a 13,000 rpm. Se formaron 3 fases, pero solo se tomó la fase acuosa y se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 mL y agregó 15 µL de NaCl 5 M y 1 mL de etanol al 100% y se mezcló suavemente hasta que se observó el ADN formando un pellet. Una vez esto, centrifugamos a 13,000 rpm por 1 min, se desechó el sobrenadante. Después lavó el pellet con etanol al 70% y centrifugamos a 13,000 rpm por 1 min, se desechó el sobrenadante; secamos las pastillas en mechero por dos min y adicionamos 250 µL de tris 10 mM más 0.3 de coctel de RNasas. Después incubamos en un bloque a 37°C por 30 min. Este se hizo para 15 muestras. Para comprobar de qué se extrajo el ADN genómico realizamos una electroforesis con gel de agarosa al 0.8%, y después tomamos una foto con el fotodocumentador para interpretar los resultados.

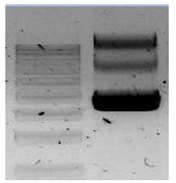
PCR de diagnostico

Una vez extraído nuestro ADN genómico, se realizó un PCR de diagnóstico en el que preparamos un coctel para 15 muestras. El coctel contuvo dos oligonucleótidos, el foward (34 µL) y el reverse (34 µL), el amplificador (5.1 µL), DNTP (17 µL), buffer (34 µL), Mg (17 µL) y agua (147.9 µL). Después a cada muestra se agregó 20 µL del mix. Se realizaron 2 PCR con dos pares de oligonucleótidos para cada PCR (496+1017, 13+499). Después del PCR se realizó una electroforesis para comprobar si se integró pvf31 a la cepa SUM1 Δ debido a que se esperaron encontrar fragmentos de 1878 pares de bases y 2048 pares de bases.

Evento de recombinación

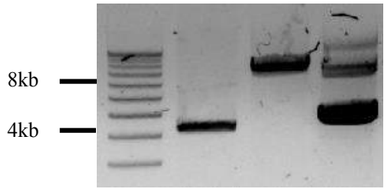
Una vez comprobado la integración de nuestro plásmido a nuestra cepa; se dejó crecer una de estas cepas durante 3 día en medio YPD fresco durante 12 horas para favorecer la recombinación homóloga. Posteriormente se seleccionaron las cepas recombinantes CAA y 5-FOA.

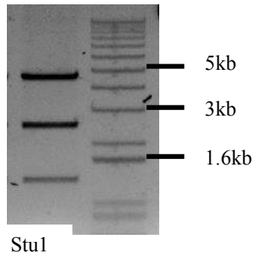
RESULTADOS



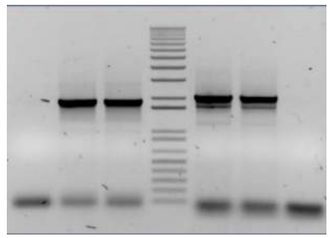
Para comprobar la extracción de ADN plasmídico a través de electroforesis, positivamente mostró la primera banda de la imagen tomada por el fotodocumentador, ya que, el ADN al ser muy grande ya no puede desplazarse hasta la parte de abajo, solo lo hace los pequeños fragmentos.

Cuando se hizo la digestión de diagnóstico y para linealizar, se realizó una electroforesis con las muestras ya digeridas y se observó que para la digestión de diagnóstico con BamH1/Sal1 y Stu1 se mostró un fragmento de 4328 y 4350 pares de bases para BamH1/Sal1, en esta prueba no se aprecia los dos fragmentos debido a que tiene un tamaño parecido, para Stu1 fragmentos de 1359, 2577 y 4740 pares de bases y para la digestión para linealizar con Pac1 nos dio un fragmento de 8676 pares de bases. Por los resultados obtenidos en la prueba de electroforesis, obtuvimos resultados positivos.





Después de transformar cepas y las dejamos crecer en medios YPD, CAA y 5-FOA, para observar si se habían transformado con éxito, el cual debería de crecer en YPD, en CAA si por el cassette URA3 y no en el 5-FOA.



Después de la extracción de ADN genómico de las cepas transformadas, se realizó un PCR de diagnóstico en el que se esperaron fragmentos de 1878 y 2048 pares de bases y por el resultado de la electroforesis se dedujo que se integró el plásmido a la cepa. Se realizó para 2 muestras.

Una vez comprobada la presencia de las cepas transformadas, inocularon durante 3 días en medio YPD fresco durante 12 horas para favorecer la recombinación homóloga. Posteriormente se seleccionaron las cepas recombinantes en YPD, CAA, 5-FOA; se esperó que decrecieran en YPD, no en CAA por la pérdida del cassette URA3 y si en 5-FOA también por la pérdida del URA3. Sin embargo, el crecimiento se dio en medio YPD, en CAA y no en el 5-FOA, por lo tanto no hubo recombinación.

CONCLUSIONES

El resultado obtenido se debe a que como el sitio donde se lleva cabo la recombinación se encuentra en la región subtelomérica, lo cual es más complejo debido a que el ADN de esa región se encuentra más condensado por lo que resulta más complicado el proceso de recombinación.

BIBLIOGRAFÍA

Richardson, M., and Lass-Florl, C. (2008). "Changing epidemiology of systemic fungal infections" Clin Microbiol Infect, No. 14, pp. 5–24. Consultada en http://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X(14)61613-X/fulltext#cesec50 (Fecha de consulta 02-08-2016)

Domergue, R., Castano, I., De Las Penas, A., Zupancic, M., Lockatell, V., Hebel, J.R., *et al.* (2005). "Nicotinic acid limitation regulates silencing of Candida adhesins during UTI" Science, No. 308, pp. 866–870. Consultada en http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15774723 (Fecha de consulta 02-08-2016)

Ma, B., Pan, S.J., Domergue, R., Rigby, T., Whiteway, M., Johnson, D., y Cormack, B.P. (2009). "High affinity transporters for NAD+ precursors in Candida glabrata are regulated by Hst1 and induced in response to niacin limitation" Mol Cell Biol, No. 29, pp. 4067–4079. Consultada en http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19451228 (Fecha de consulta 02-08-2016)

Bedalov, A., Hirao, M., Posakony, J., Nelson, M., y Simon, J.A. (2003). "NAD+-dependent deacetylase Hst1p controls biosynthesis and cellular NAD+ levels in Saccharomyces cerevisiae" Mol Cell Biol, No. 23, pp. 7044–7054. Consultada en http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12972620 (Fecha de consulta 02-08-2016)

De Las Penas, A., Pan, S.J., Castano, I., Alder, J., Cregg, R., y Cormack, B.P. (2003). "Virulence-related surface glycoproteins in the yeast pathogen Candida glabrata are encoded in subtelomeric clusters and subject to RAP1- and SIR-dependent transcriptional silencing" Genes Dev, No. 17, pp. 2245–2258. Consultado en http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC196462/ (Fecha de consulta 02-08-2016)

Orta-Zavalza, E., Guerrero-Serrano, G., Gutiérrez-Escobedo, G., *et al.* (2013). "Local silencing controls the oxidative stress response and the multidrug resistance in Candida glabrata" Mol Microbiol, No 6, pp. 1135-48 Consultado en http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23651300 (Fecha de consulta 02-08-2016)

McCord, R., Pierce, M., Xie, J., Wonkatal, S., Mickel, C., y Vershon, A.K. (2003). "Rfm1, a novel tethering factor required to recruit the Hst1 histone deacetylase for repression of middle sporulation genes" Mol Cell Biol, No 23, pp. 2009–16. Consultado en http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12612074 (Fecha de consulta 06-08-2016)

Xie, J., Pierce, M., Gailus-Durner, V., Wagner, M., Winter, E., y Vershon, A.K. (1999) "Sum1 and Hst1 repress middle sporulation-specific gene expression during mitosis in Saccharomyces cerevisiae" EMBO J., No. 18, pp. 6448–54. Consultado en http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10562556 (Fecha de consulta 06-08-2016)

Cannon, R.D., Lamping, E., Holmes, A.R., Niimi. K., Baret, P.V., Keniya, M.V., Tanabe, K., Niimi, M., Goffeau, A., y Monk, B.C. (2009). "Efflux-mediated antifungal drug resistance" Clin Microbiol Rev., No. 2, pp. 291-321. Consultado en http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19366916 (Fecha de consulta 06-08-2016)

Piekarska, I., Rytka, J., y Rempola, B. (2010). "Regulation of sporulation in the yeast Saccharomyces cerevisiae" Acta Biochim Pol., No. 3, pp. 241-50. Consultado en http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20842291 (Fecha de consulta 06-08-2016)

SÍNTESIS DEL DERIVADO DE DAPSONA APARTIR DEL AMINOÁCIDO NO ESENCIAL *L*-METIONINA POR REACCIÓN DE *N*-ACILACIÓN

Xavier Porras Regalado[1] y José García Elías[2]

RESUMEN

El presente trabajo es de carácter experimental para desarrolló la síntesis de derivados de dapsona, para la búsqueda de un posible fármaco que presente un aumento de efectividad o solubilidad en medio acuoso en comparación a la molécula base dapsona así como a otros derivados reportados en la literatura contra afecciones como la lepra, acné, tuberculosis, etc. Como resultado se obtuvieron cristales de tonalidad amarilla los cuales fueron separados por la técnica de filtración y posteriormente se realizó la determinación del punto de fusión de los mismos.

ABSTRACT

This study is with experimental character in development synthesis modified dapsone, for finding a drug either to be present increased effectiveness or solubility in aqueous medium compared to the base molecule dapsone as well as other derivatives reported in the literature against diseases such as leprosy, acne, tuberculosis, etc. As a result yellow crystals which were separated by filtration technique is the determination of the melting point thereof was performed were obtained.

Palabras Clave: Dapsona, aminoácido, *N*-acilación, solubilidad.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de la química en el último siglo ha generado innumerable conocimiento en todos los campos de aplicación. Sin embargo, con toda esta evolución aún hay afecciones sin cura por la falta de medicamentos efectivos o bien por la mutación del agente patógeno. Un ejemplo de ello es la lepra, que año con año pese a los esfuerzos para su eliminación sigue causando muertes alrededor del mundo, aun cuando se conoce desde tiempos inmemoriales.

La lepra es una enfermedad endémica en numerosos países tropicales producida por el *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) afectando principalmente a los humanos.

La molécula de dapsona, también conocida como 4,4´-diaminodifenilsulfona (DDS), fue uno de los primeros tratamientos introducido al mercado a finales de 1940 contra la lepra. Pertenece a la familia de las sulfonas y exhibe una gran actividad bactericida, sin embargo, DDS presenta una toxicidad alta debido a los procesos metabólicos que presenta (Figura 1).

[1] Universidad Autónoma de Zacatecas, Unidad Académica Ciencias Químicas, Programa de Lic. en Ingeniería Química; Campus siglo XXI ,Carretera Zacatecas-Guadalajara Km 6, ejido la escondida, C.P:98160 , Zacatecas, Zacatecas, m_ochoa_xavier@hotmail.com

[2] Universidad Autónoma de Zacatecas, Unidad Académica Ciencias Químicas, Programa de Lic. en Ingeniería Química; Laboratorio de Síntesis Asimétrica y Bioenergética, Campus siglo XXI, Carretera Zacatecas-Guadalajara Km 6, Ejido la escondida, C.P:98160 , Zacatecas, Zacatecas, garciaelias_jose@uaz.edu.mx

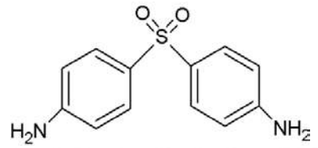


Figura 1. 4,4'- Diaminodifenilsulfona (DDS)

En diversas investigaciones experimentales, se probaron diferentes sulfonamidas análogas químicamente a DDS y se observó, que al sustituir uno de los dos grupos amino por un grupo nitro, acetilo, hidroxi o hidroxilamina otorgaba una mayor solubilidad en agua. Por otro lado, los análogos mostraron en la mayoría de los casos una disminución considerable en la actividad anti-lepra. Mientras que al sustituir ambos grupos amino por algún otro grupo se obtenía una molécula inactiva debido a modificaciones en la afinidad y características del enlace.

Debido a lo anterior, en años recientes se ha prescrito tratamiento de medicamentos que se basan en la combinación de rifampicina, clofazimina y *N*-dapsona; donde la rifampicina es de las mejores contra la cepa de *M. leprae*. No obstante, por su alta complejidad química no se han sintetizado análogos de rifampicina, por lo que la búsqueda de un mejor fármaco para esta enfermedad solo se centra en drogas menos complejas como la DDS.

Debido a esto, se tiene como objetivo sintetizar una estructura modificada químicamente de dapsona con el aminoácido *L*-metionina, mediante una reacción de *N*-acilación empleando un método convencional. Y a su vez teniendo como objetivos específicos: Utilizar un grupo protector *N*-Boc en el aminoácido *L*-metionina para generar quimioselectividad en las reacciones subsecuentes, además de generar el anhídrido mixto del aminoácido como precursores para la obtención de productos de reacción y por ultimo sintetizar el análogo correspondiente a la *L*-metionina con dapsona, purificando los crudos de reacción obtenidos por medio de filtración.

MARCO TEORICO

Los efectos vistos en el mecanismo de acción de la dapsona son del tipo bacteriostático. ya que las sulfonamidas son análogos estructurales al ácido *para*-aminobenzoico (PABA) e inhiben a la enzima dihidropteroato sintetasa presente en la bacteria, lo que origina la incorporación del ácido *para*-aminobenzoico (PABA) en el ácido dihidropteroico, evitando la biosíntesis del ácido fólico necesario para el crecimiento bacteriano.

La molecula de dapsona se encuentra dentro de la familia de las sulfonas y es uno de los tratamientos más utilizados contra la lepra lo anterior debido a su efecto antibacteriano y el de su actividad bacteriostática sobre diversas microbacterias, en especial al *M. Leprae*.

La principal desventaja que presenta es la mala solubilidad en medio acuoso, debido a que las aminas primarias aromáticas como es el caso de dapsona tienden a presentar una baja solubilidad. Por ello, en la actualidad se han sintetizado diferentes análogos a partir de la molécula de dapsona teniendo como principal tarea aumentar la solubilidad en medio acuoso y mantener su efecto terapéutico. Se han generado diferentes derivados con aminoácidos para explorar si se presenta una mejoría en la solubilidad en medio acuoso (Figura 2). La totalidad de los derivados presentes en la tabla 1, se tiene una buena estabilidad e hidrólisis enzimática pero la solubilidad es dependiente del pH de la solución.

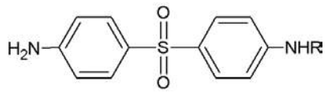


Figura 2. Estructura base

Tabla 1. Aminoácidos como sustituyentes

Sustituyente R	
1. –H	8. -*D*-leucina
2. –*L*-alanina	9.–*D*-fenilalanina
3. –*L*-leucina	10.-*DL*-alanina
4.–*L*-fenilalanina	11. –*DL*-leucina
5. –glicina	12.–*DL*- fenilalanina
6.–*L*-lisina	13. $-COCH_2CH_3$
7. –*D*-alanina	14. $-COCH_3$

En síntesis orgánica se le conoce como grupo protector a un grupo que se introduce para modificar la funcionalidad o reactividad de algún grupo en un compuesto determinado en alguna secuencia de reacciones. La ventaja de emplear grupos protectores es que una vez terminada la secuencia de reacción se elimina dicho grupo protector y se obtiene la molécula deseada. La desventaja de la protección y desprotección de un grupo funcional implica dos pasos adicionales de síntesis, lo que provocará una disminución del rendimiento global. Por ello, se recomienda que se evite a medida de lo posible, a menos que sea imprescindible, como lo es en esta investigación.

MÉTODOS Y MATERIALES

En la etapa de la experimentación se utilizaron diferentes materiales de laboratorio en los que se encuentran: vasos de precipitados, pipetas Pasteur, vial tipo ámbar, tubos de ensaye, capilar, probetas, pipetas graduadas, buretas, cámara cromatográfica, matraces bola, vidrio de reloj. Del mismo modo materiales diversos tales como: Espátulas, agitadores magnéticos, gradillas, Eppendorf, septum, así como parilla eléctrica marca Barntead/Thermolyne, balanza analítica marca AND, modelos G-2000, rotavapor Büchi R-200 para recuperación y eliminación de disolventes, estufa Arsa; modelo AR-290 para secado y esterilización material de vidrio y metal, lámpara-Uv-Entela de 254 y 365nm para revelar placas cromatografías de gel de sílice. Para la determinación de punto de fusión se realizó por medio del aparato Fisher Jones La totalidad de materiales de laboratorio de vidrio utilizado en las reacciones utilizarán en estado anhidro.

En primera instancia se realizó la búsqueda y actualización del material bibliográfico del estado actual sobre las síntesis de derivados de dapsona y su actividad sobre afecciones en el ser humano, así como las metodologías sintéticas empleadas en la obtención de derivados de dapsona. Al plantear la metodología experimental se observó que en el aminoácido, los nitrógenos actúan como nucleófilo, por lo que se planteó su protección con *tert*-butiloxicarbonilo (Boc) para disminuir su reactividad. La protección se llevó a cabo en un matraz bola, bajo agitación magnética por medio de reflujo entre el aminoácido *L*-metionina y el grupo protector BOC en una relación molar de 1:3 respetivamente, en presencia de trietilamina.

Una vez protegido el aminoácido se continuó con la preparación del anhídrido mixto correspondiente al aminoácido *L*-metionina. Para su preparación se empleó el producto de la reacción de protección, con la finalidad de aumentar la reactividad del grupo carbonilo del aminoácido. Se acondicionó la reacción en una relación equimolar 1:1 entre el aminoácido protegido y el cloruro de pivaloilo en un matraz bola en constante agitación magnética con tetrahidrofurano (THF) como disolvente en presencia de trietilamina.

Posteriormente, el anhídrido mixto de aminoácido *L*-metionina se acondicionó para la reacción de *N*-acilación por medio de reflujo entre la molécula de DDS y el anhídrido en cuestión, en presencia de trietilamina y acetona en calentamiento y agitación constante. El progreso de la reacción se monitoreo por medio de cromatografía en capa fina y el producto obtenido se mantuvo en refrigeración, donde se observó la formación de cristales en forma de aguja que fueron separados usando la técnica de filtración.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El desarrollar la protección del aminoácido por reflujo la mezcla de reacción adquirió un color turbio, se monitoreo por medio de cromatografía fina con un sistema Acetato de Etilo (AcOEt): Metanol (MeOH). Las placas fueron reveladas con lámpara de luz ultravioleta donde se observaron tres señales con un tenue color lila, por lo que se dio por terminada la reacción.

En el seguimiento de la reacción para la preparación del anhídrido mixto se observó un precipitado amarillo con consistencia lechosa. El avance de la reacción fue monitoreado mediante cromatografía en placa con un sistema AcOEt: MeOH, donde se observaron dos señales, una de ellas, pertenece a la muestra de reacción (M) es de un tamaño más grande y recorrió distancia distinta a la referencia, por lo que se dedujo que la reacción procedió (Figura 2).

Figura 2. Placa del crudo de reacción

Los cristales formados se recuperaron por medio de filtración, siendo lavados con diferentes disolventes conservando su color amarillo. Se tomó una muestra de los cristales y se observó por medio de cromatografía en placa que no eran completamente puros, ya que se apreció que contenían materia prima que no reacciono. En primera instancia a luz ultravioleta se observó que se encontraban a la misma altura que la muestra de dapsona (Figura 3); sin embargo, en la parte inferior de la placa se lograba ver otra señal alargada siendo este el posible producto de interés. Ayudando para su visualización con de I_2 (Figura 4) y reveladores químicos para su percepción (Figura 5).

Figura 3. Placa de los cristales obtenidos expuestos en lámpara de luz UV.

Figura 4. Placa de los cristales expuesta en yodo.

Figura 5. Placa de los cristales revelador Sulfato Cérico Amoniacal.

CONCLUSIONES

Se logró el desarrollo y ejecución de la metodología para la síntesis de dapsona con el aminoácido *L*-metionina que el cual pudiera presentar una mejor actividad frente a afecciones como la lepra,

tuberculosis, malaria en análisis biológicos posteriores. Los cristales obtenidos del derivado correspondiente fue de 143 ° C; en comparación a los reactivos que son la dapsona y al aminoácido deduciendo con este parámetro de que en efecto se trata de otro compuesto distinto.

Para desarrollar esto, primero se realizó la síntesis de los precursores para del anhídrido del aminoácido *L*-metionina el cual se utilizó como reactivo para la reacción principal de *N-acilación* para la obtención de los modificado. La totalidad de las reacciones plateadas procedieron de manera favorable demostrado en la distancia recorrida del compuesto y su forma de revelar en las cromatoplacas. Una vez terminada la síntesis el compuesto fue purificado mediante filtración obteniendo un rendimiento de 57.7 mg del producto equivalente al QUE PORCENTAJE DE RENDIMIETNO PRESENTO. Se decidió enviar una muestra para su identificación, pero por cuestiones de tiempo no fue posible recibir los resultados hasta el momento.

BIBLIOGRAFÍA

CAMPS GARCÍA, P. (2009). *Química farmacéutica I,* Barcelona: Publicaciones y ediciones de la Universidad de Barcelona.

MENDOZA PATIÑO, N. (2008). *Farmacología médica,* México: Editorial Médica Panamericana.

POCHOPIN, N. L.; CHARMAN, W. N.; STELLA, V. J. (1994). "Amino acid derivates of dapsone as water-soluble prodrugs" en *International Journal of Pharmaceutics,* Núm. 121, 1995, [pp. 157-167].

VALDIVIA BLONDET, L. (1996). "Sulfonas" en *Dermatología peruana,* Vol. 6, No. 1-2. Consultada en http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/dermatologia/v06_n1-2/articulos_revision.htm (16-06-2012).

BANDER, H. (1969). "*Antimalarial compounds related to diaminodiphenyl sulfone*" en *Journal of Medicinal Chemistry*, Núm. 19, [pp. 1966-1968].

SÍNTESIS DE UN NÚCLEO BASE DE CUMARINA MEDIANTE UNA REACCIÓN ONE-POT: ESTRUCTURA CON POSIBLE ACCIÓN ANTINEOPLÁSICA

Flor Estefany Quiroz Lumbreras[1] y Virginia Flores-Morales[2]

RESUMEN

Durante los últimos años, las cumarinas han tenido un gran interés científico por su amplio espectro de efectos biológicos, algunas de ellas actúan como antineoplásicos, anticoagulantes, antimicrobianos, anti-inflamatorios, entre otras funciones que están en investigación. En los últimos 20 años, se ha explorado la realización de síntesis mediante métodos no convencionales de energía, entre ellos se encuentra el uso de las microondas, las reacciones bajo este tipo de radiación se realizan generalmente en menor tiempo y con rendimientos altos. En el presente trabajo se llevó a cabo la síntesis del núcleo base de la 7-hidroxicumarina-3-carboxilato de etilo a través de una condensación de Knoevenagel mediante el uso de microondas, obteniendo un rendimiento del 19.86 %.

ABSTRACT

In recent years, the coumarins have had great scientific interest for its broad spectrum of biological effects, some of them act as antineoplastic agents, anticoagulants, antimicrobials, anti-inflammatories, among other functions that are under investigation. In the last 20 years, has explored performing synthesis using unconventional methods of energy among them is the use of microwaves, reactions under this type of radiation is usually done in less time and with high yields. In the present work it was conducted based synthesis nucleus of 7-hydroxycoumarin-3-carboxylate through a Knoevenagel condensation using microwave, obtaining a yield of 19.86%.

Palabras clave: cumarina, microondas, CCF, Knoevenagel, antineoplásicos.

INTRODUCCIÓN

El aislamiento de la cumarina se reportó por primera vez en 1820 por A. Vogel, quien era un miembro de la Real Academia de Ciencias de Munich, quien mencionaba que diferentes tipos de resinas y residuos procedentes de orinas de animales contenían el mismo compuesto y que éste era producto de la digestión de las plantas que los animales consumían en los prados de pastoreo. Por lo tanto, asoció este compuesto con el olor perfumado de las flores de trébol de haba tonka recién cortado del heno, *Melilotus oficinalis*, que había sido llamado *Dipteryx odorata* por Wildenow. Si bien, no obtuvo una prueba rigurosa de que estas dos fuentes produjeran el mismo compuesto, los procedimientos experimentales de su época mostraron que tenían ciertas propiedades en común. Al realizar varios experimentos, observó que el compuesto era el mismo en todos los casos y debido a lo anterior, el nombre de la cumarina se deriva etimológicamente del Kumaru, la palabra tupí que designa el árbol del haba tonka.

MARCO TEÓRICO

La estructura química de la cumarina o 1,2-benzopirona corresponde a la lactona del correspondiente ácido *o*-hidróxi-cinámico o ácido *o*-cumárico (figura 1). Es un compuesto natural producido en varias plantas,

[1] Universidad Autónoma de Zacatecas, Unidad Académica de Ciencias Químicas, Programa Académico de Químico Farmacéutico Biólogo, Campus SXXI, E5; Carretera Zacatecas-Guadalajara, Km. 6, Ejido La Escondida, C.P: 98160, Zacatecas, Zacatecas, estyefany.lumbreras@outlook.com
[2] Universidad Autónoma de Zacatecas, Unidad Académica de Ciencias Químicas, Laboratorio de Síntesis Asimétrica y Bioenergética, Programa de Ingeniería Química, Campus SXXI, E6; Carretera Zacatecas-Guadalajara, Km. 6, Ejido La Escondida, C.P: 98160, Zacatecas, Zacatecas, virginia.flores@uaz.edu.mx

microorganismos y algunos animales. Da nombre a una amplia clase de productos naturales que se basan en la estructura 1,2-benzopirona. Siendo los metabolitos C_6C_3 más característicos. Los sustituyentes en el núcleo de cumarina son nombrados de acuerdo con el esquema de numeración que se muestra en la figura 2.

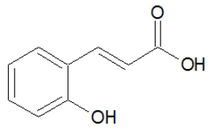


Figura 1. Estructura del ácido o-cumárico

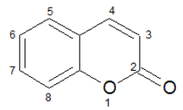


Figura 2. Núcleo de la cumarina con su numeración

La cumarina es un sólido cristalino con una coloración que va de blanco al amarillo, tiene baja solubilidad en agua fría pero alta solubilidad en etanol. La cumarina presenta fluorescencia dependiendo de la posición y naturaleza química de los sustituyentes sobre el anillo de 1,2-benzopirona, un ejemplo es la 3-hidroxicumarina que presenta una fluorescencia débil en la región ultravioleta, mientras que los análogos 5-, 6- y 7-hidroxicumarina presentan elevada fluorescencia en el visible. La fluorescencia de los derivados de cumarinas es sensibles a los cambios en la polaridad de los disolventes y al pH, lo que genera una modificación en la posición de los máximos de absorción y de emisión, así como la intensidad de fluorescencia.

La 7-hidroxicumarina se llama también umbeliferona por haber sido aislada por primera vez a partir de resinas de umbelíferas, que son una gran familia de plantas herbáceas. Son lactonas aromáticas cuya biosíntesis se produce a partir de ácidos cinámicos, generalmente del ácido o-hidroxicinámico. Su biosíntesis comienza con una hidroxilación en *orto* del ácido cinámico para dar lugar al ácido *trans-o*-cumárico, seguida de la formación del *β*-glucósido. A continuación, se produce un cambio en configuración del doble enlace que pasa a *cis,* y por posterior hidrólisis y una deshidratación se forma el anillo de lactona.

El núcleo de cumarina se encontró inicialmente en el haba tonka (*Dipteryxodorata silvestre*) y en 150 especies que se distribuyen en más de 30 familias diferentes, como *Rutaceae, Umbelíferas, Clusiaceae, Guttiferae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Nyctaginaceae, y Apiaceae*, por nombrar sólo los más importantes. Las cumarinas se producen en un gran número de plantas, en particular en hierbas, tréboles, y en las zanahorias, y se producen en mayores cantidades en las frutas, bayas, semillas, raíces, té verde y la achicoria; entre las que se destaca las sumidades floridas de *Melilotus officinalis* (Meliloto, trébol de olor), semillas y corteza de *Aesculus hippocastanum* (Castaño de Indias), frutos de *Amni visnaga* (Biznaga, kela), las cuales tienen acción anti-inflamatoria, vasoprotectora y antianginoso respectivamente. También se encuentran en proporciones sustanciales en los aceites esenciales como el aceite de casia, aceite de corteza de canela y aceite de lavanda. Los derivados de las cumarinas se clasifican en cinco tipos principales: cumarinas simples (poseen el núcleo base de benzo-α-pirona con más o menos sustituyentes en las posiciones 5, 6, 7 y 8), cumarinas *c*-predniladas (llevan enlazadas al anillo de benzo-α-pirona unidades isoprénicas), furanocumarinas (llevan adosado al anillo de benceno un anillo de furano), piranocumarinas (llevan adosado al anillo de benceno un anillo de pirano) y discumarinas (son estructuras diméricas).

Se han desarrollado diferentes métodos de obtención de cumarinas, basados en la demanda de nuevos métodos de síntesis; no obstante, los métodos clásicos son los que han destacado en su preparación, ya sea por medio de la extracción del compuesto natural o mediante métodos generales de síntesis, en los cuales destacan cuatro tipos de reacciones: La reacción de W. Perkin, quien en 1868 describió la síntesis de cumarina a partir del calentamiento de salicilaldehído y ácido acético. Posteriormente, en 1883 Von Pechmann realizó la síntesis de cumarinas por reacción de fenoles con *β*-cetoésteres, obteniendo neoflavonoides sustituidos en distintas posiciones generalmente con un elevado rendimiento, años después, en 1896 Knoevenagel llevó a cabo una reacción de aniones derivados de compuestos *β*-dicarbonílicos y

sus análogos, en la cual se trata con una cantidad catalítica de una base débil (dietilamina, piperidina, etc.), en presencia de un aldehído o cetona para generar el compuesto *α, β*–insaturado que posteriormente se condensa para formar la cumarina. Finalmente en 1923, Claisen-Schmidt reportó el tratamiento de un ion fenóxido con 3-bromopropeno, el cual resulta en una síntesis de éteres tipo Williamson y conduce a la formación de un éter alil arílico. El reordenamiento de Claisen se efectúo al calentar el éter alil arílico entre 200 a 250 °C, formándose el *o*-alilfenol, el resultado fue la alquilación del fenol en una posición orto.

Durante las últimas décadas, las cumarinas han atraído un gran interés científico por su amplio espectro de efectos biológicos, ya que actúan como anticoagulantes, antidepresivos, antimicrobianos, antioxidantes, anti-inflamatorios, antinociceptivo, agentes antitumorales, antiasmáticos, antivirales (incluyendo anti-VIH). Para hacer posible la obtención de nuevos compuestos se han implementado nuevos métodos de síntesis, empleando microondas, donde las reacciones se llevan a cabo en menor tiempo y con rendimientos altos. Con base a lo anterior, los objetivos del presente trabajo se basaron en una recopilación bibliográfica que permitió justificar la síntesis del núcleo base de cumarina, conocer sus características fisicoquímicas, así como su importancia antineoplásica. Para finalizar con la obtención del compuesto mediante un método asistido por microonda.

MÉTODOS Y MATERIAES

En el presente trabajo se propuso una metodología para llevar a cabo la síntesis del núcleo base de la 7-hidroxicumarina-3-carboxilato de etilo a través de una condensación de Knoevenagel mediante el uso de microondas, como se muestra en la figura 3. Se pesó en un matraz bola 1 mol de 2,4-dihidroxibenzadehído, posteriormente se le agregó gota a gota 1.1 mol de malonato de dietilo y se empleó piridina (base), se dejó en agitación constante por 30 minutos. Después se colocó en un equipo de microondas a una temperatura de 60 °C durante 3 horas con intervalos de 1 hora. Para llevar a cabo monitoreo de la reacción del núcleo base de la cumarina se utilizó la técnica cromatográfica en capa fina (durante cada intervalo) empleando diferentes disolventes.

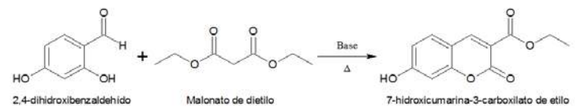


Figura 3. Obtención del núcleo base de la 7-hidroxicumarina-3-carboxilato de etilo

El material para llevar a cabo las reacciones adecuadas en la síntesis de cumarinas fue: matraz bola de 10 ml, espátula de acero inoxidable, agitadores magnéticos de teflón, septum, pipetas volumétricas de distintas capacidades, pinzas de 3 dedos, vasos de precipitado de 50 ml y 100 ml, pipetas Pasteur, probeta de 10 ml, capilares de vidrio(5 µl),tubos de ensayo, cámaras de elución cromatográfica, viales ámbar, placas cromatográficas de gel de sílice marca Merck 60 F_{254} con soporte de aluminio, con un tamaño de 1, 1.5, 4 cm de ancho x 4 cm de largo, dependiendo del uso, probeta de 10 ml, gradillas de acero. Los equipos utilizados fueron: una estufa Arsa modelo AR-290 utilizada para el secado del material de laboratorio, balanza analítica marca ADN modelo G-200, parrilla de agitación marca Cimarec, rotavapor marca Buchi modelo R-200, lámpara de UV marca Entela utilizada para el revelado de placas cromatográficas, bomba de recirculación de agua, campana de extracción; para la síntesis de compuestos se utilizará un microondas marca CEM modelo Discovery System.

Método mediante microondas. El método de microondas es un método de síntesis, en la cual, las reacciones se llevan a cabo en menor tiempo y con rendimientos altos. Consiste en un campo eléctrico y magnético y por lo tanto representa la energía electromagnética. Esta energía puede actuar como una radiación no ionizante que causa movimientos moleculares de iones y la rotación de los dipolos, pero no afecta a la

estructura molecular. La rotación de los dipolos en un campo alterno provoca fricción, lo que produce calor, hasta a 10 °C/s.

Cromatografía en capa fina (CCF). En este tipo de cromatografía, la fase estacionaria es una capa de fracción de milímetro de espesor, formada por partículas unidas a una placa sólida, que puede ser de aluminio, gel de sílice o celulosa. Para llevar a cabo esta técnica se coloca la muestra en un volumen mínimo de disolvente sobre la fase estacionaria seca, a pocos centímetros de un borde de la placa. Para desarrollar el cromatograma, se introduce la placa en un recipiente que contiene una pequeña cantidad de disolvente, colocando hacia abajo el borde más cercano a las muestras. El disolvente asciende por capilaridad a través del soporte sólido llevando consigo a los solutos, en donde los diferentes componentes se desplazan a manera de señales que viajan a distintas distancias en relación con el frente del disolvente. El recipiente está cerrado permitiendo mantener la atmósfera saturada con el vapor de disolvente. Este vapor saturado evita que se evapore el disolvente de la cara de la placa.

RESULTADOS

Mediante la reacción de Knoevenagel se sintetizó la 7-hidroxicumarina-3-carboxilato de etilo asistido por microondas, obteniendo un rendimiento de 19.86 %. Mediante el uso de las placas cromatográficas se observó la formación de cumarina la cual se aprecia de color morado en la lámpara de UV en una longitud de 365 nm (Figura 4) y a 254 nm se observó presencia de materia prima que trae consigo el núcleo, como se muestra en la figura 5.

Figura 4. Cromatografía en placa: 1) Referencia de cumarina, 2) Reacción del núcleo base de la 7-hidroxicumarina-3-carboxilato de etilo

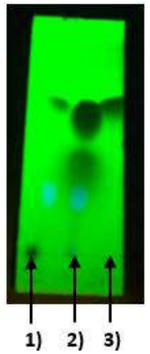


Figura 5. Cromatografía en placa: 1) Referencia de cumarina, 2) Reacción del núcleo base de la 7-hidroxicumarina-3-carboxilato de etilo, 3) Referencia del 2,4-dihidroxibenzaldehído

CONCLUSIONES

Se realizó la síntesis del núcleo base de la 7-hidroxicumarina-3-carboxilato de etilo mediante la reacción de Knoevenagel, obteniendo un rendimiento del 19.86 %. El método asistido por microondas representa una técnica alternativa para proporcionar energía térmica a una reacción, con ventajas interesantes como el ahorro de tiempo, la generación de menos subproductos, así como la obtención de un mayor rendimiento del compuesto. Además de que apoya el desarrollo de nuevas líneas de investigación mediante la optimización de condiciones. La cromatografía en capa fina es un método físico de separación, en el cual

los componentes que se van a separar se distribuyen entre dos fases, esta técnica permitió llevar a cabo el control de la reacción, esto fue al momento de cada intervalo.

BIBLIOGRAFÍA

ABEIJÓN, P. (2008). *Heterocarbonucleósidos: Síntesis y evaluación biológica de análogos tiofenocondensados del abacavir* (Tesis doctoral). Universidad de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela.
ABERNETHY, J. L. (1969). "The historical and current interest in coumarin" en *Journal of Chemical Education,* Núm.46, Vol. IX, Septiembre, [pp. 561].
BOUGRIN, K., LOUPY, A. y SOUFIAOUI, M. (2005). "Microwave-assisted solvent-free heterocyclic synthesis" en *Journal of Photochemistry and Photobiology c: Photochemistry Reviews*, Núm. 2, Vol. VI, Octubre, [pp. 139–167].
BOWLIN, T. L. & MOIR, D. T. (2012). "Coumarin-based inhibitors of bacillus anthracis and staphylococcus aureus replicative DNA helicase: chemical optimization, biological evaluation, and antibacterial activities" en *Journal of Medicinal Chemistry*, Núm. 55, Vol. XXIV, Diciembre, [pp. 10896–10908].
BRÄSE, S. (2016). *Privileged scaffolds in medicinal chemistry. Design, synthesis, evaluation,* Barcelona: The Royal Society of Chemistry.
CASTILLO, E. & MARTÍNEZ, I. (2016). *Manual de fitoterapia*, España: Elsevier.
CLARAMUNT, R. M., FARRÁN, M., LÓPEZ, C., PÉREZ, M. & GUTIÉRREZ, D. S. M. (2013). *Química bioorgánica y productos naturales,* Madrid: Universidad Nacional de Educación a Distancia.
CRECENTE, J. (2009). Síntesis orgánica asistida por microondas. Obtención de enol carbamatos, tetrahidroisoquinolinas, benzoazepinas, tiazolinas, sulfuros de fosfoles, isoflavonas, arilcumarinas, en cumafinocumarinas y núcleos de dendrímeros. *Aplicaciones* (Tesis doctoral). Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela.
KONTOGIORGIS, C. A., DETSI, A. & HADJIPAVLOU, D. J. (2012). "Coumarin-based drugs: a patent review (2008-present)" en *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, Núm. 22, Vol. IV, Abril, [pp. 437–454].
KONTOGIORGIS, C. A. & HADJIPAVLOU, D. J. (2005). "Synthesis and antiinflammatory activity of coumarin derivatives" en *Journal of Medicinal Chemistry*, Núm. 48, Vol. XX, Octubre, [pp. 6400-6408].
KUKLINSKI, C. (2000). *Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*, Barcelona: Omega.
KÜRTI, L. & CSAKÓ, B. (2005). *Strategic applications of named reactions in organic synthesis. Backgroun and datailed mechanims*, San Diego: Elsevier.
LI, B., PAI, R., DI, M., AIELLO, D., BARNES, M. H., BUTLER, M. M., TASHJIAN, T. F., PEET, N. P., MEDINA, F. G., MARRERO, J. G., MACÍAS, A. M., GONZÁLEZ, M. C., CÓRDOVA, I., TEISSIER, A. G. & OSEGUEDA, S. (2015). "Coumarin heterocyclic derivatives: chemical synthesis and biological activity" en *Natural Product Report*, Núm. 32, Vol. X, Septiembre, [pp. 1472–1507].
MCMURRY, J. (2012). *Química orgánica*, México: Cengage Learning.
REIJA, B. (2007). *Estudio estructural y dinámico de sistemas organizados mediante sondas fluorescentes* (Tesis doctoral). Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela.
RUBINSON, J. F. & RUBINSON, K. A. (2000). *Química analítica contemporánea*, México: Prentice-Hall.

ACOPLE LUZ-MATERIA EN MICROCAVIDADES ÓPTICAS SEMICONDUCTORAS: CRECIMIENTO Y CARACTERIZACIÓN IN-SITU

Ana Laura Ramírez Díaz[1] y Edgar Armando Cerda Méndez[2]

RESUMEN

Realizamos el crecimiento parcial de una microcavidad (MC) semiconductora, la cual está compuesta por múltiples capas delgadas de aleaciones semiconductoras. La muestra de MC fue fabricada por la técnica de crecimiento por Epitaxia por Haces Moleculares. Para tener un mayor control de la calidad de la MC implementamos un sistema de monitoreo in situ por medio de medidas de reflectancia. Esto permite evaluar en tiempo real el espesor de cada una de las capas conforme son crecidas. Las medidas de reflectancia las hicimos con un espectrómetro compacto y con un montaje óptico que acoplamos a la cámara de crecimiento a través de un puerto óptico. Se logró el monitoreo in situ del crecimiento de la muestra.

ABSTRACT

We carried out the partial growth of a microcavity (MC) semiconductor, which one is composed by mutiple thin layers of semiconductor alloys. The MC simple was fabricated using growth by Molecular Beam Epitaxy. In order to have full control of the quality of the MC, we implemented a system of in situ optical monitoring by measuring reflectance. This allows to assess in real time the thickness of each one of the layers as is grown. We did the measurements of reflectance using a compact spectrometer and with an optical setup that was directly coupled to the growth chamber through an optical port. We successfully realized the in situ monitoring of the sample growth.

Palabras Claves: Microcavidades, Acople Fuerte, Excitón, Pozo cuántico, Polaritón

INTRODUCCIÓN

Las microcavidades ópticas (MC) permiten estudiar la interacción entre la luz y la materia. Esta última se observa en dos regímenes: acople fuerte y acople débil. El acople débil ocurre, por ejemplo, en la emisión de la luz estimulada en los láseres. El acople fuerte, por el contrario, da origen a interesantes fenómenos como la formación de nuevas cuasi-partículas que son mitad luz y mitad materia. Éste último es el objetivo a lograr en la MC de este proyecto. Las MC en estructuras semiconductoras se han estudiado en el régimen de acople fuerte desde 1992 por Weisbuch y colaboradores (Weisbuch, Nishioka, Ishikawa & Arakawa, 1992), los cuales lo demostraron por primera vez en el espectro de reflectividad de MCs hechas de aleaciones de (Al,Ga)As. A partir de entonces, numerosos grupos alrededor del mundo han realizado investigaciones basadas en éste sistema, ya que permite observar interesantes fenómenos como condensación de Bose-Einstein (Byrnes, Kim, & Yamamoto, 2014) (Buller, Cerda-Méndez, Balderas-Navarro, Biermann, & Santos, 2016). En México no se ha implementado hasta ahora su estudio experimental. El proyecto en el que participé es el primero a nivel nacional en esta área. Para poder fabricar una MC exitosamente, es necesario tener un control muy preciso durante el proceso de crecimiento de la misma. En éste proyecto se implementó y utilizó una técnica por monitoreo óptico in situ la cual provee un método confiable para controlar de forma muy precisa los espesores de las capas que la componen.

[1] Universidad Autónoma de Zacatecas, Unidad Académica de Física, Calzada Solidaridad esquina Paseo, La Bufa s/n, C.P. 98060, Zacatecas, Zacatecas, ana___t@hotmail.com
[2] Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Instituto de Investigación en Comunicación Óptica, Av. Karakorum, Lomas Cuarta sección, C.P. 78210, San Luis Potosí, San Luis Potosí, edgar.cerda@gmail.com

MARCO TEORICO

Microcavidades ópticas. Una MC es una estructura que consiste en dos espejos de alta reflectividad, llamados Reflectores Distribuidos de Bragg (DBR, por sus siglas en inglés), colocados uno frente del otro y separados por una capa espaciadora [Figura 1a)]. La capa espaciadora, de índice de refracción n, tiene un grosor de λ/2n, donde λ es la longitud de onda de la luz que se desea confinar en la MC. Además, dentro del espaciador existe una capa ultra-delgada (algunos nm de espesor), llamada pozo cuántico (QW, por sus siglas en inglés), donde se confinan electrones. Al entrar luz, esta queda atrapada en la cavidad y en el QW se absorbe un fotón, que provoca un salto de energía de un electrón quedando por un momento un "hueco" (que tiene carga positiva residual del núcleo). Debido a la interacción Coulombiana entre el electrón y el hueco, se forma una nueva cuasi-partícula llamada excitón. Al regresar espontáneamente a su nivel de energía inicial, el excitón emite el fotón que absorbió, y este queda atrapado por un corto periodo en la cavidad. El proceso de emisión y absorción del fotón por el excitón se repite muchas veces (alrededor de 1000) hasta que el fotón sale de la cavidad ya que los DBRs son de reflectividad finita.

La repetida emisión y absorción da origen al llamado acople fuerte. Éste último es un régimen donde se modifican las propiedades de fotón y del excitón, los cuales originalmente tienen la misma energía. El resultado es la generación de una nueva cuasi-partícula que es mitad luz y mitad materia denominada polariton. El acople fuerte se puede identificar en una medida de reflectancia, por ejemplo, por el comportamiento de cruce evitado de las líneas de resonancia del excitón y del fotón dentro de la región espectral de la alta reflectividad de los DBRs [Figura 1b)]. Esto es, en lugar de que las señales de los dos componentes se traslapen, se observan dos resonancias separadas por la energía de acople entre el excitón y el fotón (Skolnick, Fisher, & Whittaker, 1998).

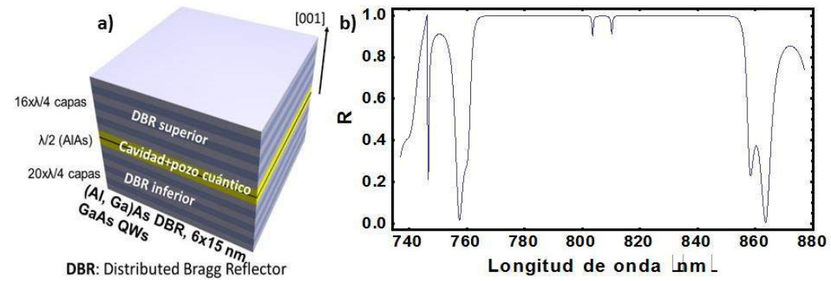


Figura 1.a) Esquema de una MC óptica. La flecha indica la dirección cristalográfica y apunta hacia la superficie de la muestra. b) Simulación del espectro de reflectancia de una MC. Se observa una región de alta reflectividad y en medio, dos valles separados por la energía de acople entre el excitón-fotón.

METODOLOGÍA

Las muestras de MC fueron crecidas por la técnica de Epitaxia por Haces Moleculares (MBE, por sus siglas en inglés). Ésta consiste en el crecimiento de películas delgadas cristalinas de muy alta calidad por medio de la deposición de materiales capa atómica por capa atómica (Joyce, 1985). Caracterizamos las muestras crecidas por reflectancia ex-situ e in-situ en tiempo real. Éste último lo realizamos por medio de un montaje óptico especial acoplado en la cámara de crecimiento a través de un puerto óptico en la misma para hacer medidas de la muestra dentro de la cámara (Biermann, Cerda-Méndez, Höricke, Santos, & Hey, 2011). Así mismo, se hizo el crecimiento y monitoreo in-situ de un DBR de la MC.

Caracterización óptica ex situ. En una primera etapa se realizaron pruebas para medir la reflectancia ex situ de muestras de control para entrenarnos en el uso del espectrómetro (Ocean Optics, modelo HR4000) utilizado para el monitoreo in situ. El espectrómetro cuenta con una resolución de 3.45nm y un rango espectral de 200-1100nm. Además, es muy conveniente porque nos permite tener movilidad dado su tamaño pequeño (148.6mmx104.8 mmx45.1mm) y su facilidad de uso, ya que es un dispositivo "plug and play". Finalmente, se puede hacer uso de una fibra óptica, lo cual es muy cómodo ya que no interfiere en el espacio donde colocamos el montaje óptico para realizar las medidas in situ. El arreglo para medidas ex situ se muestra en la figura 3a). En este, la luz de una lámpara de tungsteno incide en un iris, para obtener una imagen puntual. Después, llega a un espejo parabólico que colima el haz y lo dirige a la muestra. La luz reflejada es recolectada por el espejo cóncavo. De ahí incide en la entrada de la fibra óptica, la cual esta acoplada al espectrómetro, el cual es controlado por una computadora. Dos medidas de la reflectividad de la muestra de control se muestran en la figura 3b). En éste se observa la zona de alta reflectividad (entre 750 nm y 810 nm) con un valle alrededor de 800 nm, que corresponde a la resonancia de la cavidad. Esta muestra fue crecida anteriormente en el IICO, pero sus propiedades no son óptimas para observar el acople fuerte.

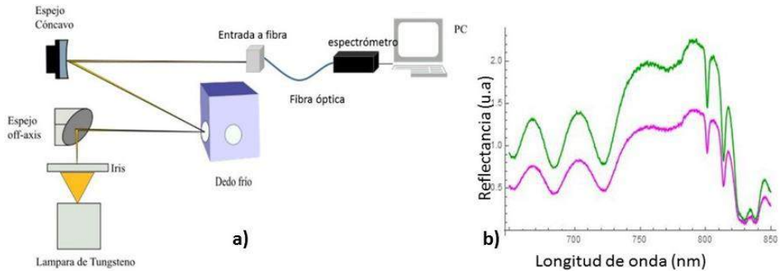


Figura 3. a) Arreglo óptico para mediciones ex situ, b) Espectros de reflectancia de la muestra de control.

Reflectancia para el monitoreo de MBE in-situ. En un primer paso, emulamos ex situ las condiciones de medición en la cámara de crecimiento: distancia entre la muestra dentro de la cámara y el arreglo de alrededor de 1 m, la entrada y salida de la luz en la cámara por el puerto óptico (de 5 cm de diámetro) y el espacio limitado con el que se cuenta para colocar los elementos ópticos junto a la cámara. El diseño final del montaje óptico realizado se muestra en la figura 3. El montaje óptico lo colocamos en una placa de aluminio. Éste consiste de la lámpara de tungsteno con un iris de 2 mm de diámetro, una lente de distancia focal de 14 cm con la cual se enfoca la luz sobre la muestra y una segunda lente de 9 cm, la cual enfoca el haz reflejado por la muestra en la entrada de la fibra óptica. El tamaño de la mancha de luz sobre la muestra es de 1.5 cm, que corresponde bien con la magnificación por la lente (x6).

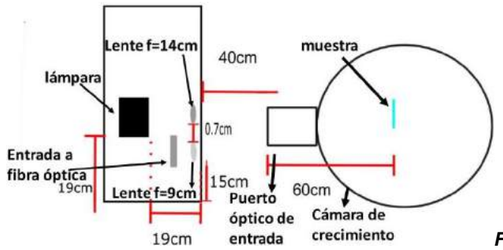


Figura 3. Montaje óptico para medidas in situ. La luz de la lámpara incide en la lente de f = 14 cm y esta la enfoca en la muestra. La luz reflejada llega a la lente de f = 9 cm, que la enfoca en la entrada de la fibra óptica.

Para hacer las pruebas de alineación, se colocó un espejo en la posición que correspondería a la muestra en la cámara. A una distancia de 40cm del montaje óptico (que corresponde a la posición del puerto óptico), obtuvimos las imágenes del rayo incidente y el reflejado (Figura 4) para asegurarnos de que la distancia entre ellos fuera menor a la apertura óptica del puerto de 5 cm. Posteriormente la placa con el montaje óptico fue acoplada a la cámara MBE (figura 5).

Figura 4. Foto del haz incidente y reflejado.

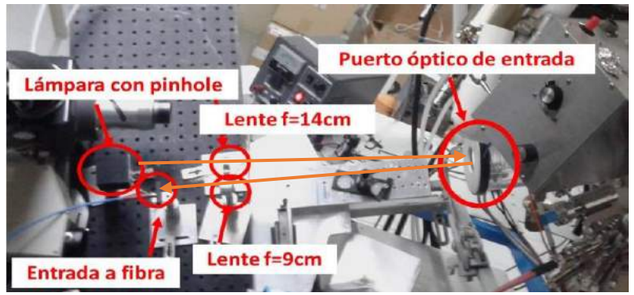


Figura 5. Vista lateral superior del arreglo acoplado a la cámara de MBE La placa esta inclinada a 45° con respecto de la horizontal.

Debido a que durante el crecimiento la muestra se encuentra rotando, la mancha de luz reflejada precesa alrededor del eje óptico principal. Por esta razón, fue necesario ajustar la segunda lente para asegurarnos que la luz incidiera constantemente en la fibra óptica. Adicionalmente, para cada experimento se promediaron 30 mediciones separadas por un intervalo de 1s con un tiempo de integración de 50ms, ya que, debido a dicha precesión, la cantidad de luz incidente en la fibra variaba con el tiempo.

Fabricación de las MC. Las MC fabricadas en el IICO están basadas en materiales III-V; en particular con aleaciones (Al,Ga)As. Los DBRs consisten en apilamientos de pares de capas delgadas con diferentes índices de refracción n (uno alto y uno bajo) y de espesor $\lambda/4n$ (Skolnick et al., 1998), donde λ es la longitud de onda a estudiar. El arreglo de capas alternadas provoca interferencia constructiva de la luz que entra a la MC, lo que produce la región espectral de alta reflectividad. El espaciador se crece después de terminar el primer espejo, su espesor es de $\lambda/2n$. En este caso, la muestra fue diseñada para que el centro de la región de alta reflectividad del DBR coincidiera con la energía de emisión de pozos cuánticos de 15 nm a 15 K, que es λ=807 nm (15K es la temperatura de operación de la MC). Debido a que la muestra crece a 600°C, los índices de refracción de los materiales son diferentes, por lo que se espera que el centro se encuentre en 840 nm. El DBR crecido consistió de 12 pares de capas delgadas de la aleación (Al,Ga)As con concentraciones de aluminio de 80% y 15% para tener índices de refracción bajo y alto, respectivamente.

Para el crecimiento se tiene que tener control de muchos parámetros. La temperatura del substrato se midió con un pirómetro y al ser la adecuada (600°C) abrieron las celdas del MBE para determinar un flujo adecuado según las composiciones deseadas para esta muestra. Así se obtuvieron los tiempos de deposición según el espesor deseado. Además, antes del crecimiento se depositó una capa buffer de GaAs para aplanar la superficie a nivel atómico. Éste proceso fue monitoreado por una muy conocida técnica de difracción de un haz rasante de electrones que, después de reflejarse en la superficie de la muestra, incide en una pantalla de fósforo. El MBE está controlado por medio de un programa que permite la apertura y el cierre automatizado de obturadores de las celdas que contienen los elementos a depositar. Los tiempos de deposición de las capas dependen de la tasa de crecimiento, que a su vez depende de la temperatura. La temperatura del Al utilizada fue de 1043°C con una presión de 5.7×10^{-8}Torr.. Las tasas de deposición de las aleaciones fueron: AlGaAs, 0.1482 nm/s; GaAs, 0.0736 nm/s y AlAs, 0.0593 nm/s.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Crecimiento. Se realizaron dos sesiones de crecimiento. La técnica de monitoreo in situ consiste en realizar una medida de reflectancia después de que se termina de crecer cada una de las capas que componen el DBR. El espectro medido después del crecimiento de una capa con índice de refracción alto debe presentar un máximo centrado en la longitud de onda para la que fue diseñada la MC, este caso, λ=840 nm. El espectro de una capa de índice de refracción bajo, por el contrario, presenta un mínimo. Dichos máximos y mínimos deben de estar alineados y la estructura de los espectros debe de ser simétrica alrededor de λ.

En la Figura 6a) se muestran los resultados de la primera sesión. Aunque los mínimos y máximos se encuentran centrados en 830nm, lo que indica que los espesores de las capas eran menores a los nominales, están alineados el uno con el otro y las formas de línea son bastantes simétricas, lo que indica un crecimiento uniforme.

Para aumentar la tasa de crecimiento se incrementó la temperatura de la celda de Al de 1043°C a 1050°C en la capa 13, y en la capa 14 se observó un incremento en la posición de su máximo. Sin embargo, al iniciar la capa 15 hubo un problema mecánico con los obturadores de la cámara, por lo que se creció una capa defectuosa. A partir de ahí, la forma de línea de los espectros se deformó. Disminuimos la temperatura del Al a 1048°C y del Ga a 847°C en el inicio de la capa 17 para tratar de recuperarla. Este cambio sin embargo no fue exitoso por lo que se detuvo el crecimiento.

En la segunda sesión [Figura 6b)], se "enterró" el DBR que realizamos en la primera con una capa de GaAs de 0.6 µm de espesor. La forma de línea inicial [espectros 1 y 2, Figura 6b)] mostraba algunas trazas de la estructura del primer crecimiento, ya que la capa buffer no es completamente opaca. Estos, sin embargo, no afectan los resultados principales. Para este crecimiento, se aumentó la temperatura de las celdas un grado respecto al inicio de la primera sesión.

La estructura muestra la estructura esperada en los espectros de cada capa, aunque esta vez ligeramente por encima del valor de λ esperado de 840nm [Figura 6b)]. En la capa 15, sin embargo, hubo nuevamente una falla mecánica que provocó que se depositaran dos capas de mismo índice (alto) de refracción, formando una capa de λ/2n.

Por ende, se modificaron las formas de línea de los espectros. Posteriormente se realizó una simulación numérica de la estructura (Yariv, & Yeh, 1984) y como se puede ver en la Figura 6c), está reproduce muy bien las formas de línea obtenidas experimentalmente del segundo crecimiento. Como las fallas mecánicas en la cámara se podrían presentar en las demás sesiones, se decidió detener el crecimiento para solucionarlas.

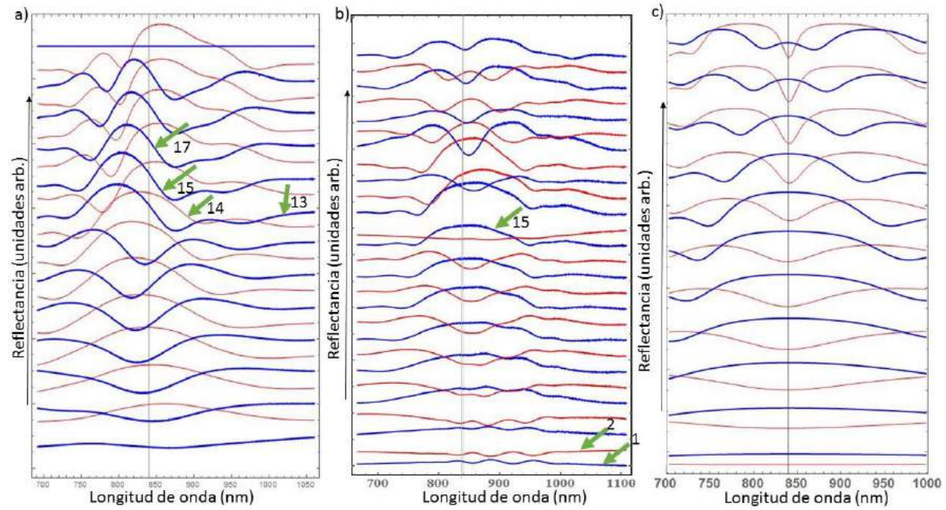


Figura 6. a) Espectros experimentales de a) la primera sesión y b) la segunda sesiones de crecimiento. c) Simulación numérica de la segunda sesión. El número de capas aumenta de abajo hacia arriba.

CONCLUSIONES

Se implementó, caracterizó y utilizó un montaje óptico para el monitoreo in situ por medidas de reflectancia en tiempo real para crecimiento por MBE. Mediante éste, se pudo observar de forma detallada el crecimiento de una estructura multicapa compleja, así como analizar cuantitativamente los problemas que se presentaron durante el crecimiento y corregirlos en una segunda sesión. Se concluyó que el grosor de las capas crecidas en una primera sesión de crecimiento era más delgado que lo esperado debido a que la tasa de crecimiento disminuyó durante el mismo. Esto fue corregido en una segunda sesión de crecimiento. Se presentaron problemas técnicos que tuvieron que ver con cuestiones ajenas al proyecto. A pesar de esto, se pudo crecer una estructura de alta calidad y con parámetros muy cercanos a los esperados. Este trabajo constituye el primer en su tipo en México y es un primer paso en el estudio de fenómenos de interacción luz-materia en el régimen de acople fuerte en semiconductores en el país.

BIBLIOGRAFÍA

WEISBUCH, C., NISHIOKA, M., ISHIKAWA, A., & ARAKAWA, Y., (1992). Observation of the coupled exciton-photon mode splting in a semiconductor quantum microcavity. *Physical Reviw Letters,* 69(23), 3314-3317.
BYRNES, T., KIM, N. Y., & YAMAMOTO, Y. (2014). Exciton-polariton condensates. *Nature Physics*, 10(11), 803-813.
BULLER, J. V. T., CERDA-MÉNDEZ, E. A., BALDERAS-NAVARRO, R. E., BIERMANN, K., & SANTOS, P.V. (2016). Spatial self-organization of macroscopic quantum states of exciton-polaritons in acoustic lattices. *New Journal of Physics*, 18(7), 073002.
SKOLNICK, M., FISHER, T., & WHITTAKER, D. (1998). Strong coupling phenomena in quantum microcavity structures. *Semiconductor Science and Technology*, *13*(7), 645-669.

YARIV, A. & YEH, P., (1984). Matrix Formulation for Isotropic Layered Media. En *Optical waves in crystals: propagation and control of laser radiation,* [pp. 102-114], Wiley.
BIERMANN, K., CERDA-MÉNDEZ, E., HÖRICKE, M., SANTOS, P. AND HEY, R. (2011). Controlled growth of exciton–polariton microcavities using in situ spectral reflectivity measurements. *Journal of Crystal Growth*, 323(1), 56-59.
JOYCE, B. (1985). Molecular beam epitaxy. *Reports on Progress in Physics*, *48*(12), 1637-1697.

ANÁLISIS MULTIVARIADO DE LOS EFECTOS DE LA EROSIÓN EN LA INFRAESTRUCTURA URBANA DE ZACATECAS Y GUADALUPE

Lidia Michelle Ramírez González[1] y Felipe de Jesús Escalona Alcazar[2]

RESUMEN

En las ciudades de Zacatecas y Guadalupe, los fenómenos geológicos representan un riesgo para la población y la infraestructura. El desconocimiento del papel de los procesos erosivos como factor de riesgo influye a que actualmente no existe una política o un plan de desarrollo que contemple estrategias para mitigar los efectos de este tipo de amenazas. La elaboración de un análisis multivariado, donde se tomen en cuenta distintos parámetros, puede funcionar para demostrar el grado de afectación que realmente tiene. Este trabajo se centró en la recopilación de datos de los parámetros que se tomarán en cuenta para la elaboración de ese análisis multivariado.

ABSTRACT

In the cities of Zacatecas and Guadalupe, geological phenomena represent a risk to the population and infrastructure. Ignorance of the role of erosion processes as a risk factor, influences the absence of policy or a development plan that includes strategies to mitigate the effects of such threats. The development of a multivariate analysis, which take into account various parameters, can be use to demonstrate the degree of impact it really has. This work focused on gathering data parameters to be taken to do the multivariate analysis.

Palabras clave: Erosión, riesgo, infraestructura urbana.

INTRODUCIÓN

En las ciudades de Zacatecas y Guadalupe, los fenómenos geológicos, geomorfológicos e hidrometeorológicos, representan un riesgo para la población y la infraestructura; sin embargo, aun cuando dentro de los planes de desarrollo urbano se mencionen agentes de riesgo como los deslizamientos de ladera, la reptación del suelo y la formación de cárcavas, no se les da la importancia real, ya que las actividades mineras dentro de las dos ciudades, siguen considerándose como el factor dominante de riesgo (Escalona et. al., s.f), por lo que resulta necesario demostrar su verdadera influencia, y de esta manera establecer medidas que permitan reducir el riesgo y la amenaza para la población.

Hasta ahora no se han definidos cuáles son los efectos reales de la erosión ni en dónde están. Tampoco se ha hecho un análisis de todos los elementos que componen a la erosión ni cómo cada variable contribuye en el aporte de sedimentos y en su posterior depósito. El fin es realizar el análisis espacial y multivariado delos elementos que influyen en la erosión y su asociación con zonas de riesgo en la zona urbana de Zacatecas y Guadalupe, así como en los sitios donde se proyecta el crecimiento urbano. (Escalona et. al., s.f.).

[1] Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Ciencias Naturales; Avenida de las Ciencias s/n, Juriquilla, C.P.: 76230, Santiago de Querétaro, Querétaro; mix.pepe@hotmail.com
[2] Universidad Autónoma de Zacatecas, Unidad Académica de Ciencias de la Tierra; Calzada de la Universidad 108, Fraccionamiento Progreso, C.P.: 98058, Zacatecas, Zacatecas; investigador@institución.edu.mx, eaaf005321@uaz.edu.mx

Debido a que el proyecto es demasiado extenso, considerando los datos que deben recaudarse, su revisión y su posterior análisis, y a que ha sido planeado para desarrollarse en un periodo mediano de tiempo (cuatro años), durante la estancia de investigación se trabajó únicamente en una de las primeras etapas: la recolección de información en campo y el diseño de la base de datos para la ciudad de Zacatecas.

De acuerdo a INEGI, (2010): La ciudad de Zacatecas se ubica en las coordenadas extremas 22° 37' y 22° 51' de latitud norte; los meridianos 102° 32' y 102° 51' de longitud oeste; y presenta un rango altitudinal entre los 2 100 y 2 800 msnm. Ocupa el 0.6% de la superficie del estado. Cuenta con 72 localidades y una población total de 132 035 habitantes. Presenta dentro de su geología rocas ígneas extrusivas (riolita y toba ácida), e intrusivas (pórfido andesítico), metamórficas (esquistos), sedimentarias (conglomerado y caliza) y suelo aluvial. Dentro de sus principales actividades económicas destaca la minería con aprovechamiento de plata, plomo y cobre, así como bancos de material de mampostería.

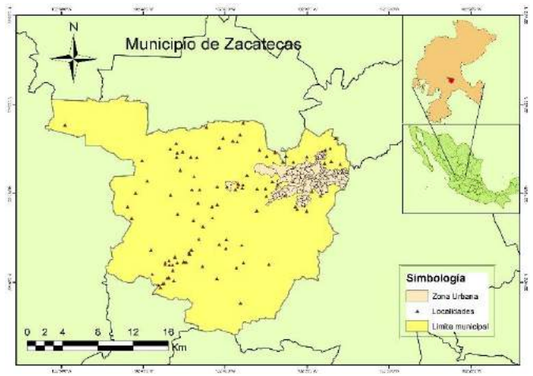


Figura 1 Mapa de Localización. Elaboración propia con información vectorial de INEGI.

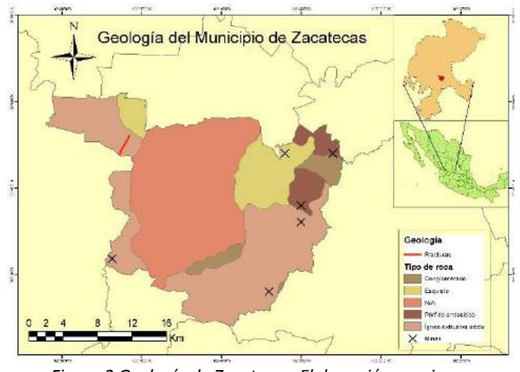


Figura 2 Geología de Zacatecas. Elaboración propia con información vectorial de INEGI.

OBJETIVOS

Objetivo general: Identificar y localizar las manifestaciones de erosión presentes en la infraestructura urbana de la de la Ciudad de Zacatecas.

Objetivos específicos: Localizar y georreferenciar mediante trabajo de campo los elementos que representen efectos de la erosión sobre la infraestructura de Zacatecas como colapsos, hundimientos o fracturas.

Realizar una base de datos con los parámetros de cada uno de los registros obtenidos en las colonias Primera, Segunda y Tercera de Díaz Ordaz, col. Pedro Ruiz González, col. García Salinas, Barrio de la Pinta y col. las Mercedes, pertenecientes a la zona de estudio.

MARCO TEÓRICO

La erosión del suelo es un fenómeno que ocasiona la pérdida gradual de terreno, es el proceso por el cual las partículas del suelo se mueven de un sitio a otro por medio de la acción del agua, viento u otro efecto. (Imeson y Cufs, 2008).

Relacionado con los movimientos y colapsos de la superficie del terreno natural, las condiciones de inestabilidad de las formaciones geológicas involucradas han existido siempre en la naturaleza. Sin embargo, estas condiciones suelen empeorar por la alteración del territorio, ante la presencia de asentamientos humanos, además existe el riesgo de que ante la presencia de lluvias se activen los movimientos, desprendimientos y colapsos, que afecten seriamente a la población.

En Zacatecas, la Dirección de Protección Civil informó que en 2015 apoyó en 98 derrumbes en casa habitación, de los cuales 20 fueron de bardas (de los restantes, 17 fueron en cerros y 50 en techos de lámina) (Periódico 20 minutos, 2015).

MÉTODOS Y MATERIALES

A continuación se enlistarán los materiales empleados así como los datos que se obtuvieron mediante ellos.

GPS: Esta herramienta fue usada para georreferenciar los elementos encontrados, tomando sus coordenadas, de manera que en una etapa posterior del proyecto puedan cartografiarse.

Brújula de precisión: Se utilizó para medir la extensión y orientación del azimut, así como el echado de los elementos encontrados, y la orientación de frentes de erosión en los cimientos, con el fin de conocer sus inclinaciones y direcciones. Este registro se hizo utilizando las mediciones del limbo graduado y el clinómetro de la brújula.

Cinta métrica: Fue empleada para conocer la longitud máxima de los elementos encontrados en la infraestructura durante el trabajo de campo, también se realizó la medición de la superficie en la que se encontraban para poder estimar su densidad. Además, con la cinta métrica también se tomaron las medidas de altura y profundidad de los frentes de erosión.

Protactor: Se utilizó para conocer el espesor de las fracturas, realizando la medición en la parte visiblemente más amplia. Además, también se usó para tomar las medidas de profundidad de hundimientos y fracturas, con relación al nivel original.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las manifestaciones de efectos de erosión encontradas durante el trabajo de campo fueron fracturas verticales, horizontales y con inclinación (Ilustración 1, Ilustración 2), desplazamiento de bardas por fracturas (Ilustración 3, remoción en bases de cimientos, (Ilustración 4), hundimiento en banquetas y calles (Ilustración 5) e incluso colapso total de infraestructura.

Ilustración 1Fractura vertical en fachada de casa

Ilustración 2 Fracturas con inclinación en el marco de la puerta

Ilustración 3 Desplazamiento de barda debido a fracturas

Ilustración 4 Remoción en base de cimiento

Ilustración 5 Banqueta fracturada

La longitud observada de las fracturas fue, desde los 10 cm hasta los 25 metros aproximadamente (en algunas bardas de mayor extensión), mientras que el ancho o espesor encontrado fue desde 1mm hasta los 7cm.
En cuanto a la densidad, ésta fue variante, dependiendo de la longitud de las fachadas de las casas, sin embargo, se observaron desde una, hasta 20 fracturas por casa. Respecto a la longitud de los frentes de erosión que afectaban los cimientos en banquetas y bardas, se registraron mediciones desde los 30 cm, hasta los 5 metros.

Todas estas mediciones fueron registradas de manera manual para añadirlas posteriormente a una base de datos computarizada e integrarla a los elementos del análisis multivariado.

CONCLUSIONES

Como se mencionó anteriormente, en la ciudad de Zacatecas no existe una política destinada específicamente a atender el riesgo y vulnerabilidad relacionado con los efectos adversos de la erosión. Durante este trabajo de investigación se identificó al menos algún tipo de fractura, hundimiento o colapso en la totalidad de las colonias donde se recopiló la información. Esto podría ser señal de la relevancia que debería tener este tema para los representantes de las instituciones y la sociedad civil, ya que los problemas

ambientales relacionados al suelo y sus degradación tienen asimismo distintas incidencias negativas sobre el bienestar de las poblaciones, ente las cuales están las que afectan a la infraestructura urbana (Cotler et. al., 2007), representando no sólo una amenaza para la seguridad de los habitantes, sino también pérdidas económicas.

BIBLIOGRAFÍA

-20 Minutos, (2016). “Protección Civil de Zacatecas registró intensa actividad en 2015”. Consultado en: http://www.20minutos.com.mx/noticia/47402/0/proteccion-civil-de-zacatecas-registro-intensa-actividad-en-2015/ (Fecha de Consulta: Agosto de 2016).

-Cotler, H., Sotelo, E., Domínguez, J., Zoriila, M., Cortina, S., y Quiñones, L., (2007). *La conservación de suelos como un asunto de interés público.* México: Gaceta Ecológica. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.

-Escalona, F., Bluhm J., Núñez, E., Valle, S., Esparza, A., y Huertra, J., (s.f). *Análisis multivariado de la erosión en la zona urbana de Zacatecas y Guadalupe.* Zacatecas, México: Unidad Académica de Ciencias de la Tierra, Universidad Autónoma de Zacatecas.

-INEGI (2010). Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Consultado en: http://www3.inegi.org.mx/sistemas/mexicocifras/datos-geograficos/32/32056.pdf (Fecha de consulta: agosto de 2016).

PRODUCCIÓN DE BIOETANOL DE SEGUNDA GENERACIÓN

Eduardo Ramírez Zamarripa[1] y Aldo Amaro Reyes[2]

RESUMEN

Fue evaluada la capacidad de producción de bioetanol de la levadura comercial *Saccharomyces Cerevisiae* usando como sustrato azúcar de residuo de una empresa (sacarosa) en una fermentación por lote. Se evaluaron distintas técnicas durante una cinética de crecimiento, así como la medición del CO2. Tales mediciones permitirán en un futuro agregar variantes y continuar con la investigación de la producción del bioetanol.

PALABRAS CLAVE: Bioetanol, Cinética de crecimiento, *Saccharomyces Cerevisiae.*

ABSTRACT

The ability to produce bioethanol by commercial yeast: *Saccharomyces Cerevisiae* was evaluated using as substrate waste sugar from a food industry (saccharose) in batch fermentation. Some techniques were evaluated during a kinetic growth, as well as the CO_2 measurement. Those measurements will be able in a close future to add some variants and continue with the bioethanol production research.

KEYWORDS: Bioethanol, kinetic growth, *Saccharomyces Cerevisiae.*

INTRODUCCIÓN

Desde que el uso de combustibles fósiles se ha masificado a nivel mundial, se ha incrementado la importancia de aspectos medio ambientales asociados a sus usos. Debido a esto, la industria del bioetanol se ha desarrollado rápidamente en los últimos años (1). En la actualidad la biomasa surge como fuente de energía alternativa importante y renovable. Se puede producir a partir de diferentes sustratos o residuos como son los agrícolas, forestales, animales, agroindustriales, sólidos urbanos y cultivos energéticos, lo que permitiría obtener energía de manera diversificada sin afectar directamente otras necesidades importantes como la alimentación.

El bioetanol, el cual es un biocombustible, se obtiene de la fermentación de azúcares, que provienen de fuentes directas que puedan proveer del sustrato fácilmente, por lo tanto la biomasa vegetal cumple con este requisito. Como principal fuente de almacenamiento de energía los vegetales tienen el almidón que es una cadena larga de glucosa presente principalmente en raíces, tubérculos, frutas y semillas; pero también como polisacárido de glucosa contiene la celulosa, que es parte del tejido de sostén de los vegetales difícilmente digerible (2, 3).

Es sabido hoy en día que existe bioetanol de primera y de segunda generación; el bioetanol de primera generación se obtiene de la fermentación de vegetales que contengan un alto porcentaje de almidón y/o

[1] Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Coahuila, Unidad Torreón, carretera Torreón-Matamoros km 7.5, C.P. 27000. Torreón, Coahuila, México. eduardormzzamarripa@hotmail.com
[2] Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, C.U. Cerro de las campanas s/n Col. Las Campanas, C.P. 76010. Querétaro, Querétaro, México. aldo.amaro@uaq.edu.mx

azúcares, concentrado en vegetales comestibles. En cambio el bioetanol de segunda generación proviene de fuentes no comestibles que contienen un alto porcentaje de celulosa, por lo tanto no afecta mayormente otras áreas socio-económicas; contiene un gran potencial energético, debido a su alto contenido de azúcares de 5 y 6 carbonos, cercano al 66% de la masa total que eventualmente puede ser hidrolizado y fermentado para producir bioetanol (2).

El uso de material lignocelulosico es el más prometedor en la producción de bioetanol de segunda generación, si es que consideramos su gran capacidad y bajo costo (4). Los materiales para la producción de bioetanol de segunda generación pueden ser madera, residuos forestales o de agricultura, así como aparte de materiales lignocelulosicos se pueden utilizar desechos de algunas empresas del área alimenticia (3), lo cual puede ser una solución, ya que se podrían evitar conflictos entre el uso de comida para las personas y el uso de residuos industriales, conflictos que hoy en día son un problema (5), y si se superan podrían solucionar la demanda del uso de combustibles fósiles, creando nuevas variantes de biocombustibles.

METODOS Y MATERIALES

1.- Producción de biomasa.

Se preparó un medio para la producción de biomasa con 60 g/L de azúcar obtenida de una empresa chocolatera (sacarosa), 6 g/L de sulfato de amonio y 0.6 g/L de fosfato de sodio, se inoculo con levadura liofilizada y se dejó durante tres días con un sistema de aeración. Al término de este tiempo se decantó la botella y luego se centrifugo lo que quedo en la botella para así obtener la levadura.

2.- Inmovilización de levadura.

Para la inmovilización de levadura se prepararon 200 ml de una solución de alginato al 1.5%, luego se tenían que pesar 1% de peso seco de levadura del total de la solución de alginato (2gr) pero como la levadura tiene entre 10-12% de humedad, entonces se pesó el 10% del total de solución de alginato, lo cual equivale a 20 gr de peso húmedo de levadura, la cual fue agregada a esta solución para posteriormente inmovilizarla. La técnica dice se debe dejar caer gota por gota del medio a una solución de cloruro de calcio al 3% hasta que se formen las perlas de levadura inmovilizada. La eficiencia de la técnica es del 50 %. El peso final de perlas de levadura fue de 82.5 g.

3.- Cinética de crecimiento.

Para la cinética de crecimiento de 56 horas, se prepararon 750 ml de un medio de sacarosa (236 g/L), sulfato de amonio (27.35 g/L) y fosfato de sodio (1 g/L). De este medio se repartieron 250 ml en tres botellas (botellas A, B y C). Las botellas se inocularon con levadura (27.5 g en cada botella); se tomaron muestras para las siguientes mediciones:

1. *Azúcares reductoras.* Uno de los métodos más acordes y con mejor resultados en la determinación de los azucares con carácter reductor, es el método DNS. El procedimiento se basa en una reacción redox que ocurre entre el reactivo DNS y los azúcares reductores presentes en la muestra (6). La técnica dice que se tiene que centrifugar las muestras, se toma 0.5 ml de sobrenadante y 0.5ml de reactivo dns (relación 1:1) se ponen las muestras en una termoplaca durante 10 minutos y después se dejan enfriar en hielo, se colocan las muestras en una microplaca y se lee absorbancia a 570 nm. Para las muestras se tomó 1 ml cada 4 horas, donde solo la primer toma fue a las ocho horas después de inocularse.

2. *Azúcares totales.* Para llevar cabo el método se mezclan 50 µl de la muestra con 180 µl de ácido sulfúrico concentrado y 30 µl de fenol al 5 %, se agitan y se dejan reposar 30 minutos, finalmente se lee en una microplaca de 96 pozos a 490 nm (Masuko *et al.,* 2005*)*.

3. *Proteína.* El método de Bradford, cuantifica la unión de un colorante a una proteína desconocida y la compara contra diferentes cantidades de una proteína estándar. El complejo que se forma (colorante-proteína) presenta un máximo de absorción a 595 nm, ya que a esta longitud de onda se puede medir este complejo (7). La técnica dice que la relación de la muestra con el reactivo de Bradford es 1:5.

4. *CO_2.* Para cada toma de muestra se utilizaba una "trampa de CO_2" el cual es un recipiente con 10 ml de hidróxido de sodio (NaOH) al 1 N, también se incluyó un blanco, que sirvió para calcular la cantidad de CO_2 respirado (8). Las reacciones se muestran en la figura 1.

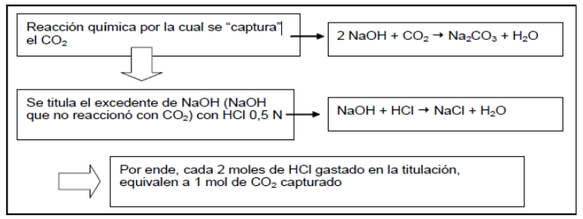


Fig. 1 Reacciones involucradas en la captura y cuantificación de CO_2

RESULTADOS

A continuación se presentan los resultados en tablas de las técnicas realizadas durante la cinética de crecimiento.

Tabla 1. Concentraciones de azúcares reductores

Tiempo (hrs)	Conc. (mM)	Conc. g/L
0	0.21	0.0378
8	47.31	8.5158
12	64.5	11.61
16	75.61	13.6098
20	69.59	12.5262
24	69.14	12.4452
28	76.65	13.797
32	73.37	13.2066
36	66.47	11.9646
40	4.899	0.88182
44	5.078	0.91404
48	4.977	0.89586
52	5.527	0.99486
56	4.705	0.8469

Tabla 2. Determinación azúcares totales.

Tiempo (hrs)	Conc. (mM)	Conc. g/L
0	331.4	113.3388
8	203	69.426
12	211.6	72.3672
16	243.8	83.3796
20	241	82.422
24	353.6	
28	219.8	75.1716
32	133.4	45.6228
36	159.4	54.5148
40	114.8	39.2616
44	107.2	36.6624
48	285	
52	152.4	52.1208
56	219.2	74.9664

Tabla 3. Resultados cuantificación de proteína

Tiempo (hrs)	Conc. (mM)	Conc. g/L
8	2.565	1.024
12	2.468	1.467
16	2.203	0.849
20	2.05	0.485
24	1.274	0.529
28	2.444	1.365
32	2.822	0.86
36	2.275	0.688
40	2.219	0.392
44	2.17	0.685
48	2.902	1.149
52	2.89	0.324
56	1.642	4.311

En cuanto a la cuantificación de CO_2, se sacaron promedios (tabla 4) de cada valor para así poder obtener el error y graficarlo (figura 2), para luego este modelo matemático pueda servir para futuras investigaciones.

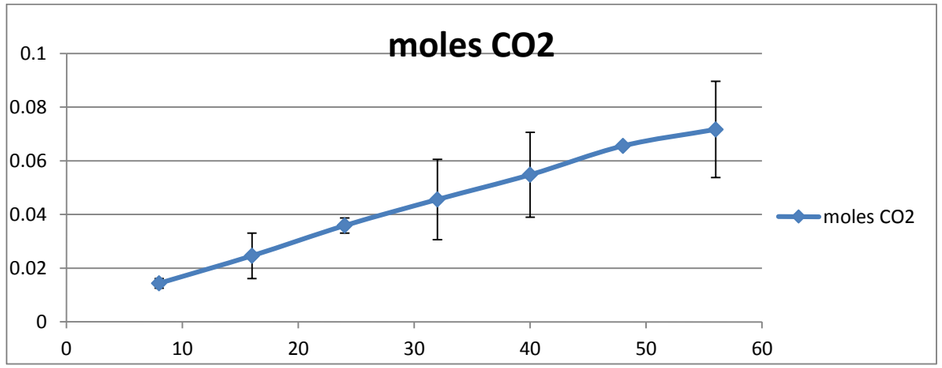


Fig. 2 Gráfica para el modelo matemático de la cuantificación de CO_2

Tabla 4 Cuantificación de CO_2 gastado para realizar un modelo matemático.

	ml de HCl gastado									
Tiempo (hrs)	**a**	**b**	**c**	**promedio**	**error**			**moles HCl**	**moles CO2**	**desv est**	
8	0.8	1	1	0.933333333	0.115470054	0.123717915	0.933333333	0.028670689	0.014335345	0.001773539	0.123717915
16	0.8	0.8	0.4	0.666666667	0.230940108	0.346410162	1.6	0.049149753	0.024574877	0.008512987	0.346410162
24	0.7	0.8	0.7	0.733333333	0.057735027	0.078729582	2.333333333	0.071676723	0.035838362	0.002821539	0.078729582
32	0.7	0.8	0.4	0.633333333	0.2081666	0.328684105	2.966666667	0.091131834	0.045565917	0.014976793	0.328684105
40	0.7	0.7	0.4	0.6	0.173205081	0.288675135	3.566666667	0.109562991	0.054781496	0.015814056	0.288675135
48	0.7	0.7	0.7	0.7	1.35974E-16	1.94249E-16	4.266666667	0.131066008	0.065533004	1.27297E-17	1.94249E-16
56	0.4	0.5	0.3	0.4	0.1	0.25	4.666666667	0.143353447	0.071676723	0.017919181	0.25

CONCLUSIONES

Podemos concluir, gracias a los resultados obtenidos, que el azúcar utilizado (sacarosa de desecho) es una buena fuente de sustrato para la producción de bioetanol, ya que si se produce este alcohol, lo cual es el objetivo primordial, pero aún hay muchas cosas que mejorar.

Por ejemplo como podemos ver en las tablas de los resultados, es muy irregular la producción de bioetanol, esta no tiene una secuencia lógica, para lo cual se debe seguir trabajando y realizar otro tipo de fermentaciones hasta encontrar la que mejor se adapte y mayor etanol produzca, así como encontrar los medios para que durante la producción del bioetanol se utilicen los mínimos recursos y se ahorren costos.

BIBLIOGRAFÍA

1) Revista de la Facultad de Ingenieria. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. “Ingenerare” NÚMERO 26/2012.

2) SEBASTIÁN ANDRÉS JURI AWAD. Sacarificación y fermentación simultánea para la producción de bioetanol de segunda generación, mediante pretratamientos alternativos: líquidos iónicos reciclados y hongos de pudrición blanca. Santiago de Chile, Enero del 2011.

3) Mats Galbe, Guido Zacchi. 2007. “Pretreatment of Lignocellulosic Materials for Efficient Bioethanol Production” Volume 108 of the series Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology pp 41-65 24 July 2007.

4) Mustafa Balat Havva Balat Cahide Öz. 2008. Progress in bioethanol processing. Progress in Energy and Combustion Science, Volume 34, Issue 5, October 2008, Pages 551–573

5) Seungdo Kim, Bruce E. Dale 2004. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues Biomass and Bioenergy. Volume 26, Issue 4, April 2004, Pages 361–375

6) Florentino G.S., Gutiérrez F.M., Rueda A.N., Rodríguez R.J. 1994. “La Inmunología En El Diagnóstico Clínico”, CEJA, Colombia, ISBN: 958-9176-24-0. Pp 68.

7) German Antonio Giraldo, Nelsy Loango, Clara María Mejía, 2010. Laboratorio de Bioquímica: Una visión Práctica. Ediciones ELIZCOM, ISBN: 978-958-99325-6-8. p 108.

8) Cecilia Tognetti. Uso de una técnica sencilla de determinación de CO_2 en primer año de la carrera universitaria de biología. Cátedra de Biología General. Universidad Nacional del Comahue. Centro Regional Universitario. Pp 24-25.

EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN A CONTAMINANTES ORGÁNICOS PERSISTENTES (COPs) EN TORTUGA LORA (*Lepidochelys kempii*) EN TAMAUILIPAS, MÉXICO

Silvia Gabriela Rangel Duarte[1] y Guillermo Espinosa Reyes[2]

RESUMEN

Las tortugas marinas son una especie importante debido a que ayudan a mantener sanos los océanos y playas en donde arriban. Sin embargo su población se ha visto reducida debido a la caza, a barcos pesqueros y otro factor importante la contaminación. *Lepidochelys kempii* es la única tortuga endémica del Golfo de México, esta especie arriba casi exclusivamente en Rancho Nuevo, Tamaulipas y se encuentra en peligro de extinción. El objetivo de este trabajo fue determinar las concentraciones de Contaminantes Orgánicos Persistentes (COPs) en plasma de *L. kempii*. Se registró la presencia de siete contaminantes (DDT, DDE, DDD, endosulfan, atrazina, PCB 52 y 153), el patrón de DDT y sus metabolitos y del endosulfan es que existen menores concentraciones en las muestras del 2016 respecto a las de 2015, los PCBs se mantienen en concentraciones similares para ambos años, la atrazina se incrementa significativamente de un año a otro. El hecho de encontrar concentraciones de contaminantes en plasma de tortugas podría representar un riesgo para la sobrevivencia de la especie.

ABSTRACT

Sea turtles are an important species because they help maintain healthy oceans and beaches where arrive. But their population has been reduced due to hunting, fishing boats and other major pollution factor. Kemp's ridley sea turtle is the only endemic turtle Gulf of Mexico, this species up almost exclusively in Rancho Nuevo, Tamaulipas and is in danger of extinction. The aim of this study was to determine the concentrations of Persistent Organic Pollutants (POPs) in plasma L. *kempii*. the presence of seven (DDT, DDE, DDD, endosulfan, atrazina, PCB 52 y 153) pollutants was recorded, the pattern of DDT and its metabolites and endosulfan is that there are lower concentrations in samples from 2016 compared to 2015, PCBs remain at similar levels for both years, atrazine increases significantly from 2015 to 2016. The fact of finding contaminant concentrations in plasma of turtles could pose a risk to the survival of the species.

Palabras clave: Ecotoxicología, COPs, *Lepidochelys kempii,* PCBs

INTRODUCCIÓN

Los océanos son tan bastos y profundos que anteriormente se asumía que sin importar la cantidad de basura y químicos que se arrojaran en ellos, los efectos serian mínimos. Aquellos que proponen usar los océanos para arrojar deshechos tienen la frase de *que "la solución a la contaminación, es la dilución"*. Hoy en día podemos observar islas de basura, principalmente plásticos en descomposición, flotando en el océano lo cual ha llevado a los ecosistemas marinos al borde del colapso (National Geographic, 2015).

Los estuarios y aguas costeras reciben muchos de los aproximadamente 70 000 químicos sintéticos que están en uso comercial. Estos químicos, que entran a estas aguas por un sin número de formas, como derrames, desagües urbanos, y descargas municipales e industriales, consisten en hidrocarburos como el petróleo, compuestos clorados, pesticidas, y metales (Mallins, 1984). Estas actividades dan como resultado la destrucción y pérdida de estos hábitats. Los contaminantes que tienen mayor impacto en la salud de los

[1] Facultad de Química, UAQ, Cerro de las campanas s/n, las campanas, 76010, Querétaro, Querétaro, gabirand@hotmail.com
[2] Universidad Autónoma de San Luis Potosí, CIACYT-Facultad de Medicina, Sierra Leona #550, Lomas segunda sección, SLP, SLP, guillermo.espinosa@uaslp.mx

estuarios son los nutrientes (eutrofización), patógenos (bacterias, virus y hongos) y los químicos (NOAA, 2008). Los contaminantes químicos son aquellos creados por el hombre o producidos accidentalmente en un proceso industrial, entre estos, hay una clase de contaminantes llamados Contaminantes Orgánicos Persistentes (COPs) (Ngwa, 2015). La mayoría de los COPs fueron ampliamente usados durante el boom de la producción industrial después de la segunda guerra mundial, cuando miles de químicos sintéticos fueron introducidos para uso comercial, usados contra vectores para combatir enfermedades, en la agricultura, y la industria (Kovner, 2015).

Los COPs son clasificados generalmente en cinco tipos los cuales incluyen policloro-dibenzopara dioxinas (PCDD) y policloro-dibenzo furanos (PCBF), bifenilos policlorados (PCBs), pesticidas organo-clorados (OC), y retardante de flama polibromado (PBDE). Los primeros tres son también conocidos como compuestos organo-clorados. Los compuestos organo-clorados fueron prohibidos en los 70s debido a su toxicidad, liposolubilidad, persistencia en el ambiente y su potencial de bioacumulación hacen a estos compuestos muy tóxicos (Ngwa, 2015). Estos contaminantes orgánicos son resistentes a la degradación ambiental a través de procesos químicos, biológicos y fotoliticos lo cual les da la habilidad de persistir en el ambiente, ser capaces de transportarse a largas distancias, bioacumularse en tejido animal y humano, bioacumularse en la cadena alimenticia. El potencial de bioacumulación de estos compuestos es debido su estructura halogenada, lo cual provoca que los COPs puedan verse biomagnificados, lo que quiere decir que se produce un incremento en la concentración del contaminante en las posiciones tróficas superiores dentro de la cadena alimenticia (Hong, 2015). Esto puede tener impacto potencialmente significativo en la salud humana y en el ambiente (Ngwa, 2015) debido a que en su mayoría son sustancias potencialmente carcinogénicas y mutagénicas (Zelnicková, 2015).

Varios estudios han ligado la exposición a COPs a enfermedades, o anormalidades en un sin número de especies silvestres, como peces, aves y mamíferos. Es por esto que los animales pueden actuar como biomonitores. Ya que con ellos se pueden monitorear anormalidades, como en su comportamiento, defectos de nacimiento, o disminución de la población de la especie.

Los animales tienen un largo tiempo sirviendo como monitores y centinelas de peligros ambientales. Desde el tiempo de los romanos, los mineros de carbón eran conscientes de la gran sensibilidad de las aves a la acción venenosa del monóxido de carbono y los llevaban consigo bajo tierra para advertirles del inminente peligro (Fox, 2001). Por otro lado los biomonitores son organismos silvestres que tienen respuestas biológicas a una agresión de un xenobiótico. De acuerdo con Ilizaliturri *et al*., (2011) al seleccionar un biomonitor se debe considerar lo siguiente:

- Tipo de contaminantes presentes en el sitio. Se debe conocer la toxicocinética (la velocidad de cambio de la concentración de las sustancias tóxicas dentro del organismo) y la toxicodinamia (dónde y cómo se lleva acabo el efecto tóxico dentro del organismo) de los contaminantes.
- Las probables rutas de exposición (ingesta, inhalación y dérmica) que dependerán del comportamiento ambiental de los contaminante. Una vez determinados los contaminantes y las rutas de exposición, es posible determinar qué especies son las más expuestas.
- Seleccionar las especies de biología bien conocida, esto se puede determinar en base a literatura. Se recomienda hacer un muestro poblacional preliminar para establecer si la especie escogida es abundante.
- Las especies seleccionadas deben ser de fácil captura y manejo.
- Realizar un análisis documental básico de los componentes de la red trófica que existen en el sitio de estudio, con la finalidad de seleccionar especies preferentemente ubicadas en diferentes niveles de la red trófica.

Existen tres tipos de biomarcadores: de susceptibilidad, de respuesta (o efecto) y de exposición. En el presente trabajo se trabajara con un biomarcador de exposición. Éstos se refieren a un compuesto exógeno (o un metabolito) dentro del organismo que refleja la exposición de éste a un xenobiótico. El análisis se

realiza en fluidos corporales, sangre y orina principalmente, o incluso aire espirado. En el caso de tóxicos acumulativos, la dosis interna puede también reflejar la cifra de agente tóxico almacenado en uno o varios compartimentos corporales. Por ejemplo, la concentración de bifenilos policlorados (PCBs) en sangre refleja la cifra acumulada en los principales órganos de depósito (tejido graso) (Gil, 2000). En este caso se evaluara la existencia de COPs en el plasma de la tortuga lora (*Lepidochelys kempii*).

La tortuga lora (*L. kempii*) es de las cinco especies de tortugas que recorren el Golfo de México, es la tortuga más pequeña mide entre 58.5 y 70 cm y pesa en promedio unos 45 kg. Cuenta con un caparazón casi circular. Las tortugas jóvenes son de color gris pero cambian de color al madurar. Las tortugas adultas son de color verde oliva en la parte superior y amarillo de la parte de abajo. Se alimenta de crustáceos (como cangrejos), invertebrados marinos y plantas, en especial cuando son jóvenes. Habitan principalmente en aguas costeras de fondos arenosos y lodosos ricos en crustáceos. Estas tortugas alcanzan la madurez entre los 10 y 15 años. Y en promedio dos veces al año, las hembras salen a tierra durante el día para anidar. La anidación en esta especie es generalmente sincronizada, con un gran número de hembras emergiendo del océano al mismo tiempo, en lo que se conoce como arribadas. Los machos una vez que eclosionan pasan el resto de su vida en el océano.

Esta especie se encuentra principalmente en el golfo de México. En donde tiene un lugar preferido para anidar en Rancho Nuevo, Tamaulipas. También lo hace, aunque en menor medida, en Veracruz y Campeche. En 1947 desovaban alrededor de 42 000 hembras en Tamaulipas, pero este número ha ido decreciendo por factores como la recolección de huevos y la pesca excesiva para el consumo de carne, los cuales ya están prohibidos. Como amenazas actuales se encuentra la captura incidental por barcos camaroneros, el comercio ilícito, derrames de aceites e hidrocarburos, ingesta de plásticos, perdida se su hábitat por el desarrollo humano en las costas. Esta especie se encuentra desde 1970's en peligro de extinción. Desde el establecimiento de la reserva natural Rancho Nuevo, Tamaulipas se han ido recuperado gradualmente las poblaciones de tortuga lora, por ejemplo en 2009 se obtuvo un registro de 5 200 hembras que arribaron en dos días a las playas de Rancho Nuevo. (CONABIO, Travel by mexico, 2011)

JUSTIFICACIÓN

La tortugas marina juegan un rol vital en el mantenimiento de los océanos, manteniendo los arrecifes de coral y los lechos de algas marinas, transporta nutrientes del océano a las playas y a las dunas costeras (Wilson, 2010). Además socialmente juega un papel muy importante como parte de leyendas, de la economía, investigación, recreación, conservación, elaboración de artesanías y hasta medicinal (Mendoza, 2015).

De las siete especies de tortugas marinas que habitan los mares del mundo seis vienen a anidar en las costas mexicanas y una, la Tortuga lora o *kempii*, tiene como único hábitat el Golfo de México y en aguas tropicales del Atlántico, por lo tanto es la tortuga marina más escasa del mundo (Travel by Mexico, 2011), y como ya se mencionó habita particularmente en Tamaulipas. Es una especie que está en un riesgo extremadamente alto de desaparecer en el futuro cercano, debido a factores como la caza y recolección de sus huevos, que ahora ya están restringidos, actualmente una de las causas por las que se ve amenazada son por capturas incidentales por barcos pesqueros, y la pérdida o alteración de su hábitat. Y además de estos factores cabe destacar la adición de contaminantes como los COPs a su ambiente, los cuales pueden tener efectos perjudiciales en la salud de la tortuga y contribuir a la disminución de la población. Los COPs han sido detectados en tejidos de tortugas marinas de todo el mundo (Camacho, 2014; Mendoza, 2015; Merwe, 2010; Ragland, 2011). Esto debido principalmente a que estos compuestos que se degradan difícilmente, tienden a acumularse en tejido adiposo, el cual es abundante en las tortugas marinas, además la concentración de estos se biomagnifica a través de la cadena alimentaria. Otra vía por la cual pueden adquirir estos contaminantes las tortugas es por la ingestión de agua contaminada y por exposición dérmica (cloaca), otra vía que es de las más sutiles es la transferencia de la madre y la acumulación de productos químicos en los huevos de los medios de anidación contaminados.

Existen pocos trabajos con tortugas marinas que demuestren efectos por exposición a contaminantes, sin embargo en tortugas dulceacuícolas se han observado daños como la feminización de la morfología externa de tortugas del Lago Ontario, donde se reportan concentraciones de plaguicidas organoclorados (OCP) y bifenilos policlorados (PCBs) concluyendo que las concentraciones de PCBs en el ambiente pueden actuar como disruptores endocrinos y son capaces de revertir el sexo gonadal en tortugas (Mendoza, 2015).

Es por esto que el presente trabajo pretende definir si es o no la contaminación química, puntualmente por Contaminantes Orgánicos Persistentes, parte de los factores críticos que provocan la disminución de esta Tortuga marina.

Objetivo
Cuantificar las concentraciones de Contaminantes Orgánicos Persistentes en plasma de tortuga de Rancho Nuevo, Tamaulipas, México.

METODOLOGÍA

Para la extracción de los Compuestos Orgánicos Persistentes en plasma, se usó la técnica de extracción asistida por Sonda Ultrasónica focalizada la cual puede ser aplicada en cualquier matriz ambiental y biológica. La determinación e identificación de los COPs se realizó mediante Cromatografía de Gases masas siguiendo la técnica establecida por Flores-Ramírez et al., (2015).

RESULTADOS

En el Cuadro 1 se muestran los promedios de las concentraciones de los COPs registrados en plasma de tortugas lora. Se cuantificaron seis COPs, éstos fueron PCB 52, PCB 153, atrazina, a-endosulfan, DDT, DDE y DDD.

Cuadro 1.- Niveles de COps registrados en plasma de tortugas en 2015 y 2016

	Atrazina	Endosulfan	DDT total	PCBs total	COPs total
2015	10,05	12,61	11,95	12,17	46,78
2016	41,72	5,06	9,91	12,18	68,87

DISCUSIÓN

El DDT es un pesticida que fue usado ampliamente en el pasado para controlar insectos en la agricultura e insectos que transmiten enfermedades como el dengue y paludismo. Su uso se ha prohibido por el daño causado a la vida silvestre, aunque hay países en donde aún se utiliza. El DDE y DDD entran en el ambiente como producto de la degradación de DDT. El DDT y sus subproductos en teoría se degrada fácilmente en el aire por la luz solar, pero al evaporarse puedes ser transportados largas distancias en la atmosfera, y depositarse en suelo donde se adhiere firmemente y puede tardar decenas de años en degradarse. Además las partículas de suelo que contienen los contaminantes pueden llegar a entrar a ríos y por tanto llegar a desembocar en el mar, en donde estos contaminantes pueden irse al sedimento donde puede ser absorbido por las algas o acumularse en tejido graso de los organismos que habiten en este caso el océano, como pueden ser peces, moluscos, y como vemos en este caso la tortuga *L. kempii*, en donde por consumo de otro organismo o planta contaminado se biomagnifica la concentración del contaminante y puede llegar a niveles miles de veces más altos que en el agua (ATSDR, 2002).

Los PCBs fueron usados ampliamente como refrigerantes y lubricantes en transformadores, condensadores y otros aparatos eléctricos. Su producción ceso a raíz de evidencia de que se acumulan en el ambiente y

que pueden causar efectos perjudiciales. Los PCBs entraron al agua, aire y suelo durante su manufactura y uso. También entraron debido a derrames y escapes accidentales durante su transporte, escapes e incendios en transformadores, condensadores y otros productos que los contenían, y a través de vertederos. Al igual que el DDT y sus subproductos, los PCBs pueden semivolatilizarse y ser transportados largas distancias (efecto saltamontes). Por lo que se encuentran en prácticamente todo el planeta. Y al entrar al agua los PCBs pueden ser transportados por las corrientes, pueden adherirse a los sedimentos, y, como ya se mencionó con el DDT, se acumulan en plantas y en organismos como peces, crustáceos, moluscos, mamíferos marinos, en tortuga. En donde por la cadena trófica van biomagnificandose de un organismo a otro (ATSDR, 2000).

Y estos niveles de contaminación en la tortuga pueden llevar a afectar adversamente la reproducción como lo menciona De Andrés et. al., (2016) en un estudio a la tortuga laud (*Dermochelys coriacea*) en donde se menciona que los COPs pueden tener efectos negativos en la reproducción, como la reducción en el número de crías. Además de mencionar que se ha encontrado evidencia de que los PCBs se transfieren de la madre al huevo, pudiendo estos afectar el desarrollo embrionario y por lo tanto disminuir así el número de crías. Y como mencionan Ming.ch'eng et. al., (2016), los PCBs también pueden afectar la determinación del sexo del embrión, se ha visto en experimentos en los que se incuban huevos de tortugas de agua dulce a temperatura para que se produzcan machos pero al ser expuestos a PCBs cambian de sexo a hembras, y al exponer a PCBs huevos que están en la temperatura para que se produzcan hembras se producen malformaciones en los oviductos de las tortugas.

Es debido a estos efectos adversos de los COPs que es importante monitorear las concentraciones que *tiene L. kempii*, ya que como se ha mencionado es una especie en peligro de extinción, altas concentraciones de estos contaminantes puede llevar a la disminución de esta especie la cual juega un papel importante en el mantenimiento de los océanos y playas. Y como podemos observar en el Cuadro 1 tanto en 2015 como 2016 las concentraciones de DDE y DDD son mayores que las de DDT, por lo que podemos inferir que es DDT residual y que se está degradando, por lo que habría que monitorear que estos niveles sigan así, y en caso de aumentar DDT querría decir que de alguna manera está ingresando nuevamente más de este contaminante al medio, y habría que buscar la ruta de exposición de las tortugas, e intentar cesar esta exposición. Y de igual forma para los PCBs, se tendría que monitorear que sus niveles siguen bajando, así se estaría seguro de que no se están exponiendo aún más a la tortuga a estos contaminantes.

CONCLUSIONES

Se debe monitorear las concentraciones de COPs en plasma de *L. kempii* e identificar las fuentes, con la finalidad de minimizar o evitar la exposición de la fauna silvestre que habita en las costas del Golfo de México a éstos contaminantes, de lo contrario los COPs pueden ocasionar efectos adversos en su salud comprometiendo la supervivencia de la especie.

BIBLIOGRAFIA

Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR).(2002). Reseña Toxicológica de los DDT, DDE y DDD (en inglés). Atlanta, GA: Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., Servicio de Salud Pública.

Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. (ATSDR). 2000. Reseña Toxicológica de los Bifenilos Policlorados (BPCs) (en inglés). Atlanta, GA: Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., Servicio de Salud Pública.

Camacho M, Boada L, Orós J., López P., Zumbado M, Almeida M., y Luzardo O. (2014). Monitoring organic and inorganic pollutants in juvenile live sea turtles: Results from a study of *Chelonia mydas* and *Eretmochelys imbricata* in Cape Verde. Science of the total environment, 304.

CONABIO. (s.f.). Tortuga lora (Lepidochelys kempii). 28 junio de 2016, de Naturalista Sitio web: http://naturalista.conabio.gob.mx/taxa/73844-Lepidochelys-kempii

De Andrés E., Gómara B., Gonzáles-Paredes D., Ruíz-Matín J., y Marco A. (2016). Persisten organic pollutant level in eggs of leatherback turtles (Dermochelys coriacea) poin to a deacrese in hatching success. Chemosphere 146, 354-361.

Flores-Ramírez R., Medellín-Garibay S., Castillo C., Ilizarritu-Hernández C., Zuki-Orozco B, Batres-Esquivel L., Díaz-Barriga F. (2015). Application of Focused Ultrasound-Assisted Extraction to Determination of Persistent Organic Pollutants (POPs) in soil samples. Bull Environ Contam Toxicol, 207.

Fox G. (2001). Wildlife as sentinels of human effects in great lakes St. Lawrence Basin. Environmental health perspectives, 853.

Gil F. (2000). El papel de los biomarcadores en toxicología humana. Departamento de medicina legal y toxicología; 17(1):19-26

Gutiérrez M., y Droguet M. (2002). La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes del mal olor. Boletín intexter (U.P.C.), 35

Hong M., Lumibao J., Mistry P., y Hoh E. (2015) Fish Oil Contaminated with Persistent Organic Pollutants Reduces Antioxidant Capacity and Induces Oxidative Stress without Affecting Its Capacity to Lower Lipid Concentrations and Systemic Inflammation in Rats. The journal of nutrition, 939.

Ilizaliturri C., Cilia V., González D., Mejia J., Costilla R., y Espinosa G. (2011). Programa de biomonitoreo de sustancias toxicas, persistentes y bioacumulables en biota para los sitios PRONAME. Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático – SEMARNAT; 119-120.

Kovner K. (2015). Persistent organic pollutants: a global issue, a global response. U.S. Environmental protection agency. Recuperado de: https://www.epa.gov/international-cooperation/persistent-organic-pollutants-global-issue-global-response

Malins D., McCaln B., Brown D., Chan S., Myers M., Landahl J., Prohaska P., Friedman A., Rhodes L., Burrows D., Gronlund W., y Hodgins H. (1984). Chemical pullutants in sediments and diseases of Bottom-Dwelling fish in Puget Sound, Washington. Environmental conservation division, 705.

Mendoza S. (2015). Determinación de Contaminantes Orgánicos Persistentes (COP) en tortuga golfina (Lepidochelys olivácea) en la Escobilla, Oaxaca, México. Universidad Autónoma de San Luis Potosi.

Merwe J., Hodge M., Olszowy H., Whittier J., y Lee S. (2010). Using blood samples to estimate persistent organic pollutants and metal in green sea turtles (*Chelonia mydas*). Marine pollution bulletin.

National Geographic. (s.f.). Marine pollution. Obtenido de: http://ocean.nationalgeographic.com/ocean/explore/pristine-seas/critical-issues-marine-pollution/

Ngwa E., Kengne A., Atogho B., Mato E., y Sobngwi E. (2015). Persistnet organic pollutants as risk factor for type 2 diabetes. Diabetology & metabollic syndrome.

NOAA (2008). Human disturbances to estuaries. Recuperado de: http://oceanservice.noaa.gov/education/kits/estuaries/estuaries09_humandisturb.html

Ragland J., Arendt M., Kucklick J., y Keller J. (2011). Persistent organic pollutants in blood plasma of satellite-tracked adult male loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). Environmental toxicology and chemestry.

Travel by Mexico. (2011). Protección y Conservación de Tortugas Marinas en México. 28 de junio de 2016, de travelbymexico.com Sitio web: http://www.travelbymexico.com/blog/9823-proteccion-y-conservacion-de-tortugas-marinas-en-mexico/

Wilson E., Miller K., Allison D., y Magliocca M. Why healthy oceans need sea turtles: the importance of sea turtles to marine ecosistems. Oceana. Disponible en: www.oceana.

Zelnícková L., Svobodová Z., Marsálek P., y Dodsíková R. (2015). Persistent organic pollutants in muscle of fish collected from the Nové Mlyny reservoir in Southern Moravia, Czech Republic. Environmental monitoring and assessment, 187.

GRAVITACIÓN CUÁNTICA Y LOS NÚMEROS PRIMOS DEL 18° VERANO DE LA CIENCIA REGIÓN CENTRO

Oliver Josué Rentería López[1] y Oscar Jasel Berra Montiel[2]

RESUMEN

Una propuesta para construir una teoría de la gravitación cuántica es a través de la cuantización de lazos, donde el espacio-tiempo es discretizado. La Hipótesis de Riemann es una conjetura sobre la distribución de los ceros complejos de la función zeta de Riemann, en donde la parte imaginaria se relaciona con la distribución de los números primos. Existe una propuesta en el que los valores de la parte imaginaria de los ceros complejos corresponden a los eigenvalores asociados a un Hamiltoniano de un sistema cuántico. En éste trabajo analizaremos, mediante la cuantización polimérica, el comportamiento de las funciones de onda de un Hamiltoniano cuyo espectro está intrínsecamente relacionado con la distribución de los ceros de la función zeta de Riemann.

ABSTRACT

A proposal to construct a theory of quantum gravity is through loop quantization where spacetime is quantized. The Riemann Hypothesis is a conjecture about the distribution of the complex zeros of the Riemann zeta function, where the imaginary part is related to the distribution of prime numbers. There is a proposal in which the values of the imaginary part of the complex zeros are the corresponding eigenvalues of a Hamiltonian of a quantum system. In this paper we analyze, using polymeric quantization, the behavior of the wave functions of a Hamiltonian whose spectrum is intrinsically related to the distribution of the zeros of the Riemann zeta function.

Palabras clave: Dinámica Hamiltoniana, Cuantización Polimérica, Hipótesis de Riemann.

INTRODUCCIÓN

Desde hace mucho se ha intentado unificar la relatividad general con la mecánica cuántica. Existen cuatro fuerzas fundamentales en el universo que son las siguientes: gravitatoria, electromagnética, nuclear fuerte y nuclear débil. La interacción gravitatoria es una fuerza de atracción entre dos objetos cualesquiera del universo y cuya fuente depende de la energía. Aunque el alcance de dicha fuerza es infinita, la magnitud de la fuerza es muy pequeña debido a la magnitud de la constante universal de gravitación. La fuerza electromagnética afecta a los cuerpos eléctricamente cargados, y puede ser de atracción o repulsión dependiendo de los signos de la carga. La magnitud de ésta fuerza es mayor que en el caso gravitatorio, y el alcance también es infinito. La fuerza nuclear fuerte es la responsable de mantener unidos a los núcleos atómicos. Aunque su alcance es muy pequeña, la fuerza es más intensa que en el caso electromagnético. Finalmente, la fuerza nuclear débil es la responsable de la desintegración beta de los neutrones. Su intensidad es menor que la electromagnética y su alcance es aún menor que la nuclear fuerte.

La relatividad general, desarrollada por el mismísimo Albert Einstein, es una teoría del campo gravitatorio. Las fuerzas anteriormente mencionadas, exceptuando la gravitatoria, pueden describirse en términos de la física cuántica. Hoy en día el problema está en describir la gravedad en términos de la mecánica cuántica,

[1] Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Facultad de Ciencias; Lateral Av. Salvador Nava s/n., Col. Lomas, C.P: 78290, San Luis Potosí, S.L.P., oliver.renteria1995@gmail.com
[2] Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Facultad de Ciencias; Lateral Av. Salvador Nava s/n, Col. Lomas, C.P: 78290, San Luis Potosí, S.L.P., jberra@fc.uaslp.mx

algo que resulta ser difícil porque la descripción de las leyes de la mecánica cuántica no son compatibles con la descripción matemática de la gravedad. Existen varias propuestas de abordar dicho problema, entre la cuales una de las más prometedoras se encuentra la cuantización de lazos.

Antes de entrar con la física cuántica en la propuesta a estudiar, se necesita examinar la Hipótesis de Riemann. La función zeta de Riemann se define de la siguiente manera:

$$\zeta(s) = \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^s} \tag{1}$$

De la ecuación 1) el parámetro s puede ser complejo. Se requiere que la parte real de s sea mayor que 1, dado que para dichos valores la serie es convergente. Si s es igual a 1, entonces la serie es divergente. Los ceros triviales de la función zeta de Riemann son los pares negativos, es decir, -2, -4, -6, y así sucesivamente (Haran, 2014). Ahora bien, los ceros no triviales de la ecuación 1), de acuerdo a la hipótesis de Riemann, tienen como parte real ½ (Riemann, 1859), y parte imaginaria un valor E. De tal manera que los ceros no triviales de la ecuación 1) tienen la siguiente forma:

$$s = \frac{1}{2} + iE \tag{2}$$

A lo anteriormente descrito se le conoce como una de las formulaciones de la Hipótesis de Riemann.

El matemático Leonhard Euler demostró que los ceros de la función zeta de Riemann predicen la distribución de los números primos. Es aquí entonces en donde los números primos se pueden relacionar con la mecánica cuántica, a través de un operador Hamiltoniano. En la mecánica cuántica estándar, uno hace uso de la representación de Schrödinger, mediante la cual se pueden definir operadores que actúen en un espacio de Hilbert dado, sin embargo existe otra representación la cual resulta ser unitariamente no equivalente a la representación de Schrödinger, en este formalismo estos operadores toman representaciones diferentes teniendo en cuenta que el espacio-tiempo pasa de ser una estructura continua a una discreta. Dicha representación, en el caso de espacios de dimensión finita se le conoce como cuantización polimérica. El objetivo de utilizar éste formalismo es encontrar un operador Hamiltoniano cuyo espectro de energía, o mejor dicho, cuyos eigenvalores de la ecuación de valores propios da como resultado los ceros de la función zeta de Riemann, y sus eigenvalores o funciones de onda definan una distribución de probabilidad relacionada con la posición de los ceros en la recta real.

MARCO TEÓRICO Y MÉTODOS Y MATERIALES

En éste trabajo realizado el único material utilizado fue un software de implementación llamado Wolfram Mathematica, el cual fue muy útil porque permitió resolver ecuaciones que a mano cuestan mucho esfuerzo y tiempo.

Dado un sistema dinámico, uno puede describir el momento y la posición de un sistema de partículas mediante las ecuaciones de movimiento de Hamilton, las cuales están dadas a continuación:

$$\dot{p}_k = -\frac{\partial H}{\partial q_k} \tag{3}$$

$$\dot{q}_k = \frac{\partial H}{\partial p_k} \tag{4}$$

De las ecuaciones 3) y 4), el subíndice k indica la k-ésima partícula del sistema, p es el momento, q la posición y H es la función Hamiltoniana, la cual está relacionada con la energía de un sistema. La notación del punto encima de la función indica derivada respecto al tiempo. Desarrollando y resolviendo las ecuaciones 3) y 4) uno puede observar que son equivalentes a las leyes de Newton.

Cuando uno pasa al formalismo de la mecánica cuántica, en la representación de Schrödinger se encuentran que los operadores de posición y momento, cuando actúan sobre las funciones de onda de un espacio de Hilbert dado están dados por:

$$\hat{x}\Psi(x) = x\Psi(x) \tag{5}$$

$$\hat{p}\Psi(x) = -i\hbar\frac{\partial\Psi(x)}{\partial x} \tag{6}$$

Es decir, el operador de posición actúa multiplicando por x, mientras que el operador de momento multiplica por el negativo de la unidad imaginaria y la constante de Dirac (1.054×10^{-34} J·s) y luego derivando parcialmente respecto a x. Usando estas representaciones, es posible definir el operador Hamiltoniano como:

$$\hat{H} = \frac{\hat{p}^2}{2m} + V(x) \tag{7}$$

El primer término del sumando de la ecuación 7) corresponde a la energía cinética, y el segundo término es la energía potencial la cual viene dada como una función de las coordenadas x. Las ecuaciones 5), 6), y 7) son los operadores con los que se trabajan en la representación de Schrödinger.

La ecuación de Schrödinger independiente del tiempo tiene la siguiente forma:

$$\hat{H}\Psi(x) = E\Psi(x) \tag{8}$$

Debido a que las soluciones a una ecuación de éste tipo son funciones (a excepción de la multiplicación de un factor de escala), se denominan ecuaciones de valores propios. Una función que resuelve una ecuación de valores propios se llama eigenfunción, y el valor que va con esa función se llama eigenvalor (Arfken, Weber, & Harris, 2013).

De la ecuación 8), E corresponde a la energía y Ψ a una función de onda estacionaria. Ahora el reto es encontrar un operador Hamiltoniano, el cual sea autoadjunto, cuyo espectro de energía se relacione con la parte imaginaria de los ceros de la zeta de Riemann.

Una propuesta para lograr esto es usando la cuantización polimérica, en donde el espacio-tiempo es discreto y por lo tanto los operadores de posición y momento resultan ser diferentes a los asociados a la representación de Schrödinger. Dado que en la representación polimérica el espacio ya no tiene un carácter continuo, sino que está discretizado por un parámetro λ. Debido a la naturaleza del problema, resulta conveniente usar la representación en el espacio de momentos, en este caso el operador de posición está dado por:

$$\hat{x}\varphi(p) = i\hbar\frac{\partial\varphi(p)}{\partial p} \tag{9}$$

La diferencia entre éste operador y el de la ecuación 5) es que éste deriva parcialmente respecto a p. Debido a la naturaleza discreta del espacio, en la representación polimérica ya no existe el operador de momento, sino otro operador (Corichi, Vukasinac, & Zapata, 2007), el cual está definido como:

$$\hat{U}_\lambda\varphi(p) = e^{\frac{i\lambda p}{\hbar}}\varphi(p) \tag{10}$$

Para poder hacer uso del operador de momento, debemos hacer una regularización de la ecuación 10), por consiguiente, usando la expansión en serie de Taylor de la función exponencial y despreciando los órdenes

de λ^3 resultantes (dado que el parámetro λ lo tomaremos infinitesimalmente pequeño), se llega a la siguiente expresión:

$$p = \frac{\hbar}{\lambda}\sin\left(\frac{\lambda p}{\hbar}\right) \tag{11}$$

Se propone entonces examinar el Hamiltoniano siguiente en la representación polimérica:

$$H = xp^2 \tag{12}$$

El objetivo de estudiar este Hamiltoniano dada por la ecuación 12) es intentar calcular sus eigenvalores con la ecuación 8) en el espacio de momentos usando la representación polimérica para así determinar el número de estados cuánticos y relacionarlos con la distribución de los ceros de la zeta de Riemann.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resolviendo las ecuaciones 3) y 4) con el Hamiltoniano propuesto en 12), se llega a las siguientes soluciones al sistema clásico:

$$p(t) = \frac{1}{t-C_1} \tag{13}$$

$$x(t) = C_2(t-C_1)^2 \tag{14}$$

En las ecuaciones 13) y 14) C_1 y C_2 son constantes y t es el tiempo. Se observa que el momento corresponde a una curva asintótica que tiende a cero mientras t avance, y el desplazamiento tiene forma de parábola.

Al sustituir y desarrollar las ecuaciones 9) y 11) en 12), que a su vez es aplicada a una función de onda φ(p) en la ecuación 8), se llega a la ecuación de Schrödinger independiente del tiempo:

$$\frac{i\hbar^2}{\lambda}\left(\frac{1}{2}\sin\left(\frac{2\lambda p}{\hbar}\right)\varphi(p) + \frac{\hbar}{\lambda}\sin^2\left(\frac{\lambda p}{\hbar}\right)\varphi'(p)\right) = E\varphi(p) \tag{15}$$

Esta ecuación diferencial tiene como solución:

$$\varphi(p) = Ce^{\frac{iE\lambda\cot\left(\frac{\lambda p}{\hbar}\right)}{\hbar^2}}\csc\left(\frac{\lambda p}{\hbar}\right) \tag{16}$$

Donde C es una constante de integración. Como veremos a continuación esta función de onda define una distribución de probabilidad de los ceros de la función zeta de Riemann en la recta real.

Es posible determinar el números de eigenestados cuánticos con energía entre (0, E) de un sistema, mediante una aproximación semiclásica, para esto uno calcula el área bajo la curva generada por el Hamiltoniano en el espacio fase. Dado que las soluciones a nuestro problema tiene un comportamiento asintótico, no se puede integrar sobre todo el espacio, así que debemos integrar sobre un intervalo acotado por algunas constantes l_x y l_p, definidas en el espacio fase.
De esta manera, el número de eigenestados de energía en la representación polimérica está dada por:

$$E\int_{l_p}^{\sqrt{E/l_x}}\frac{\lambda^2 dp}{\hbar^2\sin^2\left(\frac{\lambda p}{\hbar}\right)} = E\left(\frac{1}{l_p} - \sqrt{\frac{l_x}{E}}\right) + \frac{\left(-El_p + \frac{E^{\frac{3}{2}}}{\sqrt{l_x}}\right)}{3\hbar^3} + O(\lambda^3) \tag{17}$$

Donde el primer término corresponde a una aproximación de la fórmula de Riemann para la distribución de los ceros de la función zeta de Riemann (Sierra, 2008), y los demás términos de orden λ, corresponden a los términos de fluctuación de la fórmula de Riemann-von Mangoldt, los cuales nos dan el comportamiento asintótico de los ceros en la recta real, los cuales se pueden asociar con el comportamiento caótico de un sistema clásico, el cual contenga órbitas periódicas en un espacio compacto. Cabe mencionar que para lograr una mejor aproximación podríamos tomar una discretización caracterizada por una topología p-adica, donde esta tiene como consecuencia hacer que la métrica definida por esta topología tome como puntos cercanos a los números primos, haciendo que la representación polimérica sea más fiable al tomar el número de estados semiclásicos.

CONCLUSIONES

Una propuesta de construir una teoría de gravitación cuántica, que intenta unificar la relatividad general con la mecánica cuántica, es a través de la cuantización polimérica. En el formalismo de la cuantización polimérica el espacio-tiempo es discreto y esto da lugar a diferentes representaciones para los operadores de posición y momento, los cuales se utilizan para construir un operador Hamiltoniano con la finalidad de encontrar sus eigenvalores y examinar la relación que éstos tienen con la distribución de los ceros de la función zeta de Riemann.

En el trabajo realizado se determinó las eigenfunciones de un Hamiltoniano que cumple las condiciones de la conjetura del caos cuántico en la representación polimérica. De la misma forma se calcularon las soluciones a las ecuaciones de movimiento clásico, y finalmente mediante un análisis semiclásico se obtuvo el número de eigenestados cuánticos, los cuales corresponden a la fórmula asintótica del número de ceros de la función zeta de Riemann, más un término de fluctuaciones. Aún hay mucho trabajo por hacer ya que hasta la fecha no se conoce un Hamiltoniano específico el cual tenga como espectro a todos los ceros de Riemann, sin embargo este mecanismo se ha generalizado a teorías de campos, como es el caso de la ecuación de Dirac. Resulta interesante analizar estos casos bajo la representación polimérica, ya que nos podría dar información acerca de los términos de fluctuaciones los cuales no pueden ser obtenidos mediante la representación estándar de la mecánica cuántica.

BIBLIOGRAFÍA

RIEMANN B. (1859). Ueber die Anzahl der Primzahlen unter einer gegebenen Grösse, Monat der Königl. Preuss. Akad. der Wissen. zu Berlin aus der Jahre 1859, 671.

HARAN, B. [Numberphile]. (2014, 14 de marzo). Riemann Hypothesis – Numberphile [Archivo de vídeo]. Recuperado de https://www.youtube.com/watch?v=d6c6uIyieoo

ARFKEN, G.; WEBER, H.; HARRIS F. (2013). Mathematical Methods For Physicists. Waltham: Academic Press.

CORICHI A.; VUKASINAC T.; ZAPATA J. (2007). Hamiltonian and physical Hilbert space in polymer quantum mechanics. *Phys. Rev. D (76)* 044016.

SIERRA, G. (2008). A physics pathway to the Riemann Hypothesis. *Física Teórica Julio Abed*. 1-8.

DISEÑO, SIMULACIÓN Y SÍNTESIS DE NANOTUBOS DE CARBONO DOPADOS CON NITRÓGENO

Luis Antonio Rivera Escobedo[1] y Emilio Muñoz Sandoval[2]

RESUMEN

En el presente trabajo se detalla la síntesis, diseño y simulación de nanotubos de carbono dopados con nitrógeno (NTC-N) por deposición química de vapor (CVD) utilizando sustancias precursoras. Se describe la metodología seguida y las caracterizaciones fisicoquímicas efectuadas (SEM y TGA). Se realizó una dispersión de pesos y de diámetros para conocer el diámetro promedio y el horno en el que se produjo la mayor parte de la síntesis. Se concluye que efectivamente se obtuvieron NTC-N con características particulares por efecto de las sustancias precursoras; la dispersión de pesos muestra que la mayor parte de la síntesis se produjo en el primer horno. Los resultados de TGA muestran que la oxidación se llevó a cabo a los 545 °C.

ABSTRACT

In this work the synthesis, design and simulation of nitrogen-doped carbon nanotubes (N-CNTs) by chemical vapor deposition (CVD) using precursor substances is detailed. The methodology followed and the physicochemical characterizations effectuated (SEM and TGA) are described. Weights and diameters dispersion were done to find the average diameter and the furnace with more production of N-CNTs. The results were analyzed, concluding that nitrogen-doped CNTs were effectively synthesized, but showing peculiar characteristics by meanings of the precursor substances; weights dispersion shows that the first furnace was more productive and TGA results show the oxidation occurring at 545 °C.

Palabras Clave: Nanotubos de Carbono, CVD, Nitrógeno, Isopropanol, Simulación.

INTRODUCCIÓN

Los nanotubos de carbono (NTC) fueron descubiertos en 1991 por Sumio Iijima con un microscópio electrónico mientras trabajaba en el hollín formado a partir de las descargas de arco eléctrico empleando grafito [1]. Un nanotubo de carbono es una estructura molecular que puede imaginarse como una monocapa de átomos de carbono (llamada grafeno) que forma una red atómica hexagonal, con un átomo de carbono en cada vértice de los hexágonos, doblada sobre sí misma hasta formar un tubo molecular [2]. En caso de consistir de varios tubos uno dentro del otro (capas), estos se llamarán nanotubos de pared múltiple. Las propiedades de los nanotubos dependen principalmente de su morfología: el número de capas concéntricas que posee, la manera en que es enrollado, el diámetro del tubo, su funcionalización y su forma geométrica. Dependiendo de dichas propiedades, su aplicación será diferente; muchas aplicaciones potenciales para los nanotubos de carbono fueron propuestos, incluyendo la obtención de compuestos conductores o de alta resistencia mecánica, dispositivos para almacenamiento y conversión de energía, sensores, dispositivos semiconductores en escala nanométrica, remediación de aguas, entre otras [3]. Existen varios métodos para producir nanotubos de carbono, entre las más comunes destacan: arco de descarga eléctrica, ablación láser, pirolisis de hidrocarburos y la deposición química de vapor o CVD por sus siglas en inglés. Este último

[1]Universidad Autónoma de Querétaro, Campus Aeropuerto, Facultad de Ingeniería, Carretera a Chichimequillas s/n, Ejido Bolaños, Querétaro, Qro. C.P.76140, 43luisriveranano7@gmail.com
[2]Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A. C., División de Materiales Avanzados; Camino a la Presa San José 2055, Col. Lomas 4ª sección, C.P: 78216, San Luis Potosí, S. L. P., ems@ipicyt,edu,mx

tiene la ventaja de que es factible la producción a gran escala, además de tener la posibilidad de controlar con relativa facilidad la composición del material depositado permitiendo una síntesis más específica[4]. El objetivo de este trabajo es sintetizar nanotubos de carbono dopados con nitrógeno con la técnica de deposición química de vapor utilizando diferentes sustancias precursoras (en este caso en particular la mezcla de etanol e isopropanol), caracterizar dichos nanotubos por SEM y TGA, realizar una distribución de pesos y de diámetros, y llevar a cabo una simulación computacional de nanotubos de carbono utilizando programas de primeros principios con el fin de estudiar las propiedades electrónicas de éstos.

MARCO TEORICO

El método de síntesis utilizado fue la deposición química de vapor, la cual es un proceso de recubrimiento que permite depositar capas extremadamente delgadas sobre una superficie, esto se logra calentando la superficie a una temperatura elevada antes de canalizar un monómero o sustancia precursora en el tubo de cuarzo que se encuentra dentro de los hornos, permite depositar una capa delgada mediante reacción química en fase vapor, además de controlar la composición de los materiales depositados. El recubrimiento se forma de manera uniforme y homogénea[5].

Los nanotubos de carbono pueden clasificarse en tres categorías: los llamados “zig-zag”, con un índice (n,0), los llamados “armchair” con índices (n,n) y una categoría intermedia llamados “quirales” con índices (n,m), en todos los casos los nanotubos tendrán un mayor diámetro cuanto mayores sean n y m. Dependiendo de la relación angular entre el eje del tubo y los vectores unitarios de la red cristalina de la hoja de grafeno que se pliega para formar el tubo, se obtienen estas tres categorías. Estos índices indican el número de hexágonos que posee cada conformación y la relación de estos índices indica la “quiralidad” del nanotubo. Como anteriormente mencionamos en la introducción, las propiedades de los nanotubos varían dependiendo de su morfología y composición, un ejemplo de esto son las diferencias entre estas tres categorías, los armchair presentan propiedades metálicas (es decir, conductores) mientras que los zig-zag presentan propiedades semiconductoras (presentan un band gap). A diferencia de estos dos las propiedades electrónicas de los nanotubos quirales dependen del vector y ángulo quiral de la hoja de grafeno de la que fueron hechos ya que presentan un enrollamiento de carácter helicoide el cual dificulta el paso de los electrones a los estados o bandas de conducción, por lo que solo un tercio de ellos presenta una conducción apreciable [2]. Las propiedades electrónicas de los materiales son de suma importancia ya que también a partir de ellas se puede establecer una aplicación a dicho material, muchas veces el estudiarlas conlleva una gran cantidad de tiempo y de recursos por lo que usualmente se busca una manera más rápida, sencilla y menos costosa para poder hacerlo. La simulación computacional nos ofrece esta ventaja utilizando programas de primeros principios, los cuales son los métodos que no incluyen ningún parámetro empírico o semi-empírico en sus ecuaciones (son derivados directamente de principios teóricos), esto significa que una aproximación se define rigurosamente en función de los primeros principios (teoría cuántica) y su resolución es con un margen de error que es cualitativamente conocido de antemano.

La DFT o Teoría del funcional de la densidad es un procedimiento variacional alternativo a la solución de la ecuación de Schrödinger donde el funcional de la energía electrónica es minimizado con respecto a la densidad electrónica del sistema a estudiar. SIESTA es un software que permite realizar cálculos de estructura electrónica y simulaciones de dinámica molecular de sólidos. Este programa está implementado de tal manera que el coste computacional escala linealmente con el número de átomos del sistema y, por tanto, es muy adecuado para sistemas grandes [6].

MÉTODOS Y MATERIALES

La síntesis de los nanotubos de carbono dopados con nitrógeno por la técnica de deposición química de vapor consiste en lo siguiente. Se comienza por preparar la solución precursora consistente de 250 mL benzilamina (otorga el nitrógeno), 125 mL de etanol, 125 mL de isopropanol y 11.3g de ferroceno, y se

deja sonicando por aproximadamente 2 horas para que se disuelvan de la mejor manera posible. La solución se introduce en el sprayer del sistema CVD, el cual se conecta al tubo de cuarzo que se encuentra dentro de los hornos cerámicos y que conecta a la trampa de acetona (que está a 16.5 cm de altura), los extremos del tubo son sellados con grasa de vacío para evitar cambios de presión que pudieran alterar la síntesis. Se encienden los hornos y se calientan hasta alcanzar una temperatura de 850°C, en ese momento se hace fluir gas argón con un flujo de 2.5 L/min y se enciende el sprayer dejando la reacción por 30 min.

Una vez terminada la síntesis se apaga el sprayer y se deja enfriar los hornos y el sistema hasta que lleguen a temperatura ambiente. Se quita el tubo del sistema CVD y se sónica en una probeta de 250 mL con etanol por aproximadamente 20 min para quitar residuos de la síntesis, se recubren con parafilm los extremos del tubo de cuarzo para evitar que se contaminen las muestras.

El tubo de cuarzo se coloca sobre algún soporte estable que permita la fase de recuperación de muestra. Se marca el tubo centímetro por centímetro partiendo desde el centímetro 10 desde la boquilla hasta el centímetro 80. Se prosigue a raspar cada centímetro recolectando la muestra de éste en un papel aluminio, se etiqueta cada muestra y se guarda. Una vez obtenidas las 70 muestras en papeles de aluminio, se pesa cada una en una balanza analítica, se registra el número de muestra y el peso obtenido con el fin de hacer un histograma y obtener la distribución de pesos, encontrando así el horno con la mayor producción en la síntesis de los nanotubos de carbono.

Ya terminado, se toman las muestras de los centímetros 25, 29, 33, 43, 50 y 58 para las pruebas fisicoquímicas. Se toman ya sea 2/3 partes o 5mg de cada muestra para las pruebas, se guardan en otro aluminio, se etiquetan y se guardan, el resto de cada muestra se guarda en su aluminio original y se marcan como control. Cada muestra se suspende en 200 mL de etanol y se sonican por 30 min. cada una, si la muestra tenía mas de 5mg se procede a filtrarse, de lo contrario se deja bajo calor para evaporar el etanol.

Las muestras filtradas se guardan por 24 horas así como las que se dejaron bajo calor con el fin de dejarlas secar. Todas las muestras son preparadas para las caracterizaciones por SEM y TGA. Para SEM se preparan los pines con cinta de carbono y se guarda en la caja correspondiente etiquetando el numero de muestra y la persona que lo sintetizó.

Se extrae un poco de muestra de cada papel filtro o vaso de precipitado y se coloca sobre el pin, se presiona con un pin diferente (sin cinta de carbono) sobre la superficie para darle mayor homogeneidad. Se analiza pin por pin en el microscópio electrónico, se obtienen las imágenes y se guardan. Para el análisis de TGA se colocan 5mg de la muestra 33 en el porta muestras, se activa un flujo de oxígeno de 20mL/min y un incremento en la temperatura de 5°C/min hasta alcanzar los 950°C.

Se obtienen los resultados, se grafican y se guardan, se puede obtener la derivada de la gráfica obtenida para encontrar la temperatura a la que ocurrió la oxidación de los nanotubos de carbono. Para la parte de simulación computacional se genera la celda unitaria para un nanotubo (10,0) haciendo uso de la herramienta computacional Gdis en Linux, se modifica la unidad de repetición y se genera el archivo con la información de la estructura cristalina de un nanotubo de carbono, se guarda en formato .fdf el cual será utilizado por SIESTA para los cálculos de las propiedades electrónicas. Se relaja y analiza la estructura con un máximo de 100 puntos K y con spin polarizado, se llegó a la convergencia numérica a una energía mínima de 0.02 eV.

Mediante códigos preestablecidos ya en el programa de SIESTA, se obtuvo el diagrama de bandas y los archivos necesarios para visualizar la estructura molecular del nanotubo de carbono.

RESULTADOS

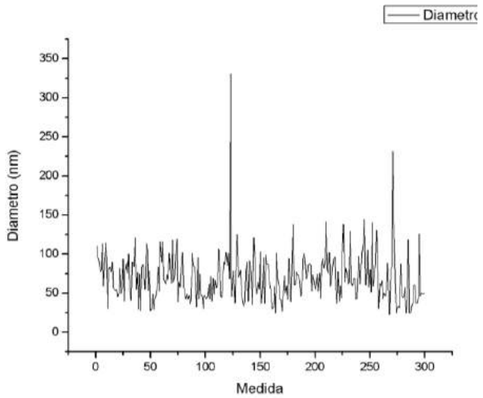


Figura 1. Distribución de diámetros de os nanotubos de carbono (300 medidas).

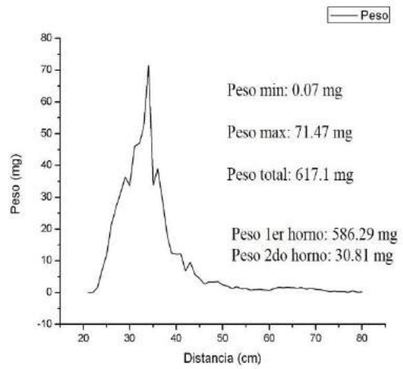


Figura 2. Distribución de pesos de las 70 muestras obtenidas, mostrando el peso mínimo registrado, el máximo y el total, así como la producción de cada horno.

En la figura 1 se aprecia la distribución de diámetros tomando 300 medidas a las imágenes obtenidas por SEM que se mostrarán más adelante. Se pueden apreciar 2 máximos y 2 mínimos. Los diámetros máximos correspondientes a los 2 picos que aparecen en la figura 1 son 331 y 232 nm, mientras que los diámetros mínimos correspondientes a los 2 puntos más bajos de la figura 1 son 23 y 24 nm respectivamente.

Sin embargo, los diámetros promedio obtenidos fueron 42 y 80 nm con una frecuencia de 85 conteos y 72 conteos respectivamente. En la figura 2 se muestra la distribución de pesos obtenida partiendo de los pesos registrados de las 70 muestras, en ella podemos apreciar que la mayor producción de nanotubos de carbono ocurrió en el primer horno (tomando en cuenta que cada horno mide 40 cm) con una producción de 586.29 mg; en total se produjeron 617.1 mg. A continuación se muestran los resultados obtenidos por el análisis termogravimétrico o TGA.

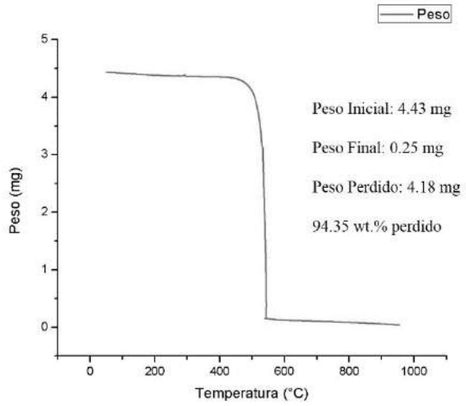


Figura 3. Gráfico obtenido de TGA.

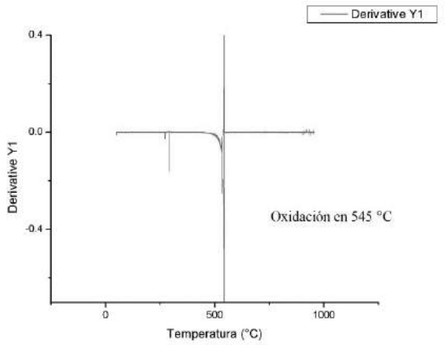


Figura 4. Derivada de la curva obtenida en la gráfica de TGA.

La figura 3 correspondiente al análisis termogravimétrico muestra el peso inicial de la muestra que fue de 4.43 mg, el peso final de 0.25 mg y el porcentaje en peso perdido en el análisis que fue de 94.35wt%. El peso sobrante es muy posiblemente asociado al hierro sobrante, recordando que se utilizó ferroceno en la solución precursora. De esta curva se obtiene la derivada que se muestra en la figura 4, donde podemos apreciar que el pico de oxidación de los nanotubos ocurrió aproximadamente a los 545°C.

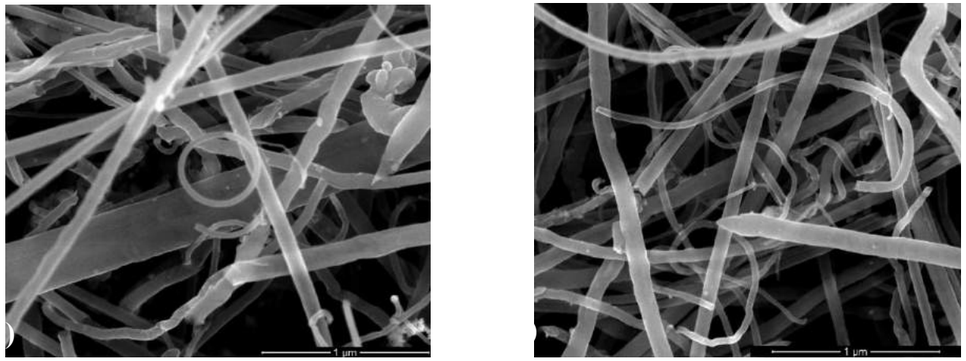


Figura 5. Resultados obtenidos de la microscopía electrónica de barrido (SEM). Las imágenes fueron tomadas a 50,000X en el microscopio SEM HELIOS NANOLAB 600. La escala de referencia es de 1µm.

En las figuras 5A y 5B se muestran los resultados obtenidos por SEM. En este trabajo uno de los principales objetivos era el determinar los efectos de las sustancias precursoras, en este caso la mezcla de etanol e isopropanol. Al comparar estas micrografías con las de trabajos previos (De otros alumnos del mismo verano) de síntesis de nanotubos de carbono utilizando sólo etanol y sólo isopropanol podemos apreciar la mezcla de los efectos de cada uno de ellos. Es decir, los trabajos en los que se utilizó solo etanol presentaron nanotubos de tamaño y diámetros pequeños, algo doblados o corrugados, mientras que en los trabajos

donde solo sólo se utilizó isopropanol muestran nanotubos de diámetros grandes, muy rigidos y con terminación en punta (forma de lápiz). En la figura 5A se puede apreciar de gran manera la combinación de estos resultados, se observan nanotubos muy delgados y doblados por acción del etanol y también nanotubos grandes (de gran diámetro), muy rigidos y con terminación en punta (forma de lápiz), al igual que la imagen 5B donde apreciamos tanto delgados, como de gran diámetro y en terminación de punta. Al tener 2 diámetros promedio y considerar los trabajos previos, con las imágenes de SEM podemos determinar que efectivamente se obtuvo la combinación de efectos de las sustancias precursoras.

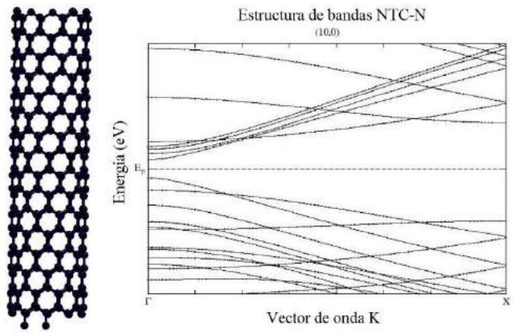


Figura 6. Resultados de la simulación computacional de las propiedades electrónicas del nanotubo (10,0) haciendo uso de SIESTA.

En la Figura 6 se muestran los resultados obtenidos de la simulación computacional, haciendo uso de la herramienta computacional SIESTA. Del lado izquierdo se puede apreciar la estructura molecular del nanotubo (10,0) que posee una quiralidad zig-zag, que como ya se describió anteriormente, presentará propiedades semiconductoras, es decir, presentando un band gap. Del lado derecho se observa el diagrama de bandas obtenido donde se aprecia el band gap que existe entre la banda de valencia y la de conducción, el cual tiene un valor de aproximadamente .06 eV.

CONCLUSIONES

Al utilizar la mezcla de sustancias precursoras se obtiene una combinación de los efectos que ambas producen, por parte del etanol se obtienen nanotubos delgados y corrugados, mientras que con isopropanol se obtienen nanotubos con terminación en punta y de mayor diámetro. La técnica CVD es efectiva para la síntesis de nanotubos de carbono y la benzilamina un excelente precursor para el dopaje con nitrógeno. La simulación computacional nos permite obtener las propiedades electrónicas que posee un material sin la necesidad de llevar a cabo procesos experimentales de manera que nos ahorra tiempo y costos para su evaluación.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se pudo llevar a cabo gracias al proyecto CB-2013- 220744-CONACYT del Dr. Emilio Muñoz Sandoval y 3971 Bilateral 246023-CONACYT del Dr. Florentino López Urías, así como al IPICYT, a la División de Materiales Avanzados, LINAN, Verano de la Ciencia de la Academia Mexicana de Ciencias y al CONACYT.

BIBLIOGRAFIA

[1] Alfonso José Vázquez Vaamonde, J. J. (2001). *Ciencia e ingeniería de la superficie de los materiales metálicos.* CSIC.
[2] Fernando, A. Q. (2008). *Estructura y Síntesis de Nanotubos de Carbono.* Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
[3] Groover, M. P. (1997). *Fundamentos de manufactura moderna: materiales, procesos y sistemas.* Pearson Educación.
[4] Marisela Maubert F., L. S. (2010). Nanotubos de Carbono - La Era de la Nanotecnología. *Razón y Palabra*.
[5] Senén Barro Ameneiro, A. J. (2002). *Fronteras de la computación.* Díaz de Santos.

ESTUDIO DE LA BIOACUMULACIÓN DE METALES PESADOS EN ESPECIES DE *CANDIDA*

Ana Luisa Rivera Lazarín[1] y Mayra Cuéllar Cruz[2]

RESUMEN

En las pasadas dos décadas los materiales nanocristalinos han sido ampliamente estudiados. Numerosos microorganismos son conocidos por sintetizar una gran variedad de nanopartículas inorgánicas de diferentes materiales, incluyendo bacterias, levaduras, algas, virus, plantas y extractos de plantas. No obstante, debido a su habilidad para biotransformar y bioacumular metales, las bacterias y levaduras han recibido especial atención por la producción biológica de nanopartículas. Microorganismos como *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Candida glabrata* son buenos productores de nanopartículas de metales pesados. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la formación de nanopartículas en especies de *Candida* en presencia de metales pesados. La formación de nanopartículas fue realizada en cuatro especies de *Candida* y evaluada por medio de microscopia electrónica de barrido (MEB).

ABSTRACT

Over the past two decades nanocrystalline materials have been intensely studied. Numerous microorganisms are known to synthesize a variety of inorganic nanoparticles from different materials, including bacteria, fungi, algae, viruses, plants and plant extracts. Because of their biotransformation and metal bioaccumulation ability, bacteria and fungi are receiving special focus for the biological production of nanoparticles. Yeasts like *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* and *Candida glabrata* are good producers of nanoparticles formed by heavy metals. The goal of this study was to evaluate the formation of nanoparticles by *Candida* species in the presence of heavy metals. The formation of different nanoparticles was performed in the four species of *Candida* and the nanoparticles were evaluated using scanning electron microscope (SEM).

Palabras Clave: *Candida*• nanopartículas • metales pesados • bioacumulación.

INTRODUCCIÓN

El género *Candida* está formado por aproximadamente 154 especies, de las cuales, se han reportado como patógenas de humanos *C. albicans, C. glabrata, C. tropicalis, C. parapsilosis, C. krusei* y *C. dublinensis*. La mayoría de las especies aisladas e identificadas de *Candida* provienen del hospedero humano, así como de suelos y medios acuáticos que han sido contaminados con metales pesados (Hagler y Mendocs-Hageler, 1981; Lopez-Arcilla y cols., 2004; Suihko y Hoekstra, 1999).

En los ecosistemas acuáticos y terrestres existe un aporte natural de iones metálicos asimilables por el medio, ya que muchos de estos son necesarios para el desarrollo de los seres vivos; elementos como cromo, manganeso, níquel, cobalto, cobre, y zinc entre otros. Este equilibrio se ha visto afectado por la actividad humana, debido a la cual, los aportes al medio natural de iones metálicos se ha incrementado.

[1] Universidad Autónoma de Coahuila, Facultad de Ciencias Químicas; Boulevard V. Carranza esquina con Ing J. Cárdenas Valdez, Col. República, C. P: 25280, Saltillo, Coahuila, ana_lazarin@uadec.edu.mx
[2] Universidad de Guanajuato, Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas; Noria Alta S/N, Col. Noria Alta, C. P: 36050, Guanajuato, Guanajuato, mcuellar@ugto.mx

Dentro de los elementos que se pueden considerar como más tóxicos son el cadmio, mercurio, estaño, plomo, talio, arsénico, zinc, cobre, cromo y níquel. La inexistencia de vías naturales para la asimilación de estos compuestos hace que se acumulen. Con este fin se han empleado diferentes tecnologías tales como la precipitación química, extracción con disolventes, electrodiálisis, intercambio iónico u ósmosis inversa. Todos estos sistemas son efectivos, pero algunos de ellos no siempre son adecuados y su aplicación supone un alto costo energético y de reactivos. Para la recuperación de metales pesados, se han utilizado otros métodos basados en la exposición de bacterias, hongos, levaduras y algas, las cuales tienen diferente composición química.

En levaduras se ha reportado que la selectividad y capacidad de bioacumulación de metales dependen de la edad celular, composición del medio de crecimiento, tiempo de contacto, pH y temperatura (Bishnoi y Garima, 2005). El modo activo de acumulación de metales por células vivas es la bioacumulación, la cual depende de la actividad metabólica de la célula.

El uso de microorganismos como bioacumuladores de metales pesados es una alternativa a los métodos existentes para la eliminación de estos compuestos. Hoy en día se conocen qué factores, como la composición de la pared celular de los microorganismos, la composición química de la célula o los factores fisicoquímicos externos, juegan un papel importante en la bioacumulación de estos compuestos. La aplicación de la bioacumulación presenta un gran potencial, pues las masas fúngicas son naturales, se pueden obtener fácilmente en grandes cantidades, son económicas, reutilizables y es posible remover selectivamente diferentes iónes metálicos, los cuales pueden ser fácilmente liberados y recuperados.

En el presente trabajo se planteó evaluar la formación de nanopartículas en *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* y *C. parapsilosis* en presencia de tres distintos metales pesados. La formación de diferentes nanopartículas fue realizada en las cuatro especies de *Candida* y evaluada por medio de microscopia electrónica de barrido (MEB).

MÉTODOS Y MATERIALES

Cepas y condiciones de cultivo
Las cepas de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* y *C. parapsilosis* usadas en este estudio son aislados clínicos. Las cepas fueron cultivadas en medio YPD (YP: extracto de levadura 0.3%, peptona de gelatina 1% y glucosa 2%). El crecimiento de las levaduras se llevó a cabo partiendo de las cepas stock del laboratorio.

Curva de crecimiento
A partir de un preinóculo de cada una de las cuatro especies de *Candida* se tomó 1 mL y se adiciono en 25 mL de medio líquido YPD y se incubo a 28 ºC con agitación constante. De este cultivo a las 48 h, se midió la OD600nm en un espectrofotómetro Genesys 20 (Thermo Scientific). Las células expuestas a los tres metales pesados se llevaron a una concentración final de 1.0 % del compuesto correspondiente. De cada cultivo control y expuestos a los distintos metales se dejaron durante 0, 2, 6, 12, 24 y 48 h para evaluar la formación de las nanopartículas. Se realizaron dos experimentos independientes.

Liofilización celular
Con el objetivo de sublimizar las muestras, de manera que se obtenga una pastilla celular pura para su adecuada observación con el microscopio, se procedió con el protocolo de liofilización cubriendo con papel parafilm cada uno de los tubos Eppendorf de cada muestra obtenida a los cuales se les hizo punciones para poder proceder en vacío, dichas muestras se colocaron en un frasco para liofilizar y se llevaron a refrigeración a -70°C durante 15 min, posteriormente se colocaron en el liofilizador al vacío donde se dejaron por 5-6 horas según marca el protocolo para la cantidad de muestra.

Microscopía electrónica de barrido
Las células de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* y *C. parapsilosis* después de ser expuestas a los tres distintos metales se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 minutos a 4 ºC y la pastilla celular fue lavada exhaustivamente con agua desionizada estéril durante cuatro veces. Posteriormente, las células fueron liofilizadas en un Tousimis auto Samdri 815 critical point dryer durante 4 h. Las muestras secas fueron cubiertas con una capa de oro coloidal. Después, las muestras fueron observadas en el microscopio electrónico de barrido, modelo EVO HD15, high definition ZEISS®. Finalmente, las muestras fueron fotografiadas usando el detector de electrones secundarios (SE1) a 15 kV en condiciones de alto vacío y a una distancia de trabajo de 4 mm.

RESULTADOS

Con la finalidad de evaluar si las especies de *Candida* eran capaces de bioacumular los distintos metales probados, las células fueron observadas al MEB (Figura 1). Como se observa en presencia del metal 1 y 2 (Figura 1A y 1B) a partir de las 2 h hasta las 48 h al parecer se han formado nanopartículas extracelulares, lo cual posiblemente se debe a que *Candida* ha desarrollado mecanismos que le permiten formar las nanopartículas en la pared celular.

Esto posiblemente se lleva a cabo por medio de mecanismos que involucran la biosorción de metales por la pared celular, ya que este es el sitio en donde se realiza la retención del metal mediante una interacción fisicoquímica con los grupos amino e hidroxilo de la quitina presente en la pared, al igual que los grupos fosfato, sulfhidrilo y carboxilo.

La formación de nanopartículas extracelulares por las especies de *Candida* es la primera evidencia que indica que estos hongos patógenos oportunistas de humanos han estado principalmente expuestos a ambientes con altas concentraciones de estos metales.

No obstante, cabe hacer mención que las muestras presentan material extracelular, el cual puede deberse a que los lavados fueran insuficientes, por lo cual se deberán realizar más experimentos con la finalidad de comprobar que efectivamente *Candida* es capaz de bioacumular estos metales.

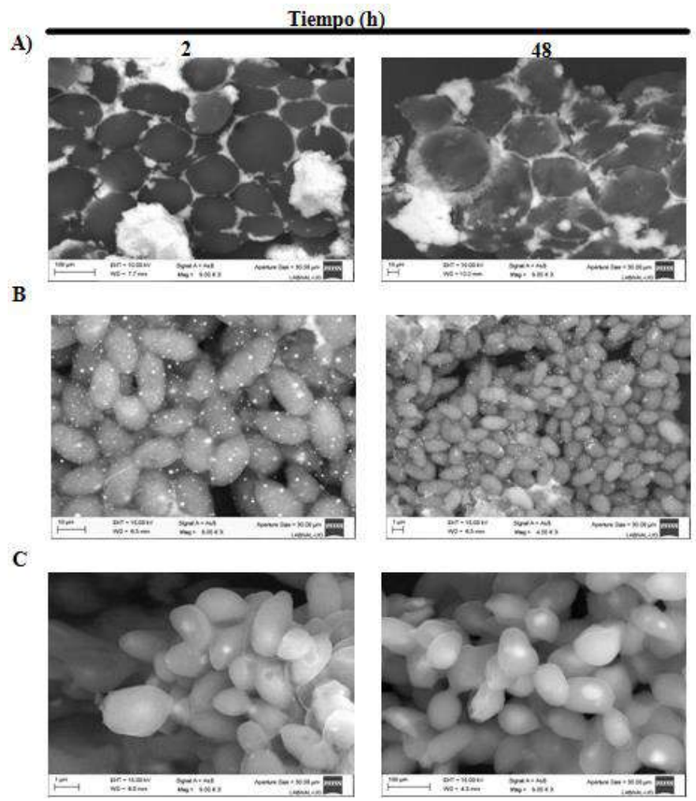


Figura 1. Evaluación de la formación de nanopartículas por bioacumulación de metales pesados por especies de Candida. A) Metal 1; B) Metal 2; C) Metal 3.

En el caso del metal 3, se observa que aparentemente la formación de nanopartículas es de manera intracelular, lo cual se debe posiblemente a que las especies de *Candida* no son expuestas habitualmente a este metal, por ello, no tienen mecanismos de resistencia que les permitan mantener de manera extracelular a este catión.

Es importante destacar que el planteamiento de estos estudios sugiere impactar buscando hacer frente a nuevos métodos para la biorremediación de los ecosistemas naturales. Así mismo cabe señalar que debido al tiempo destinado para el proyecto, los resultados presentados son preliminares, por lo que será necesario realizar reiteradamente los experimentos para llegar a conclusiones definitivas.

CONCLUSIONES

Aparentemente las especies de *Candida* son capaces de bioacumular algunos metales pesados, capacidad dependiente del grado de afinidad entre las especies y el metal. No obstante, es necesario realizar experimentos adicionales que permitan llegar a conclusiones definitivas. La aplicación de la bioadsorción es un método alternativo altamente viable debido a su bajo costo energético, de reactivos, económico, reutilizable y que permite realizarlo en grandes cantidades. Es de gran importancia el abatimiento de la contaminación de los ecosistemas por metales pesados removiéndolos con procesos naturales que no supongan un riesgo para la salud ni para el ecosistema mismo, como lo es el uso de microorganismos como bioacumuladores.

Es de gran trascendencia el conocimiento de las condiciones tanto de temperatura, agitación, tiempo transcurrido, estrés al que se somete, etc. en las cuales las células muestran la capacidad para formar enlaces entre sus componentes celulares y los metales pesados para acumularlos dentro del mismo produciendo la reclusión del metal del medio, de manera que tener dichos conocimientos permita darle una correcta aplicación en la asimilación de estos compuestos.

BIBLIOGRAFIA

Artículos de revista

HAGLER, A. N.; MENDONCA-HAGLER, L. C. (1981). "Yeasts from marine and estuarine waters with different levels of pollution in the state of rio de janeiro, Brazil." en *Appl Environ Microbiol*, 41, (1), [pp. 173-8].

LOPEZ-ARCHILLA, A. I.; GONZALEZ, A. E.; TERRON, M. C.; AMILS, R. (2004). "Ecological study of the fungal populations of the acidic Tinto River in southwestern Spain." en *Can J Microbiol*, 50, (11), [pp. 923-34].

SUIHKO, M. L.; HOEKSTRA, E. S. (1999). "Fungi present in some recycled fibre pulps and paperboards." en *Nordic Pulp & Paper Research Journal*, 14, (3), [pp. 199-203].

Bishnoi, N. R. (2005). "Garima, Fungus - An alternative for bioremediation of heavy metal containing wastewater: A review." en *Journal of Scientific & Industrial Research*, 64, (2), [pp. 93-100].

CAÑIZARES, R. (2000). "Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana" en *Revista Latinoamericana de Microbiología,* Núm. 3, Vol. XLII, [pp. 131-143].

Artículos en línea

ACOSTA, I., MOCTEZUMA, M., CÁRDENAS, J., GUTIERREZ, C. (2007). "Bioadsorción de Cadmio (II) en Solución Acuosa por Biomasas Fúngicas" en *Revista Información Tecnológica,* No. 1, Vol. XVIII. Consultada en https://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642007000100003 (fecha de consulta 04-08-2016).

AGRADECIMIENTOS

Uno de los autores ALRL, agradece al Comité Organizador y a la Universidad de Guanajuato, a través del programa "Verano de la Ciencia Regional 2016" la oportunidad de participar en la estancia.

También agradece a la Dra. Mayra Cuéllar Cruz, del Departamento de Biología de la División de Ciencias Naturales y Exactas del Campus Guanajuato, de la Universidad de Guanajuato, por los conocimientos transmitidos y las facilidades brindadas para la realización de este proyecto.

Así como a sus amigos y compañeros de laboratorio por sus atenciones y disposición para apoyar en el desarrollo de la estancia, y finalmente a su familia por el apoyo y confianza brindada.

EVALUACIÓN BROMATOLÓGICA DE DOS GENOTIPOS DE MAÍZ POLIEMBRIÓNICO CULTIVADOS EN DISTINTOS AMBIENTES

Luis Enrique Rivera Macías[1] y Raúl Rodríguez Herrera[2]

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue comparar los efectos ambientales (densidad de población y fertilización) sobre la calidad bromatológica de dos genotipos de maíz poliembriónico (en forma individual y poliembriónica) contra el maíz convencional. El material biológico se obtuvo a partir de 2 ensayos diferentes: 1) experimento de rendimiento y 2) experimento en densidad de población y fertilización. Los análisis de lípidos, cenizas, fibra cruda se llevaron a cabo de acuerdo a los protocolos de la AOAC. Los resultados en el experimento 1 (E1) mostraron que el genotipo NAP-PE (poliembriónico) tuvo mayor porcentaje de lípidos, mientras que el maíz comercial Caimán tuvo un valor más bajo. Además, se observó en el análisis de fibra cruda que el NAP-PE también tuvo el mayor porcentaje, siendo AE-IND (individual) y AE-PE las que presentaron los valores más bajos. En el experimento 2 (E2), se evaluaron los tratamientos sólo para el genotipo AE. En la comparación de los resultados de E1 vs E2, se observó que los lípidos en E2 son más bajos que los genotipos en E1; por el contrario, los porcentajes de ceniza y fibra cruda fueron más bajos en E1 contra E2. Sin embargo, análisis posteriores se han programado para obtener una mejor comparación entre cada genotipo en ambos experimentos y poder evaluar la calidad nutricional en comparación con una variedad comercial establecida, buscando encontrar nuevas variedades con mayores rendimientos y calidad en general.

ABSTRACT

The objective of this study was to compare the environmental effects (population density and fertilization) over the bromatological quality of two genotypes of polyembryonic maize (individual and polyembryonic form) against conventional maize. The biological material was obtained from 2 different assays: 1) a yield experiment, and 2) a population density and fertilization experiment. Analyses of lipids, ash, and crude fiber were performed according to the AOAC protocols. Results in experiment 1 (E1) showed that the genotype NAP-PE (polyembryonic) had the greatest percentage in lipids, while the commercial maize Caiman had the lowest value. Besides, it is observed in the crude fiber analysis that NAP-PE had also the greatest percentage, being AE-IND (individual) and AE-PE those that showed the lowest values. In the experiment 2 (E2), treatments were evaluated just for the genotype AE. Comparing the results from E1 vs E2, it's observed that lipids in E2 are lower than genotypes in E1; in contrast, percentages of ash and crude fiber were lower in E1 against E2. Nevertheless, posterior analyses are programed for a better comparison for each genotype in both experiments and to assess the nutritional quality compared to a commercial variety established, seeking for new varieties with higher yields and quality.

Palabras Clave: *Zea mays* L., poliembrionía, análisis bromatológicos, calidad nutricional

INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays* L.) es el ingrediente más importante en la dieta mexicana y el segundo cultivo con más importancia a nivel mundial por su producción y relevancia económica, ya sea como alimento humano,

[1] Instituto Tecnológico Superior de Irapuato, Ingeniería Bioquímica, Carretera Irapuato-Silao, km. 12.5, C.P. 36821, Irapuato, Guanajuato. Tel.: (462) 17-85-808; luis_rivera.macias@outlook.es

[2] Universidad Autónoma de Coahuila, Departamento de Investigación en Alimentos, Blvd. V. Carranza e Ing. José Cárdenas V. s/n. Col. República Ote. C.P. 25280. Saltillo, Coahuila. Tel.: (844) 41-61-238, Fax: 4390511; raul.rodriguez@uadec.edu.mx

para ganado o como fuente de un gran número de productos industriales (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2001). Las estimaciones de SAGARPA valoran un nivel de consumo de 35.6 millones de toneladas durante el año agrícola 2015. Del consumo total de maíz se estima que el 64.0 % corresponde a maíz blanco, y el 36.0 % restante, a maíz amarillo (FIRA, 2015). De la producción nacional total, el maíz se procesa principalmente en tortillas y otros alimentos tales como pan, tamales, pozole, salsas, pinole, y en general para un amplia gama de productos en la gastronomía mexicana, los cuales proporcionan cantidades significativas de nutrientes: 50 % de proteína, 70 % de calorías y el 49 % del calcio consumido por la población del país (Flores Farías *et al*., 2000). El fenómeno reproductivo conocido como poliembrionía (PE) está documentado ampliamente en varias especies vegetales a partir de Webber, 1940 y fue observado experimentalmente por primera vez en maíz por Morgan & Rappleye (1951), este se genera de manera natural y aparece esporádicamente con baja frecuencia. La PE es una variante genética en maíz, que se refiere a la producción de dos o más plántulas funcionales por semilla, emergiendo simultáneamente desde el momento de la germinación (Espinoza *et al*., 1998) como se aprecia en la figura 1.

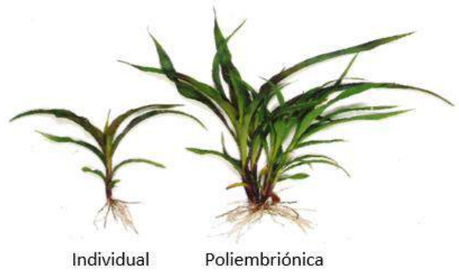


Figura 1.- Comparación de genotipos en semillas germinadas de maíz

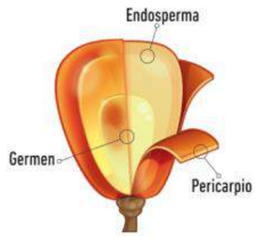


Figura 2.- Partes del grano de maíz

Dicho maíz poliembriónico presenta características de alto potencial agronómico, como alta calidad proteica (15 a 20 % más lisina) y mayor cantidad de grasa cruda en el grano (de 30 a 50 %), que la que se encuentra en maíz común (González Vázquez *et al*., 2011) en comparativa con los valores reportados por la (FAO, 2001), donde menciona que las partes principales del grano de maíz (figura 2) difieren considerablemente en su composición química. El pericarpio se caracteriza por un elevado contenido de fibra cruda, que a su vez está formada fundamentalmente por hemicelulosa, celulosa y lignina. El endospermo, en cambio, contiene un nivel elevado de almidón y aproximadamente 8 % de proteínas, así como un contenido de grasas crudas relativamente bajo. Por último, el germen se caracteriza por un elevado contenido de grasas crudas (aproximadamente 33 %) y contiene un nivel relativamente elevado de proteínas, como se puede observar en la figura 3.

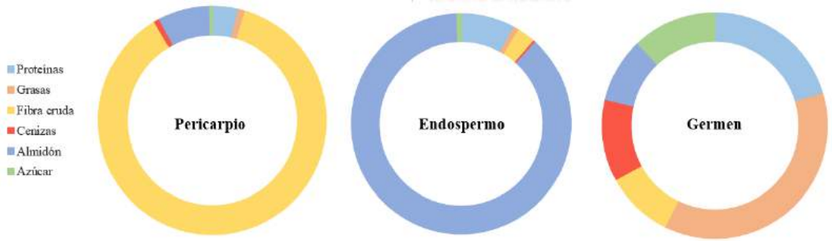


Figura 3.- Composición química proximal de las partes principales de los granos de maíz (%)

Esta condición gemelar o PE en maíz, es una característica natural que puede ser aprovechable como una vía alterna en el diseño de nuevas variedades, incrementar el potencial de rendimiento total, valor nutritivo del grano, así como incrementando cantidad y calidad de aceites y proteínas y, por el otro lado, la posibilidad de aumentar la producción de materia seca por semilla y por unidad de área (Musito *et al*., 2008).

Esto bajo la hipótesis de que dos o más embriones por semilla, permitirán incrementar la capacidad de almacenamiento de nutrientes de calidad (Espinoza Velázquez *at al*., 2016). En este proyecto se aborda un análisis de la calidad bromatológica de dos genotipos de maíz poliembriónico (forma individual y poliembriónica), sujetos a dos variantes ambientales: densidad de población y fertilización, comparándose con una variedad comercial de maíz convencional.

MÉTODOS Y MATERIALES

Material biológico. – Se utilizaron semillas del genotipo NAP en variedad individual (IND) y poliembriónica (PE), genotipo AE en variedad IND y PE, así como, una variedad comercial "Caimán" (IND), desarrollados por el Instituto Mexicano del Maíz (IMM) de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN) en Coahuila, México.

Estrategia experimental. - En el ensayo de rendimiento (E1) se utilizó una dosis de fertilización de: 160 N, 80 P y 0 K (nitrógeno, fosforo y potasio respectivamente). Para el experimento en densidad de población y dosis de fertilización (E2) se utilizaron variantes 1 (baja) y 2 (alta) para cada uno, iguales a densidad: [1 = 73,000 plantas/Ha y 2 = 93,000 plantas/Ha] y fertilización: [1 = 120 N, 60 P, 0 K y 2 = 240 N, 90 P, 0 K] como se esquematiza en la figura 4.

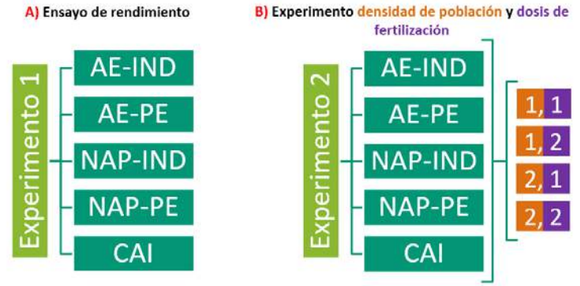


Figura 4.- Estrategia experimental

Preparación de la muestra. - Terminada la temporada de cosecha, se recibieron las mazorcas de maíz que fueron desgranadas manualmente y secadas a una temperatura de 60 °C por 24 h para su posterior molienda en molino eléctrico para granos y finalizando con un tamizaje que permitió eliminar partículas menores a 1 mm, obteniendo así la muestra.

Análisis bromatológicos. – Lípidos: Se utilizaron 5 g de muestra en un empaque de papel filtro, el cual se colocó en el interior del sifón de un aparato de extracción Soxhlet. Se tomó un matraz redondo plano de boca esmerilada a peso constante (100 °C/24 h), se enfrío por 30 min y se pesó; posteriormente se agregó el disolvente (hexano) hasta la mitad de dicho matraz y se acopló el refrigerante del depósito Soxhlet. La extracción fue realizada por un periodo de 5 h, al finalizar el proceso se puso a peso constante nuevamente

el matraz, pasado el tiempo, se sacó el matraz, enfrió y se pesó para poder realizar el cálculo con la siguiente fórmula:

$$\% G = \frac{g\ del\ matraz\ con\ extracto - g\ del\ matraz\ a\ peso\ cte.}{g\ de\ muestra} * 100 \quad (1)$$

Fibra cruda: Fueron pesados 5 g de muestra previamente desengrasada, los cuales se colocaron en un vaso Berzelius, agregando 100 mL de solución de ácido sulfúrico 0.225 N. Se conectó el aparato de reflujo por un periodo de 30 min contados a partir de iniciado el hervor, al hervir se redujo la temperatura para mantener una ebullición suave. Una vez que transcurrió el tiempo se secó y filtró a través de tela de lino, se lavó con 3 porciones de 100 mL de agua destilada caliente.

El residuo que quedó en la tela (fibra) se colocó en el vaso Berzelius con 100 mL de solución de hidróxido de sodio 0.313 N y se volvió a conectar el aparato de reflujo por 30 min. Pasado el tiempo, se sacó la muestra y filtró nuevamente en lino, se lavó con 3 porciones de agua destilada caliente (100 mL). El exceso de agua fue eliminado presionando la tela de lino, se retiró la fibra con espátula y se depositó en un crisol de porcelana, el cual fue puesto a peso constante (100 °C/12 h).

Se sacó el crisol de la estufa y se dejó enfriar en desecador para un posterior pesaje. La muestra fue pre-incinerada en parrilla y se colocó en la mufla a 600 °C por 3 h, una vez finalizada la incineración se sacó, enfrió (en desecador) y pesó la muestra tratada. El cálculo se llevó a cabo con la siguiente fórmula:

$$\% FC = \frac{g\ del\ crisol\ con\ fibra\ seca - g\ del\ crisol\ con\ cenizas\ de\ fibra}{g\ de\ muestra} * 100 \quad (2)$$

Cenizas: Se colocó a peso constante (100 °C/24 h) un crisol de porcelana por cada muestra analizada, y se enfrió en desecador por 15-20 min, para posteriormente agregar 2 g de la muestra seca a analizar. Se pre-incineró en parrilla a baja temperatura hasta que dejó de humear, se pasó a la mufla a 600 °C por 3 h, retiró y dejó enfriar de 15-20 min en desecador; finalmente se volvió a pesar para obtener el cálculo de cenizas con la fórmula (3) (Association of Official Analytical Chemists, 1997).

$$\% C = \frac{g\ del\ crisol\ con\ cenizas - g\ del\ crisol\ solo}{g\ de\ muestra} * 100 \quad (3)$$

RESULTADOS

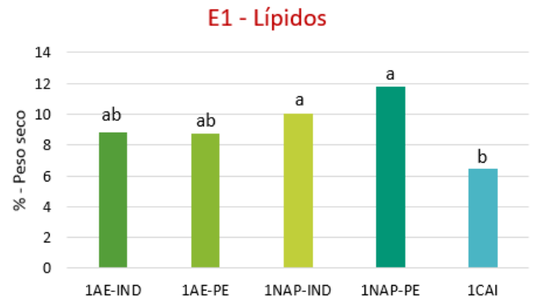


Figura 5.- Porcentaje de lípidos en genotipos del E1

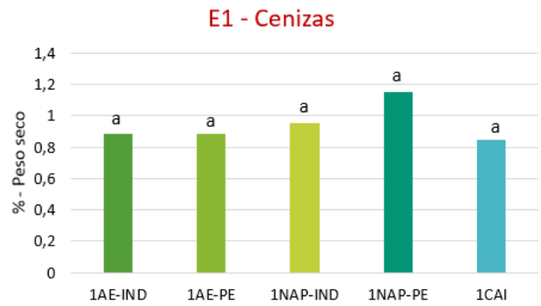


Figura 6.- Porcentaje de lípidos en genotipos del Experimento 1

En el E1 podemos observar que NAP-IND y NAP-PE presentan mayor porcentaje de lípidos que el resto de los genotipos evaluados, mientras que la variedad Caimán tuvo el valor más bajo. El porcentaje de fibra cruda en NAP-PE es significativamente mayor que el resto; por otro lado, no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de cenizas como lo muestras las figuras (5, 6 y 7). En el E2, sólo para el genotipo AE, no hay diferencias significativas entre los porcentajes de lípidos, cenizas y fibra cruda de los genotipos utilizados con los efectos ambientales evaluados (densidad de población y dosis de fertilización) como lo revelan las figuras (8 a 13). Cabe mencionar que está en proceso el análisis comparativo con la variedad NAP y Caimán, para poder dar conclusiones sólidas. Al confrontar E1 vs E2, se observó que los lípidos en E2 son más bajos que los genotipos en E1; por el contrario, los porcentajes de ceniza y fibra cruda fueron más bajos en E1 que en el E2.

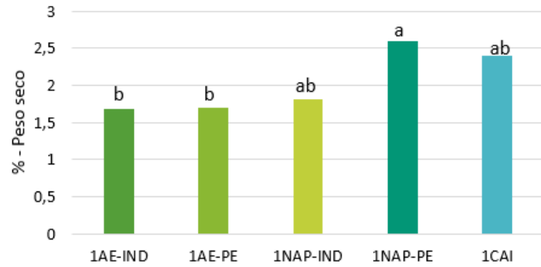


Figura 7.- Porcentaje de fibra cruda en genotipos del E1

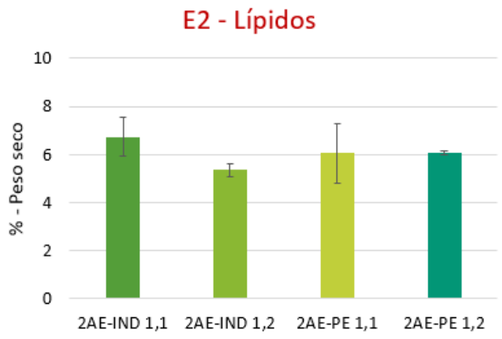


Figura 8.- Porcentaje de lípidos en genotipos densidad de población baja (1) con dosis de fertilización baja (1) y alta (2)

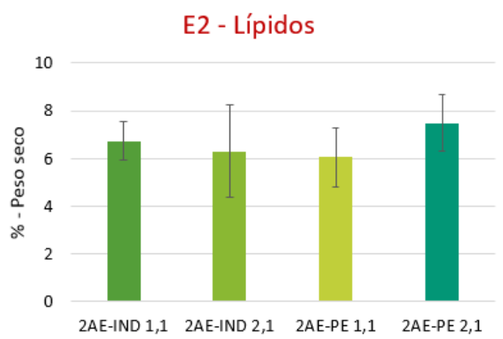


Figura 9.- Porcentaje de lípidos en genotipos densidad de población baja (1) y alta (2) con dosis de fertilización baja (1)

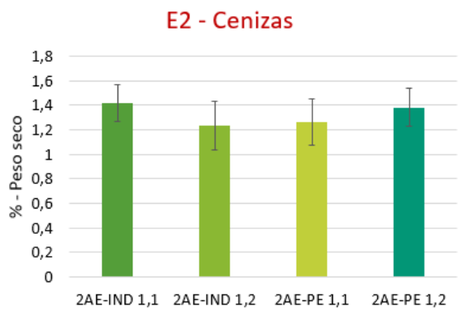


Figura 10.- Porcentaje de cenizas en genotipos densidad de población baja (1) con dosis de fertilización baja (1) y alta (2)

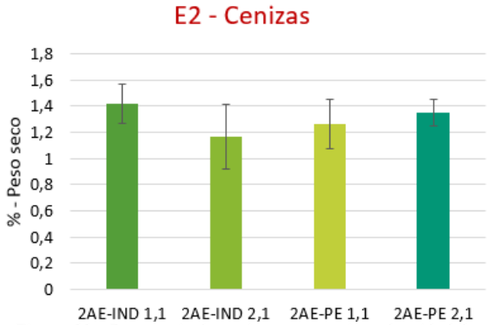


Figura 11.- Porcentaje de cenizas en genotipos densidad de población baja (1) y alta (2) con dosis de fertilización baja (1)

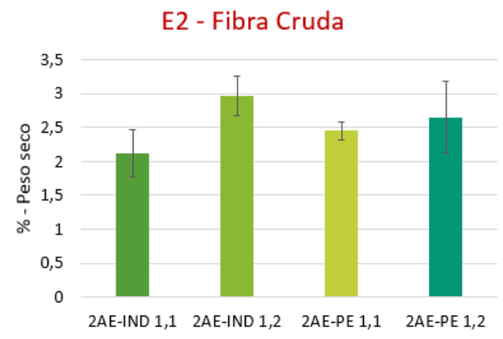


Figura 12.- Porcentaje de fibra cruda en genotipos densidad de población baja (1) con dosis de fertilización baja (1) y alta (2)

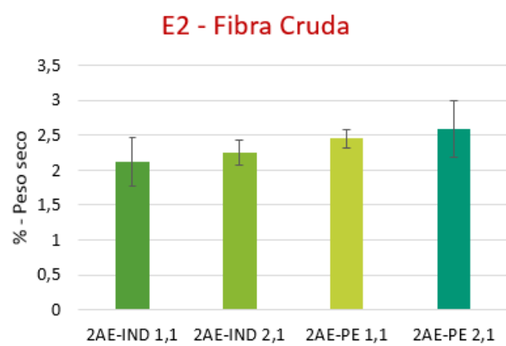


Figura 13.- Porcentaje de fibra cruda en genotipos densidad de población baja (1) y alta (2) con dosis de fertilización baja (1)

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados de los análisis bromatológicos que se llevaron a cabo en el E1 para las diferentes variedades (AE, NAP y Caimán, en sus variedades IND y PE), se puede concluir parcialmente que NAP presenta diferencias significativas en comparación con el maíz control para el ensayo de lípidos; además, esta misma variedad no es significativamente diferente en contenido de fibra cruda y cenizas, por lo cual puede considerarse, hasta el momento, como una opción que presenta características similares al maíz control.

Por otro lado, no existen diferencias para los análisis en el E2, por lo que se concluye de forma parcial, que los efectos ambientales evaluados hasta la fecha no modifican la calidad del grano de maíz en comparación con el maíz control. Análisis posteriores han sido programados para confirmar las conclusiones parciales obtenidas y para hacer una comparación adecuada, además de la adición de un análisis proteico y de azúcares totales para lograr un perfil completo de cada variedad a analizar.

BIBLIOGRAFIA

Association of Official Analytical Chemists. (1997). *Official methods of analysis of AOAC International*. Gaithersburg, Maryland.

Espinoza Velázquez, J., Valdés Lara, L. E., Reyes Vega, M. de la L., & De León Castilo, H. (2016). *Calidad nutricional del grano en poblaciones de maíz poliembriónico*. *ResearchGate*.

Espinoza, J., Vega, M. C., Navarro, E., & Burciaga, G. (1998). Poliembrionía en maices de porte normal y enano. *Agronomía Mesoamericana*, *9*(2), 83–88.

FIRA. (2015). *Panorama Agroalimentario - Maíz 2015*.

Flores Farías, R., Martínez Bustos, F., Salinas Moreno, Y., Kil Chang, Y., González Hernández, J., & Ríos, E. (2000). Physicochemical and rheological characteristics of commercial nixtamalized Mexican maize flours for tortillas . *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *80*, 657–664. http://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000501)80

Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2001). *El Maíz en los trópicos: mejoramiento y producción*. (Food & Agriculture Org., Ed.). Roma.

González Vázquez, V. ., Espinoza Velázquez, J., Mendoza Villareal, R., De León Castillo, H., & M.A, T. T. (2011). Caracterización de germoplasma de maíz que combina un alto contenido de aceite y poliembrionía. *Universidad Y Ciencia - Trópico Húmedo*, *27*(2), 157–167.

Musito, R. ., Espinoza, V. ., Gonzáles, W. ., Gallegos, S., & De León, C. . (2008). Características de plántulas en familias derivadas de una población de maíz poliembriónico. *Revista Fitotecnia Mexicana*, *31*(4), 399–402.

Webber, J. M. (1940). Polyembryony. *The Botanical Review*, *6*(11), 575–598. http://doi.org/10.1007/BF02919556

EFECTO ELASTOCALÓRICO EN ALEACIONES CON TRANSFORMACION MARTENSITICA

Cristina Rodriguez Guijarro[1] y Horacio Flores Zúñiga[2]

RESUMEN

El efecto elastocalórico sucede durante la transformación martensitica inducida por esfuerzo en aleaciones termoelásticas con memoria de forma. Con el fin de observar este efecto se fabricaron cintas de la aleación $Ni_{55}Al_{25}Fe_{20}$; se estudió esta aleación debido a que la transformación martensitica se presenta a temperatura debajo de la ambiental, por otro lado, el efecto superelástico se observa a temperatura ambiente y presenta buenas propiedades mecánicas, lo cual lo hace un buen candidato para el estudio del efecto elastocalórico. Se midió la temperatura de las cintas, adiabáticamente, al aplicarles esfuerzo; de tal forma que fue posible la observación directa del efecto elastocalórico. Las muestras utilizadas fueron caracterizadas por tres métodos; con el fin de conocer la temperatura de transformación de la muestra se realizó una calorimetría diferencial de barrido (DSC), también, para analizar las fases presentes se hizo un análisis de difracción de rayos X, y finalmente, se observó la microestructura del material con un microscopio óptico.

ABSTRACT

The elastocaloric effect occurs during stress-induced martensitic transformation in thermoelastic shape memory alloys. In order to observe this effect, $Ni_{55}Al_{25}Fe_{20}$ ribbons was manufactured; This alloy was studied because the martensitic transformation is under room temperature, furthermore the superelastic effect is observed at room temperature and also it has good mechanical properties, which makes it a good candidate for the study of the elastocaloric effect. The temperature of the ribbons was measured, adiabatically, while stress applied, so it was possible to directly observe the elastocaloric effect. The samples were characterized by three methods; in order to know the samples transformation temperature was use a differential scanning calorimetry, also, to analyze the phases in the sample it was use x-ray diffraction analysis, and finally, with an optical microscope was observe the microstructure.

Palabras Clave: Transformación martensitica, fases, temperatura de trasformación.

INTRODUCCIÓN

En estado sólido existen dos tipos de transformación de fase, reconstructiva y displaciva. En las transformaciones reconstructivas el cambio de fase se da a través de difusión atómica, lo que implica un cambio de composición química. En cambio, en las transformaciones displacivas no hay difusión atómica, lo que implica un cambio en la estructura cristalina del compuesto sin afectar su composición química; esto es, que existe un movimiento de átomos coordinado, donde las distancias que recorren son menores a un parámetro de celda.

La transformación martensitica es una transformación displaciva de primer orden. El que sea una transformación de primer orden se refiere a que presenta una discontinuidad en las primeras derivadas de los potenciales termodinámicos, en este caso concreto presenta discontinuidad en el volumen $(dG/dT)T$ y en la deformación $(dU/ds)T,S$. Otras características de las transformaciones de primer orden es la existencia de una entalpia de transformación (ΔH) y la presencia de una histéresis térmica en la transformación.

[1]Universidad Autónoma de Zacatecas, Unidad Académica de Física, Calzada Solidaridad esq. Paseo, La Bufa s/n, C.P. 98060, Zacatecas, Zacatecas, crirogui8@hotmail.com
[2]Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, División de Materiales Avanzados, Paseo a la Presa San José 2055 Col. Lomas 4ta Sección, C.P. 78216, San Luis Potosí, S.L.P, horacio.flores@ipicyt.edu.mx

Existen distintos tipos de refrigeración en estado sólido conocidos como efectos calóricos, estos son: barocalórico, electrocalórico, magnetocalórico y elastocalórico. para lograr la refrigeración con los efectos calóricos se aplican estímulos externos moderados, lo que origina una refrigeración más eficiente. En este proyecto se trabajó únicamente con el efecto elastocalórico; para lograr este efecto se utilizan aleaciones Heusler, que se caracterizan por tener una estructura cristalina tipo fcc. Particularmente para este trabajo se utilizó la aleación $Ni_{55}Al_{25}Fe_{20.}$

Para lograr el efecto superelástico es necesario aplicar un esfuerzo (σ) a la muestra a una temperatura mayor a la temperatura de transformación M_s, con el fin de inducir la formación de martensita. Para aleaciones termoelásticas, la martensita inducida por esfuerzo desaparece al eliminar el esfuerzo, es decir, regresa a la fase austenita.

Ahora bien, existen dos métodos para observar el efecto elastocalórico. El primer método consiste en medir la deformación que sufre la muestra a temperatura constante (isotérmico) y a partir de esos datos calcular la entropía del sistema. El segundo método es directo, y consiste en medir el cambio de temperatura de la muestra cuando se le aplica un esfuerzo (σ≠0) y cuando se elimina el esfuerzo (σ=0), en un ambiente adiabático. En este proyecto se utilizó el segundo método mencionado para observar el efecto elastocalórico.

MÉTODOS Y MATERIALES

En el proyecto se trabajó con cintas de la aleación $Ni_{55}Al_{25}Fe_{20}$. A continuación se describirá el proceso de elaboración y caracterización de las muestras, así como el montaje de éstas para la observación del efecto elastocalórico.

Elaboración de las muestras

El primer paso en la elaboración de cintas es obtener la aleación. La masa de las muestras elaboradas fue de 12 g con el porcentaje en peso de cada elemento puro mostrado en la tabla 1. Para alear las muestras se utilizó un horno de arco eléctrico con atmosfera de argón, a una presión de -15 mmHg; los elementos fueron fundidos cuatro veces en el horno para obtener una buena aleación.

Tabla 1. Composición en porcentaje atómico de la aleación NiAlFe

Elemento	%atómico
Ni	55
Al	25
Fe	20

Posteriormente se prepara el *Melt Spinning* para elaborar las cintas. Primero al crisol se le hace una ranura en el fondo de 4.1x0.3 mm, en seguida se cubre el interior con una película de nitruro de boro, para que la aleación no reaccione con el crisol, finalmente se seca en una mufla a 500°C por 10 minutos, y se coloca la aleación dentro del crisol. Se monta el crisol en el horno de inducción, el cual se encuentra en una cámara de vacío; la punta del crisol queda a una altura de 4 mm de la rueda. Se cierra la cámara y se hace un vacío durante 15 minutos, posteriormente se llena la cámara y los tanques de depósito con argón a una presión de 0.8 bar, enseguida los tanques se llenan de argón con una sobrepresión de 0.2 bar. Se programa la fuente y la velocidad de la rueda, en este caso a 20 m/s. Finalmente se funde el material por encima del punto de fusión, a 1630°C, y se inyecta sobre la rueda.

Caracterización

Se utilizaron tres métodos de caracterización de las muestras; calorimetría diferencial de barrido (DSC), observación con microscopio óptico y difracción de rayos X (DRX).

Se les realizó un estudio de calorimetría diferencial de barrido, con un equipo Q 200 TA, para determinar las temperaturas de transformación de las muestras. La prueba se realizó con temperaturas desde -80° hasta 40°C, a 10°C/min.

Se observó la microestructura de las muestras con un microscopio óptico. Se utilizaron cintas preparadas para el microanálisis, una parte de las cintas fueron atacadas químicamente. Para el ataque químico se utilizó una solución de 5% de ácido nítrico en metanol y el tiempo aproximado del ataque fue de 30 segundos.

Se realizó un análisis de difracción de rayos X (DRX) a temperatura ambiente, con un equipo Bruker D8 advance; para determinar las fases contenidas en las cintas.

Montaje y desarrollo experimental

Las mediciones realizadas para este sistema fueron de un cambio de temperatura (ΔT) bajo condiciones adiabáticas, aplicando un esfuerzo (σ) a la cinta.

Figura1. Equipo utilizado para aplicar esfuerzo (σ) a las cintas

Figura2. Equipo utilizado para aplicar esfuerzo (σ) a las cintas

Para lograr una medición de temperatura precisa, se le colocó un termopar a la cinta y se fijó a esta con pasta térmica y teflón. Posteriormente, se montó la cinta entre dos tenazas; como se muestra en la figura 2 una de las tenazas es fija, mientras que la otra está unida a un cable, al cual se le coloca un peso muerto, con el objetivo de aplicar esfuerzo a la cinta para lograr el efecto elastocalórico. Finalmente, las tenazas y la cinta se cubren con un vaso de precipitados y con unas toallas, con el fin de simular las condiciones adiabáticas requeridas para este experimento.

El experimento se realizó dos veces, con distintas muestras. En la primera ocasión se utilizó una cinta cuya área fue de $4.1x10^{-7}$ m^2, a la cual se le aplicó un esfuerzo σ=74MPa; al aplicarle el esfuerzo se esperó a que la muestra termalizara y se prosiguió a quitarle el esfuerzo. Con el objetivo de observar el cambio de temperatura bajo distintas condiciones y de esta manera ver el cambio de martensita a austenita y viceversa. Posteriormente, se montó la segunda muestra, cuya área fue de $5.72x10^{-7}$ m^2, a la cual se le aplicó un esfuerzo σ=106MPa, y se prosiguió a realizar el mismo procedimiento que con la muestra anterior.

RESULTADOS

Caracterización

En la caracterización se encontraron los siguientes resultados:

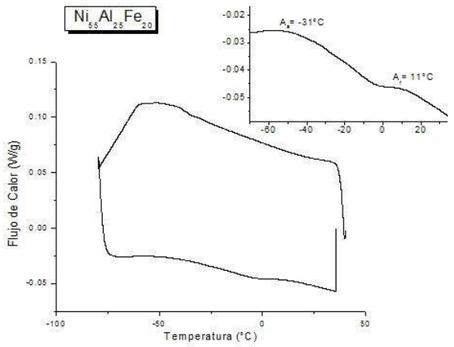


Figura3. Resultados de DSC

En los resultados de DSC, podemos observar, únicamente, la transformación de martensita a austenita; como podemos observar en la figura 3, el inicio de la transformación se encuentra en A_s=-31°C, y el final de ésta en A_f=11°C. A partir de estos resultados sabemos que la entalpía de transformación (ΔH) es pequeña, con ΔH=0.2 J/kg.

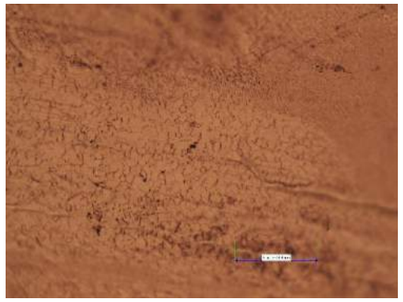


Figura4. Cinta de $Ni_{55}Al_{25}Fe_{20}$ sin ataque químico vista en microscopio óptico

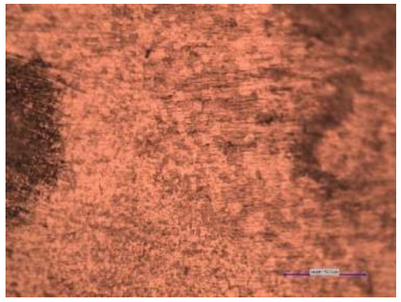


Figura5. Cinta de $Ni_{55}Al_{25}Fe_{20}$ sin ataque químico vista en microscopio óptico

En la microestructura revelada en el microscopio óptico podemos observar los granos y los límites de grano en la cinta, como podemos observar en las figuras 4 y 5, en las cintas sin ataque químico se pueden apreciar con mayor claridad los granos y sus límites. De acuerdo a la literatura, la microestructura muestra fase β rodeada por los límites de grano de fases γ y γ'.

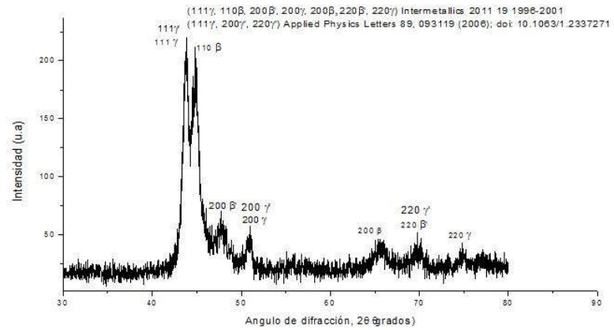


Figura6. Resultados DRX

Los resultados obtenidos de DRX, nos muestran las fases existentes en las cintas analizadas. Como se puede observar en la figura 6, existe una coexistencia de fases β, γ y γ'; lo cual nos confirma lo observado en la microestructura.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos de las pruebas realizadas a las muestras.

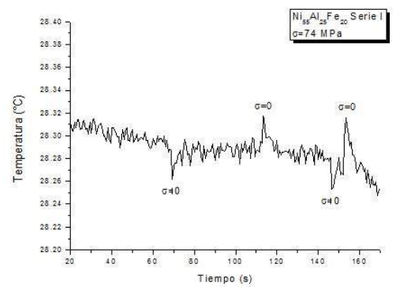


Figura7. ΔT adiabático con un esfuerzo de σ= 74 MPa

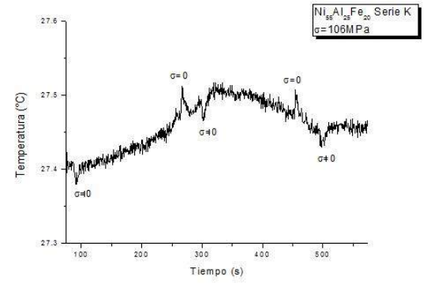


Figura8. ΔT adiabático con un esfuerzo de σ= 106 MPa

Las medidas tomadas de ΔT adiabático en ambas pruebas nos muestran que, al retirar el esfuerzo, es decir, σ=0 el material aparentemente se calienta, esto es, que pasa de martensita a austenita; en cambio cuando se aplica un esfuerzo, σ≠0, la cinta se enfría, es decir, pasa de austenita a martensita. Los resultados obtenidos muestran indicios de un efecto elastocalórico inverso, nunca antes mostrado para este sistema.

CONCLUSIONES

Partiendo de los resultados obtenidos de DSC, la entalpia de transformación es pequeña, y solo se puede observar la transformación de martensita a austenita, por lo que es necesario hacer un tratamiento térmico con el fin de generar una mayor entalpia, para que de esta manera se pueda observar la transformación de austenita a martensita. Ahora bien, de acuerdo con los resultados de DRX, existe una coexistencia de fases β, γ y γ', lo cual se confirma con la literatura en los análisis de la microestructura. Finalmente, las medidas

de ΔT_{ad} muestran que al retirar el esfuerzo $\sigma=0$, aparentemente, el material se calienta; en cambio, al aplicar esfuerzo $\sigma\neq0$ el material se enfría. Estos resultados son contrarios a lo esperado, lo que da indicios de un efecto elastocalórico inverso; para confirmar estos resultados es necesario elaborar más material y a partir de ello realizar más pruebas.

BIBLIOGRAFIA

H. Okumura y K. Uemura (2011). "Effects of rotation speed on microstructure and transition temperatures in Ni-Fe-Al melt-spun ribbons". *Intermetallics*, 19.

S.N. Kaul y otros (2006). "Thermoelastic martensitic transformation in ferromagnetic Ni-Fe-Al alloys: Effect of site disorder". *Applied Physics Letters*, 89.

Lluís Mañosa; Antoni Planes y Mehmet Acet (2013). "Advanced materials for solid-state refrigeration". *Journal of Materials Chemistry A.*

Alvarado Hernández, Francisco. "Estudio de aleaciones ferromagnéticas con memoria de forma Ni-Fe-Ga y Co-Ni-Ga" [Tesis de doctorado]. Centro de Investigación en Materiales Avanzados S. C.

NUEVAS ALEACIONES CON MEMORIA DE FORMA TIPO VIDRIO DE DEFORMACIÓN (STRAIN GLASS)

José Alonso Rodríguez Ramírez[1] y Horacio Flores Zúñiga[2]

RESUMEN

Cuando en una aleación se presenta la transformación martensítica, ésta tendrá amplias posibilidades de mostrar en su comportamiento mecánico el efecto de memoria de forma. Sin embargo, en algunas aleaciones como $Ti_{x-1}Ni_{x+1}$ también puede presentarse el vidrio de deformación (strain glass), el cual es un estado metaestable que puede considerarse como estáticamente desordenado. El desarrollo de esta investigación experimental permite entender los efectos estructurales que pueden surgir debidos a la variación de la composición estequiométrica ($Ti_{x-1}Ni_{x+1}$), además de conocer más sobre la aparición del strain glass en las aleaciones. En el siguiente escrito se muestran los diferentes procedimientos que se siguieron para obtener resultados que verifiquen la aparición de tales interesantes efectos.

ABSTRACT

When an alloy present the martensitic transformation, this has big possibilities of show in his mechanic comportment the effect of shape memory, however, in the alloy as Tix-1Nix+1 also can arise of strain glass, which a metastable state that can considered as statically disordered. The development of this experimental investigation helps to understand the structural effects that can arise due to element variations in stoichiometry compositions (Tix-1Ni1+1), also to learn more about apparition strain glass in alloys. In next written will show the different procedures to obtain results that verify appearance of such interesting effects.

Palabras Clave: Transformación, Memoria de forma, Strain Glass.

INTRODUCCIÓN

El efecto de memoria de forma, es sin duda una de las propiedades más interesantes que los materiales poseen, esta es ocasionada por los cambios de fase que ocurren cuando son sometidos a diversos estímulos de energía, tales como aplicación de esfuerzos y/o cambios de temperatura, de esa manera los materiales después de haber sufrido una deformación, pueden volver a su forma original. El vidrio de deformación es un estado del cual aún no se tiene mucha información, pero se conoce que se trata de un estado metaestable debido a que éste se encuentra en un débil equilibrio estable durante un tiempo. Por medio de esta investigación experimental se tratará de conocer un poco más sobre los efectos que ocurren en las propiedades de la memoria de forma y el Strain Glass provocados por la variación en la composición en la aleación $Ti_{x-1}Ni_{x+1}$.

---

[1]Instituto Tecnológico Superior de Irapuato, extensión San José Iturbide, Departamento de Ingeniería en Materiales, Camino a Cerrito de Galomo N° 50, Comunidad Cerrito de Galomo, C.P. 37980, San José Itubide, Gto. Correo: jacker_yea412@hotmail.com.
[2]Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. Departamento de Materiales Avanzados, Camino a la Presa San José 2055, Col. Lomas 4ª sección, C.P. 78216, San Luis Potosí, S.LP. México. Correo: horacio.flores@ipicyt.edu.mx.

MARCO TEORICO

Esta investigación experimental se basó en las investigaciones Shape Memory Effect and Superelasticity in a Strain Glass Alloy, realizada por Yu Wang, Xiaobing Ren y Kazuhiro Otsuka del Instituto Nacional de Ciencias de los Materiales en Japón, publicada el 01 de Diciembre del 2006 y en la investigación Evidence for Strain Glass in the Ferroelastic-Martensitic System $Ti_{50-x}Ni_{50+x}$, realizada por Shampa Sarkar, Xiaobing Ren y Kazuhiro Otsuka del Grupo de Física de Materiales, en el Instituto Nacional de Ciencias de los Materiales de Japón, publicada el 8 de Noviembre del 2005.

La Tercera Ley de la Termodinámica establece que la entropía en un sistema en el cero absoluto tiene un valor mínimo y constante, así la estructura cristalina de una sustancia expuesta a esta temperatura debe será perfecta, pues la entropía es una magnitud física que mide el movimiento de micro estados, es decir el desorden. Cuando creamos una aleación podemos fomentar que su microestructura tenga alguna fase especifica por medio de tratamientos térmicos, para cuando la aleación se encuentre en la fase que nos interese, someterla a templado y de esta manera atrapar la microestructura deseada. La propiedad de memoria de forma comúnmente se presenta de la siguiente manera: Se tiene una fase Austenítica, la cual sufre una deformación cambiando a Martensita, causando la formación de maclas dentro de la aleación, luego se somete a un incremento de temperatura causando que las maclas se deformen hasta que se alcanza la estructura cristalina inicial, pero si se aplica un tratamiento térmico especifico, y luego se puede tiene la probabilidad de obtener el Strain Glass que es un conjugado de la transición Ferroelastica/Martensítica y que puede ser considerado como un estado estáticamente desordenado.

MÉTODOS Y MATERIALES

Se realizaron tres aleaciones con diferentes composiciones: Ti50Ni50, Ti49Ni51, Ti48.5Ni51.5, para calcular la cantidad de material se usaron las siguientes formulas: Concentración atómica 1), porcentaje atómico del elemento 2), masa del elemento 3):

$$C_A = (m_A/A)/[(m_A/A)+(m_B/B)\ldots(m_n/n)] \quad (1)$$

$$C_{1A} = (C_A{*}A)/[(C_A{*}A)+(C_B{*}B)\ldots(C_n{*}n)] \,{*}100 \quad (2)$$

$$m = [(C1M)/100] \quad (3)$$

Una vez obtenidos los datos de las masas, se prosiguió con el pesaje de los elementos en estado puro con la ayuda de la balanza electrónica **OAHUS Explorer** ubicada en el Laboratorio de Preparación de muestras, en la planta baja del edificio Beta:

Para Ti50Ni50 (4 g): Ti=1.7968 g Ni=2.2032 g

Para Ti49Ni51 (4 g): Ti=1.7573 g Ni=2.2427 g

Para Ti48.5Ni51.5 (4 g): Ti=1.7376 g Ni=2.2624 g

La unión de los elementos se realizó por medio de la fundición con un horno de arco eléctrico del Laboratorio de Tratamientos térmicos y arco eléctrico ubicado en el segundo nivel del edificio Beta. Se refundieron 4 veces cada aleación, esto con el fin de homogeneizar la composición, y al final se realizó la elaboración de pequeñas barras para extraer una sección de ellas y someterlas a un tratamiento térmico, pero para poder aplicar el tratamiento térmico a las mismas, se necesitó introducirlas en un tubo de cuarzo, el cual fue sellado a -33.8639 Kpa (aprox.) en una atmosfera inerte de Argón (Ar). El tratamiento térmico fue de 24 horas a 1000°C, este se realizó en una **Mufla Digital Thermolyne 48000 Furnace.** Después de esto, se procedió al templado de las aleaciones en agua con hielo (T=0°C). Posteriormente, las muestras fueron fracturadas con el empleo de la **Cortadora de disco de diamante SBT inc; modelo 650** y una pequeña parte se introdujo en un porta objetos (PAN) para ser sometidos a un análisis DSC

(Differential Scanning Calorimetry), en este análisis la temperatura del portador de muestra aumenta linealmente como función del tiempo, pues cuando la muestra experimenta una trasformación física tal como una transición de fase, se necesita mayor (o menor) calor a la muestra que a la referencia para mantener ambas a la misma temperatura, que fluya más o menos calor a la muestra depende de si el proceso es exotérmico (cristalización) o endotérmico (transición de fase). Esto se logró con el **DSC Q 200 TA Instruments** que se encuentra en el Laboratorio de Tratamientos térmicos y arco eléctrico. Luego se analizó la aleación por medio del SEM (Scanning Electron Microscopy), con la técnica de EDS, pero para poder hacer el análisis con este instrumento fue necesario crear dos caras planas en cada una de las piezas, y debido a que no fue posible realizarlas con la Cortadora de disco de diamante (por la gran dureza de la aleación), se utilizó la **Pulidora SBT inc. Modelo 900 Grinder/Polisher** hasta alcanzar en la cara de la pieza un acabado espejo, y el segundo lado plano cumplió el fin de incrementar el área de contacto del metal con una cinta de grafito, esto con el fin de evitar que la aleación fuera atraída por el campo magnético que se originó durante el análisis dentro el microscopio, pues esto dañaría el mecanismo , después de esto, para poder observar la microestructura de las piezas, fue necesario atacar la cara que sería analizada con una solución de ácido Nítrico y Metanol al 10% y 90% respectivamente, una vez terminado este paso las muestras fueron montadas en un porta muestras (PIN) con la ayuda de una cinta de Grafito de doble cara y se logró analizarlas gracias al **Microscopio Electrónico de Barrido ESEM FEI-QUANTA 200,** el cual se encuentra en el LINAN (Laboratorio Nacional de Investigaciones en Nanociencias y Nanotecnología) ubicado en la planta baja del edificio Beta del IPICYT . También las aleaciones fueron analizadas por medio de la Difracción de rayos-X, para ello se necesitó pulverizar las piezas, pero debido a su gran dureza, se optó por usar una lima de acero, así la limadura de hierro se retiró con la ayuda de un imán y debido a que la aleaciones no eran ferromagnéticas, se conseguiría la muestra en estado puro (en teoría) sobre la superficie, para continuar se realizó el análisis de Rayos-X con el **Difractómetro de Rayos-X SmartLab RIGAKU,** el cual está ubicado en la planta baja del edificio Beta. A continuación se presentan los resultados de los distintos análisis realizados en esta investigación.

RESULTADOS

A continuación se presentan las gráficas de los análisis DSC, para cada aleación se realizaron dos calorimetrías, el primer análisis (línea negra) y el segundo análisis (línea roja) nos muestra una diferencia de la energía de trasformación martensítica, esto revela que la variación estequiométrica en las aleaciones es un factor muy importante para que esta transformación se presente, además la energía de transformación es menor al anterior, esto se observa mejor en la figura 1 pues la altura del pico (línea roja) es menor al del primer análisis, así se demuestra que la transformación martensítica se reduce con la aplicación repetida de temperatura en la aleación y a la disminución de Ti en las aleaciones, pues así la estructura adopta un estado ordenado más estable reduciendo la posibilidad de la aparición de Martensita. A excepción de la aleación $T_{48.5}Ni_{51.5}$, ya que desde el principio esta no presentó la transformación martensítica. Al no aparecer el cambio de fase en las calorimetrías (figura 2 y 3), la memoria de forma no

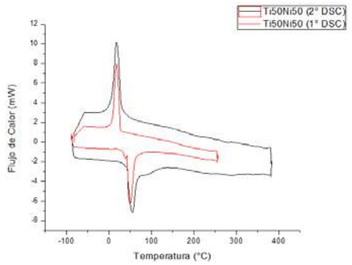


Figura 1. Grafica del análisis DSC para la aleación $Ti_{50}Ni_{50}$.

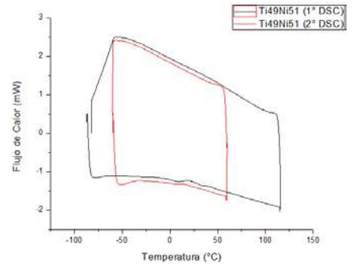


Figura 2. Grafica del analisis DSC para la aleación $Ti_{49}Ni_{51}$.

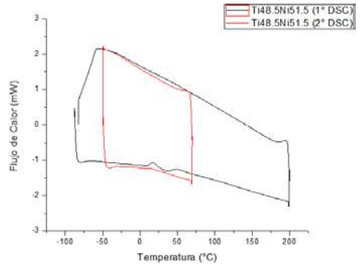


Figura 3. Grafica del análisis DSC para a aleación $Ti_{48.5}Ni_{51.5}$.

puede presentarse, sin embargo representa un indicio del estado vítreo. En el análisis de SEM con EDS se encontraron los siguientes resultados:

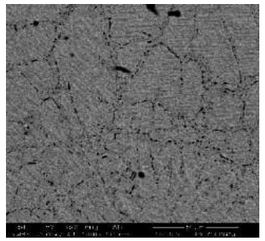


Figura 4. Micrografía correspondiente a la aleación $Ti_{50}Ni_{50}$.

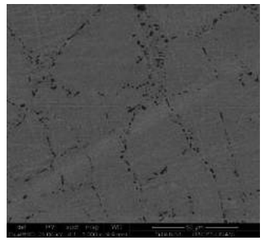


Figura 5. Micrografía correspondiente a la aleación $Ti_{49}Ni_{51}$.

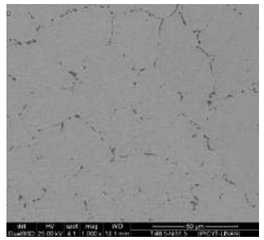


Figura 6. Micrografía correspondiente a la aleación $Ti_{48.5}Ni_{51.5}$.

La aleación $Ti_{50}Ni_{50}$ es la única que presenta la fase Martensita a temperatura ambiente, mientras que las dos restantes no, esto se debe a la composición de 50/50 que esta posee. La técnica de EDS reveló la gran variación estequiométrica que las aleaciones $Ti_{49}Ni_{51}$ y la $Ti_{50}Ni_{50}$ tuvieron, esto indicó una importante

Tabla 1. Composición correspondiente a la aleación $Ti_{50}Ni_{50}$.

Elem.	% Prom.	Desv. Est.	Var. Prom.
Ti	+-53.1	0.3	0.1
Ni	+-46.9	0.3	0.1

Tabla 2. Composición correspondiente de la aleación $Ti_{49}Ni_{51}$.

Elem.	% Prom.	Desv. Est.	Var. Prom.
Ti	+-52.1	0.3	0.1
Ni	+-47.9	0.3	0.1

Tabla 3. Composición correspondiente de la aleación $Ti_{48.5}Ni_{51.5}$.

Elem.	% Prom.	Desv. Est.	Var. Prom.
Ti	+-51.5	0.3	0.1
Ni	+-48.5	0.3	0.1

pérdida de Níquel, pero la $Ti_{48.5}Ni_{51.5}$ mantuvo su composición.

La difracción de rayos-X confirmó la existencia de algunas partículas de hierro que se encontraban en las muestras de las aleaciones, en la figura 7 se muestra las gráficas arrojadas por este análisis, en la gráfica correspondiente a la aleación $Ti_{48.5}Ni_{51.5}$ se observa un pico probablemente de hierro a un lado del pico más alto de la aleación.

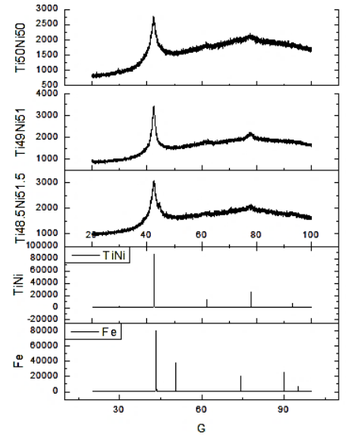


Figura 7. Comparativa de las gráficas resultantes del análisis de Difracción de rayos-X de las aleaciones

Las cartas cristalográficas utilizadas en este análisis fueron: 00-018-0899 para la aleación TiNi y la 04-002-3692 correspondiente a la carta cristalográfica del Hierro.

En la aleación $Ti_{48.5}Ni_{51.5}$ se presentó un fenómeno inusual, pues mientras se limaba para obtener las partículas para el análisis, estas se convertían en ferromagnéticas, debido a que ninguna partícula se quedaba en la superficie y todas se adherían al imán, este comportamiento supone que mientras el tamaño de la partícula disminuya la propiedad ferromagnética de las mismas irá aumentando, pero este fenómeno tal vez pueda ser originado por la mayor presencia de Níquel en la aleación, ya que este es un elemento ferromagnético.

CONCLUSIONES

1. La calorimetría realizada a las tres aleaciones permite detectar que para 51 y 51.5 % de Ni no aparece la transformación lo cual es uno de los indicadores del estado de strain glass.

2. La microestructura de las aleaciones muestra que para Ti50Ni50 si aparece la fase martensítica aunque no en las otras dos aleaciones, lo cual es otro índice para la detección del strain glass.

3. La difracción de rayos X no permite determinar si hay fase martensítica debido a que la muestra al ser pulverizada ya no fue tratada térmicamente. En este caso se esperaba tener la fase Martensita en la Ti50Ni50 y austenita en las otras dos fases.

BIBLIOGRAFIA

WILLIAM D. CALLISTER, Jr. (1995) *Introducción a la Ciencia e Ingeniería de los Materiales*. Department of Materials Science and Engineering, The University of Utah. Editorial Reverté, S.A.

Evidence for Strain Glass in the Ferroelastic-Martensitic System $Ti50_{1-x}Ni50_{1+x}$, Shampa Sarkar, Xiaobing Ren and Kazuhiro Otsuka, Phys. Rev. Lett. 95, 205702-Published 8 November 2005. Consultada en http://journals.aps.org/prl/abstract/10.1103/PhysRevLett.95.205702. (Fecha de consulta 14/06/2016)

Shape Memory Effect and Superelasticity in a Strain Glass Alloy, Yu Wang, Xiaobing Ren, and Kazuhiro Otsuka, Phys. Rev. Lett. 97, 225703–Published 1 December 2006. Consultada en http://journals.aps.org/prl/abstract/10.1103/PhysRevLett.97.225703 (Fecha de consulta 14/06/2016).

Evidence for broken ergodicity in strain glass, Yu Wang, Xiaobing Ren, Kazuhiro Otsuka, and Avadh Saxena, Phys. Rev. B 76, 132201–Published 12 October 2007. Consultada en http://journals.aps.org/prb/abstract/10.1103/PhysRevB.76.132201 (Fecha de consulta 19/06/2016).

Strain Glass: Glassy Martensite. Y. Wang, X. Ren, Kazuhiro Otsuka. National Institute for Material Science, 1-2-1 Sengen, Tsukuba, Ibaraki 305-0047, Japan. Multi-disciplinary Materials Research Center, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, 710049, China. Department of Physics, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, 710049, China. Consultada en http://www.scientific.net/MSF.583.67 (Fecha de consulta 19/06/2016).

Phase diagram of Ti50−xNi50+x: Crossover from martensite to strain glass, Zhen Zhang, Yu Wang, Dong Wang, Yumei Zhou, Kazuhiro Otsuka, and Xiaobing Ren, Phys. Rev. B 81, 224102 – Published 2 June 2010. Consultada en http://journals.aps.org/prb/abstract/10.1103/PhysRevB.81.224102 (Fecha de consulta 30/06/2016).

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al IPICYT, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. por el apoyo brindado y todas las facilidades otorgadas para la utilización de todos sus equipos de análisis para poder lograr esta investigación.

Al CONACYT, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por todo el apoyo otorgado durante la realización de este proyecto de investigación.

Al Dr. Horacio Flores Zúñiga, por brindarme la oportunidad de vivir una de las mejores experiencias durante mi formación profesional, además de su gran amabilidad y disponibilidad de trabajar.

Al Mtr. Fernando Hernández Navarro. Por todo el tiempo y la ayuda prestada para poder realizar este proyecto, además de brindarme en todas las ocasiones una respuesta para todas mis dudas y por ser una gran persona paciente y amable todo el tiempo conmigo.

A todos mis compañeros de laboratorio que siempre me trataron con respeto y amabilidad, y de esta forma me brindaron un excelente ambiente de trabajo. Sinceramente muchas gracias.

EVALUAR EXPRESIÓN DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO (GH) DESPUES DEL TRATAMIENTO CON GHRH Y TRH EN CULTIVO DE NEURONAS CEREBELARES DE POLLO

Claudia Celina Rodriguez Tinajero[1] y Maricela Luna Muñoz[2]

RESUMEN

La GH ha sido evaluada principalmente en mamíferos para conocer su funcion, sintesis y secreción. Estudios recientes han mostrado que la GH además de expresarse en la hipófisis también se expresa en tejidos extrahipofisiarios como el sistema nervioso en el pollo. En este proyecto evaluamos la regulación de la expresión de la GH en cultivos primarios de neuronas cerebelares de embriones de pollo y el efecto de GHRH, TRH y PACAP. La expresión del ARNm de GH mostró que GHRH incremento 20 veces la expresión en tanto que con TRH solo incremento 6 veces, con PACAP la expresión disminuye hasta menos del 50%. Respecto a la liberación de la proteína se observó una disminución progresiva con respecto a la concentración de TRH, mientras que con PACAP induce la liberación en forma dependiente de la concentración.

ABSTRACT

The growth hormone (GH) has been evaluated mainly in mammalia to know its function, syntesis and release. Recents studies have been shown that the GH also express into the hypophysis as well express on extrahipophysis tissues like nervous sistem in chicken. This project is focused on evaluate the GH expression regulation in the cerebellum neuron of chicken embryos by the efect of GHRH, TRH and PACAP. The expression of GH mRNA showed that had an increase of 20 times compared to the control with 10nM of GHRH ,while TRH increase only 6 times, PACAP decreases the expression to less than 50% at all concentrations used. As for the release of protein with a progressive decrease TRH is observed at all concentrations, while PACAP induced the release in a dose-dependent fashion

INTRODUCCION

En cualquier organismo, el proceso de crecimiento y desarrollo es regulado por diferentes factores ambientales, fisiologicos, genéticos o epigenéticos, los cuales determinarán la estrctura, diferenciación y límites de cada célula en particular. Aun cuando las funciones son muy parecidas, los factores que regulan son distintos para cada especimen, variando así en moléculas o expresion dependiendo de la taxa que sea descrita. La divergencia de las especies dan como resultado un sin fin de variantes para una misma molécula, aun cuando la funcion sea muy similar. Estas variaciones demuestran relación y brindan informacion del comportamiento, orígen o mecanismos de accion.

La hormona de crecimiento es una proteína con alrededor de 191 aminoacidos, diferenciando entre cada especie. Aunque ésta hormona ha sido descrita y secuenciada, la regulación de síntesis, secreción y función a sido evaluada en mamíferos mayoritariamente. Estimula el crecimiento de tejidos y órganos, producida por la glándula hipófisis durante toda la vida, dando los picos más altos durante la adolescencia y la producción mas baja al envejecer. No tiene un órgano diana fundamental, actúa sobre el organismo en el desarrollo de los tejidos corporales. En la vida fetal la GH tiene un papel importante en el desarrollo y diferenciación del SNC, principalmente en el crecimiento cerebral, sinaptogénesis, y mielinización (estudios en rata). En la etapa postnatal favorece la neuroprotección, el incremento del apetito, modifica el estado de ánimo y funciones cognitivas como el aprendizaje y la memoria, así como regular el flujo sanguíneo.

[1] Universidad de Guanajuato, Division de ciencias naturales y exactas, Noria Alta S/N, C.P. 36050, Guanajuato, Guanajuato, cc.rodrigueztinajero@ugto.mx, claudia_clace@hotmail.com
[2] Universidad Nacional Autonoma de Mexico, Instituto de Neurobiología, Bioquimica de Hormonas, Boulevard Juriquilla 3001, C.P. 76226 , Juriquilla, Queretaro Arteaga lunam@unam.mx

La diferenciación es bajo la regulación de un factor transcripcional (GHF-1) / factor de transcripción especifico pituitario(pit-1). La expresión de *pit-1* en células normales y tumorales es restringida para la secreción celular de GH, prolactina y la hormona estimuladora de thirotropina (TRH). Es necesaria la presencia de secretagogos para comenzar la expresión de RNAm correspondiente. El RNAm de GH comenzará la sintesis de la hormona dentro del órgano productor (estudios de hipófisis), y en cuanto es formada viaja a las perfierias a los organos diana.

Se ha sugerido que la GH pasa por la barrera hemato-encefálica, o bien ser producida localmente y actuar por mecanismos parácrinos y autócrinos. Para ejercer los efectos en el organismo, la GH interactúa con su receptor el cual contiene un dominio extracelular, membranal e intracelular. En el dominio intracelular se encuentran enzimas Jak2, importantes para la transducción de señales, éstas al activarse fosforlian residuos de tirosina del receptor que activarán las proteínas STAT, activadoras de transcripción de genes diana en el núcleo.

En el pollo se han localizado en células de Purkinje y granulares del cerebelo. La identificación se registra en distintas áreas cerebrales, principalmente en neuronas de la capa granular, células de Purkinje y en menor proporción en neuronas de la capa molecular. Por otra parte se localizaron los receptores de hormona de crecimiento (GHR) en células de Purkinje y granulares, por lo que se cree en un efecto local en estas áreas. Debido a esto se sugirieron los efectos autócrinos y parácrinos. Además, el hecho de que en los embriones de 15 días de desarrollo aun no han diferenciado completamente la hipófisis, apoya la posibilidad de accion cercana o propia en distintos órganos, como el cerebelo.

Es de esperar que las modificaciones de los secretagogos, sean hipofisiarios o cerebelares, aumenten la proporcion de expresión hormonal en la zona, suponiendo un mayor efecto por parte de GHRH. Por eso se ha decidido que el objetivo del presente trabajo recae en el hecho de determinar como está regulada la síntesis y la liberación de la hormona de crecimiento que se expresa en las celulas cerebelares en embriones de pollo.

MÉTODOS Y MATERIALES

Cultivos primario de neuronas

Se utilizaron embriones de 15 días de incubación los cuales fueron sacrificados por decapitación previamente anestesiados en hielo. El cerebelo se separo y disecto en un amortiguador libre de calcio y magnesio (CMF) en medio de Hank y albúmina sérica bovina (BSA) a pH de 7.25. La disgregación celular se llevó a cabo tanto enzimática (tripsina 0.5%,10 min a 37ºC) como mecánicamente (con pipetas Pasteur siliconizadas). La reacción de la tripsina fu parada con suero fetal bovino (SFB) al 10% en medio DMEM.

El cultivo se realizará en placas de 12 pozos cubiertas con poli-L-lisina (PLL, 50□g/ml) con una densidad celular de 3 millones de células por pozo en Neurobasal suplementado con B27 y GlutaMAX, y con antibiótico (penicilina/estreptomicina) y se dejaron estabilizar el cultivo por 24h en una incubadora con humedad, 5% de CO_2, a 37ºC

Regulación de la síntesis/secreción de la GH

Para determinar la regulación de la síntesis/secreción de la GH la células se incubaron con GHRH, TRH, y PACAP a diferntes concentraciones (0.1,1,y 10nM). Para evaluar la expresión se determinó mediante la cuantificación del ARNm de GH por PCR cuantitativa, y de la proteína (y sus variantes moleculares) por Western blot.

RESULTADOS

Expresión del ARNm de GH

Utilizando diluciones en 1:5 del cDNA se observa un aumento de la expresión GH con las distintas concentraciones (0.1, 1 y 10 nM) de GHRH mostrando un máximo de hasta 20 veces con la concentración de 10 nM (Fig.1a). A pesar de que son datos preliminares se observa un incremento dependiente de la dosis de GHRH .Con respecto al tratamiento con PACAP se observó que la expresión de ARNAm de cGH disminuye a mas de la mitad con respecto al control (Fig. 1b)

Estos aunque preliminares señalan que este factor podría actuar como un inhibidor en el proceso de síntesis de la GH. El efecto del tratamiento con TRH a los cultivos primarios de neuronas cerebelares mostraron un aumento progresivo en comparacion al control. La concentracion más alta logró una incremento de la expresion de hasta 6 veces con respecto al control (Fig.1c). Sin embargo, esta concentración es farmacológica (TRH con 1000nM) y la disperción de los datos a 10 nM no permiten concluir si se requiere la más alta por lo que es de gran importancia complementar el numero de experimentos para que sea significativo el cambio en la expresión.

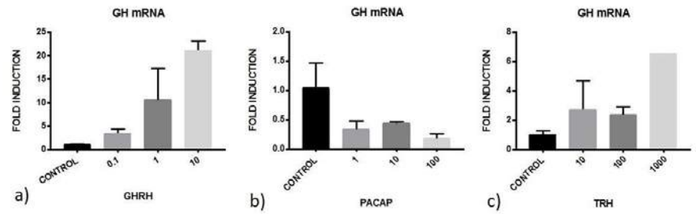


Fig. 1. Proporción relativa del ARNm de GH con diferentes tratamientos: a) GHRH a concentraciones 0.1, 1 y 10 nM. Se observa un incremento progresivo conforme la concentración aumenta. b)PACAP a concentraciones 1, 10 y 100nM. se ilustra la disminución de la expresión del ARN con todas las concentraciones usadas. C)diferentes concentraciones (10, 100 y 1000nM) de TRH. Se observa que la concentración 1000nM incrementa la expresión del gen hasta 6 veces con respecto al controldiferentes concentraciones (10, 100 y 1000nM) de TRH. Se observa que la concentración 1000nM incrementa la expresión del gen hasta 6 veces con respecto al control.Cada barra representa la media de dos replicas ± desviación estandar

Análisis electroforético de la GH liberada al medio de cultivo:

Para determinar el patrón de secreción de la GH se realizó una electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) tanto en condiciones reductoras como no reductoras y fueron tansferidas a una membrana para su inmunoidentificación.

Se realizó el análisis densitométrico del film (Fig. 4) donde se observan las bandas inmunoreactivas para cGH con los tratamientos PACAP y TRH. Para realizar el análisis se estandarizo el control como 1 para comparar con los tratamientos .Se puede observar el patrón de bandas de diferentes pesos moleculares que van de 15, 22 y 26 kDa,

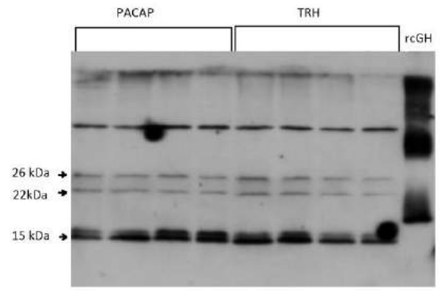


Fig. 4. Luminograma representativo que muestra el patrón de variantes de GH liberadas al medio despues del tratamiento con diferentes concentraciones de PACAP y TRH. Las bandas representan las diferentes isoformas de GH (26kDa, 22kDa y 15kDa).

Al evaluar la concentración relativa de las bandas se puede observar una disminución de síntesis proteica en el tratamiento de PACAP con respecto a su forma de 26kDa (posible forma glicosilada) por otro lado los resultados observados para la forma de 15kDa son mayoritarios en comparación con el control, mostrando un incremento del 3%.

Por otro lado, la proporción registradas en el tratamiento de TRH disminuyeron en sus tres variantes. Siendo más claro para las isoformas de 22 y 26kDa donde se observa una disminución inversa con respecto a la concentración de TRH. En el caso del fragmento de15kDa se observó una disminución en la liberación en comparación con el control.

CONCLUSIONES

La sobreexpresión de un secretagogo modifica la traduccion del gen que exprese la síntesis hormonal. La traducción del mRNA provoca un aumento en la síntesis y expresión de la proteína, la cual tiene un efecto en las células diana. Las pruebas anteriores nos orientan a pensar que el secretagogo con mayor eficiencia de estimulación ante GH en células cerebelares de pollo es GHRH, el cual se comporta de manera positiva, estimulando la expresión en incremento de los RNA mensajeros que sintetizan la hormona. Asi mismo, la expresión elevada de los RNA puede aumentar la síntesis de la proteína en las celulas cerebelares, como nos indican los resultados de inmunoreactividad.

Aun cuando la GHRH sea el principal estimulante de GH en el cerebelo cabe mencionar que tanto TRH y PACAP juegan un papel dentro de las células, ya que al ser modificadas pueden interferir en el desarrollo celular, sea positiva o negativamente. Tambien es destacable que aun cuando TRH es menos eficiente que GHRH, es posible estimular la produccion de cGH con éste secretagogo. Con estos datos se puede concluir que si por algun motivo la GHRH fuera dficiente, dañada o ausente de la célula la TRH podría estimular la producción en bajas concentraciones. Tambien se podría pensar en una produccion en distinto tiempo de la ontogenia del pollo, expresandose en una etapa menos activa.

Los resultados obtenidos favorecen a pensar en un incremento en la forma de 15kDa en vez de la de 22kDa o la 26kDa. Este resultado puede indicarnos que la existencia de varios factores de regulacion (como lo son PACAP o TRH) favorecen la producción hormonal con un pico de eficiencia en distinto tiempo de la ontogenia, el tejido en el cual sea sintetizado o percibido, o en las cantidades utilizadas. La diferente eficacia del secretagogo puede hacer una modificacion en la síntesis de la hormona, englobando conecuentemente las distintas variantes de a proteína GH (26kDa, 22kDa, o 15kDa).

BIBLIOGRAFÍA

Alba-Betancourt C, Arámburo C., Ávila-Mendoza J, Carranza M, Harvey S, and **Luna M**. Expression, cellular distribution and heterogeneity of growth hormone in the chicken cerebellum during the development. *Gen Comp Endocrinol,* 170: 528-540, 2011.

Alba-Betancourt C, Luna-Acosta JL., Ramírez-Martínez C., Avila-González D., Granados-Avalos E., Carranza M., Martínez-Coria H., Arámburo C., and **Luna M**. Neuro-protective effects of growth hormone (GH) after hypoxia-isquemia injury in embryonic chicken cerebellum., *Gen Comp Endocrinol*, 183: 17-31, 2013.

Arámburo, C., Alba-Betancourt, C., **Luna, M.,** Harvey, S. Expression and function of neural growth hormone: A brief review. Gen Comp Endocrinol, 203: 35-42, 2014

Luna, M., Martínez-Moreno C., Ahumada-Solórzano, M., Harvey, S., Carranza, M., Arámburo, C. Extrapituitary growth hormone in the chicken reproductive system, Gen Comp Endocrinol, 203: 60-68, 2014.

Luna M., Rodríguez-Méndez A.J., Luna-Acosta J.L., Carranza M., Arámburo C. Expression and function of chicken bursal growth hormone (GH). *Gen Comp Endocrinol 190: 182–187, 2013*

Carlos Eduardo Pinzón, Martha Lucía Serrano, María Carolina Sanabria.(2009) "Papel de la vía fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K/Akt) en humanos" en Revista de Ciencias de la SaludBogotá (Colombia) vol. 7 (2): Mayo-Agosto [pp. 47-66].

Arturo Valle Mendiola, Isabel Soto Cruz (2005) "Vía JAK-STAT: Una visión general" en VERTIENTES, Revista especializada en Ciencias de la Salud, Vol. 8 (1-2) Julio-Diciembre [pp. 14-25]

BRADFORD, H. (1988). Fundamentos de neuroquímica. Editorial Labor, S.A. Barcelona, España. [485 p.]

Stephen Harvey, Colin G. Scanes, William H. Daughaday.(1994) Growth Hormone. CRC Press Book

Gabriela Cabrera Serra M , Arístides De León Gil y Ninoska Flores Quisbert (2005) " Proteinas Quinasas, Cáncer y Metástasis" consultado en http://www.biocancer.com/journal/197/proteinas-quinasas-cancer-y-metastasis (21/07/2016)

ROBERT S. MCDOWELL, KATHLEEN A. ELIASt, MARK S. STANLEY, DANIEL J. BURDICK, JOHN P. BURNIER, KATHRYN S. CHAN, WAYNE J. FAIRBROTHER, R. GLENN HAMMONDSl, GLADYS S. INGLE, NEIL E. JACOBSEN, DEBORAH L. MORTENSEN, THOMAS E. RAWSON, WESLEY B. WON, Ross G. CLARK, AND TODD C. SOMERS (1995)

"Growth hormone secretagogues: Characterization, efficacy, and minimal bioactive conformation" en Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 92, [pp. 11165-11169] November 1995 Biochemistry consultado en http://www.pnas.org/content/92/24/11165.full.pdf (21/07/2016)

Yoshio Murakami, Kunio Koshimura, Katsumi Yamauchi, Masateru Nishiki, Junko Tanaka, Hiroshi Furuya, Tatsuko Miyake,Yuzuru Kato. (1995) "Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) stimulates growth hormone release from GH3 cells through type II PACAP receptor")

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO DE PLANTAS DE ZONAS NATURALES PROTEGIDAS DEL ESTADO DE GUANAJUATO

Mariana Atzhiry Rojas Raya[1] y Blanca Estela Gómez Luna[2]

RESUMEN

Las áreas naturales protegidas tienen como fin, la conservación de la biodiversidad. Las bacterias promotoras de crecimiento de plantas (PGPR), son bacterias de vida librede la rizósfera y poseen efectos benéficos en las plantas. En el presente trabajo se realizó el aislamiento de bacterias promotoras de crecimiento de plantas dela rizósfera de árbolesde mezquite (*Prosopislaevigata*) yárboles de ciruelilla (*Embothriumcoccineum).* Se aislaron 100 cepas con actividad de ACC (1- acido carboxílico, -1-aminociclopropano) desaminasa, se seleccionaron 50 aislados para pruebas de germinación, antagonismo contra hongos fitopatógenos y producción de sideróforos, ensemillas de lenteja (*Lens Culinaris*) y rábano (*Raphanussativus*). Las cepas presentaron resultados positivosen las pruebas realizadas, comparados con el control sin rizobacterias.

ABSTRACT

Protected natural areas has the purpose the conservation of biodiversity. Promoting growth plant rizobacteria (PGPR) are free-living bacteria of the rhizosphere and have beneficial effects on plants. In this paper the isolation of growth promoting bacteria in the rhizosphere of plants mesquite trees (*Prosopislaevigata*) and trees chileanfirebush (*Embothriumcoccineum*) was performed. Were isolated 100 strains with ACC activity (1-carboxylic acid , 1- aminocyclopropane) deaminase, 50 were selected for testing germination isolated, antagonism against phytopathogenic fungi and siderophore production, in seeds lentil (*Lens Culinaris*) and radish (*Raphanussativus*). Strains showed positive results compared to the control without rhizobacteria.

Palabras Clave: Rizobacterias, Áreas Naturales Protegidas, suelo, antagonismo.

INTRODUCCIÓN

El estado de Guanajuato se caracteriza por una diversidad biológica inigualable, conformada por una riqueza natural de especies de plantas de gran importancia ecológica y cultural. Las áreas naturales protegidas son porciones terrestres o acuáticas del territorio nacional representativas de los diversos ecosistemas, en donde el ambiente original no ha sido esencialmente alterado y que producen beneficios ecológicos importantes. Un área natural protegida contribuye a la conservación del patrimonio natural ya que ayuda a reducir el impacto ambiental, (CONANP, 2012). El estado de Guanajuato cuenta con 23 áreas naturales protegidas, de acuerdo alInstituto de Ecología del Estado Guanajuato, sin embargo, las áreas naturales protegidas del estado se encuentran en peligro debido a la falta de control en el cuidado de las especies de plantas características de la región. El uso de microorganismos para la conservación de las especies vegetales del estado es una herramienta biotecnológica muy importante de gran impacto ambiental. La rizósfera, región del suelo que fue descrita por Hiltner en 1904 como el área del suelo influenciada por los exudados de la raíz, es un sistema dinámico donde se detecta la máxima actividad microbiana, en el cual las interacciones y la comunicación entre raíz y microorganismo juegan un papel

1Instituto Tecnológico Superior de Irapuato, Departamento de Ingeniería Bioquímica ; Carretera Irapuato-Silao km 12.5, El Copal, C.P: 36821,Irapuato, Guanajuato, atzrock@live.com.mx
2Universidad de Guanajuato, Campus Celaya-Salvatierra,Departamento de Ingeniería Agroindustrial; ProlongaciónRíoLerma s/n , Suiza, C.P: 38060,Celaya, Guanajuato, be.gomez@ugto.mx

muy importante en el mantenimiento del crecimiento y productividad vegetal, (Curl*et al*, 1986).Las bacterias asociadas a las raíces y cuyo hábitat es la rizósfera, se les denomina rizobacterias.Las bacterias promotoras de crecimiento de plantas, PGPR por sus siglas en inglés (Plantgrowth-promotingrhizobacteria),son bacterias que habitan en la rizosfera, (Do Carmo*et al*, 2011). Las PGPR mejoran el crecimiento, la producción y la salud de las plantas, mediante mecanismos directos e indirectos, (Malik*et al*, 2011). Los mecanismos indirectos se caracterizan porque las PGPR ocasionan la disminución o eliminación de microorganismos fitopatógenos (hongos, bacterias y nemátodos), ya sea a través de la producción de sustancias antimicrobianas, de sideróforos, de enzimas líticas, o una combinación de éstas, (Glick, 1995. Los mecanismos directos incrementan la disponibilidad de nutrimentos en la rizósfera al influir en el metabolismo de las plantas y mejorar su nutrición. Estos mecanismos son: fijación de nitrógeno; síntesis de fitohormonas (auxinas, giberelinas, citocininas), vitaminas y enzimas; solubilización de fósforo inorgánico y mineralización de fosfato orgánico; oxidación de sulfuros; incremento en la permeabilidad de la raíz; producción de nitritos; acumulación de nitratos; y reducción de la toxicidad por metales pesados y de la actividad de la enzima ACC desaminasa, (Glick, 1995). En 1998 se sugirió que algunas rizobacterias promueven el crecimiento vegetal mediante la disminución de los niveles de etileno en plantas, a través de la acción de una enzima que desamina al precursor inmediato del etileno, el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC): tal enzima es la ACC desaminasa, (Glick*et al*, 1998).

Como antecedente a este trabajo, la investigación de Victoria-Gordillo, 2014 quién llevó a cabo el aislamiento de bacterias promotoras de crecimiento de plantas de huertos de guayaba para probar su efectividad como agentes de control biológico, obteniendo como resultado la eficacia en el control biológico. Por otro lado, también se cuenta con se cuenta con la investigación de Hidalgo-Villagomez, 2015, que realizó muestreo en suelo de árboles de guayaba, obteniendo resultados positivos y confirmando la promoción del crecimiento de plantas mediante bacterias promotoras de crecimiento de plantas, reportando pruebas efectivas la germinación de semillas, detección de producción de sideróforos, ácido indol acético (AIA), entre otras.

MÉTODOS Y MATERIALES

La investigación se realizó las instalaciones del laboratorio del Departamento de Ingeniería Agroindustrial,Campus Celaya- Salvatierra de la Universidad de Guanajuato.

Muestreo de suelo
Se seleccionaron 2 árboles de mezquite (*Prosopislaevigata*) y 2 árboles de ciruelilla (*Embothriumcoccineum*) para el muestreo de sueloubicados en la comunidad de Las Cruces, Cerro del Culiacán, con coordenadas geográficas, 200º 55’ 5’’ latitud norte, 100 58’ 38’’ longitud oeste, con una altura promedio sobre el nivel del mar de 2160 metros, en Salvatierra, Guanajuato. En cada uno de los árboles se tomaron 2 muestras de suelo, el muestreo se realizó el 20 de junio del 2015.

Aislamiento y purificación de bacterias promotoras de crecimiento de plantas
Se colocaron 20 g de suelo de las 4 muestras obtenidas en 4 recipientes 90 ml de agua estéril cada una. Se mantuvieron en agitación constante por 90 minutos y posteriormente se dejaron reposar por 30 minutos. Las muestras de suelo se utilizaron para realizar el aislamiento de rizobacterias en el medio selectivo para actividad de la enzima ACC (1- ácido carboxílico, -1- aminociclopropano) desaminasa mediante el sembrador de colonias automático SpyralplaterInterscience. El medio de cultivo contiene por litro 4 g KH_2PO_4, 6 g $NaHPO_4$, 0.2 g $MgSO_4$, 1 mg $FeSO_4$, 10 µg H, 10 µg $MnSO_4$, 50 µg $CuSO_4$, 10 µg MoO_3, 70 µg $ZnSO_4$, glucosa 0.2%, ac. glucónico 0.2%, agar bacteriológico al 2% y ACC 3mM (SIGMA), según indicaciones de Penrose y Glick 2003. Se incubaron a 28°C durante 48 horas.Se aislaron 100 cepas de las 4 muestras de suelo y se procedió a la purificación por estría simple en medio PDA de las bacterias que presentaron actividad de ACC desaminasa. Se incubaron a 28 °C de 24 a 48 horas.

Caracterizaciónde bacterias promotoras de crecimiento de plantas mediante Tinción de Gram
Las 100 cepas seleccionadas se caracterizaron mediante Tinción de Gram, colocando cristal violeta, lugol, alcohol al 96% y safranina. Los frotis obtenidos se dejaron secar y se observaron al microscopio con el objetivo de inmersión.

Pruebas de germinación
De los 100 aislados obtenidos, seseleccionaron 50 cepas para pruebas de germinación sobre semillas de lenteja y de rábano. Las cepas se inocularon en tubos Falcon con 10 ml de infusión de papa. Se mantuvieron en agitación constante por 4 horas y se llevaron a incubación a 28 °C durante 24 horas. Posteriormente, se colocaron 25 semillas de lenteja y rábano en cada tubo y se agitaron por 15 minutos. Las semillas se colocaron en cajas Petri con papel humedecido con agua estéril, se incubaron a 28º C por 72 h y se registraron los porcentajes de germinación. Además se realizó la medición de las radículas y se llevó a cabo una comparación en la cantidad de vellosidades radiculares en contraste con el control (semilla sin bacteria).

Pruebas de antagonismo contra hongos fitopatógenos
Las 50 cepas elegidas se probaron en antibiosis contra los hongos fitopatógenos *Bipolarissp*, *Fussariumoxisporum, y Alternariasp* en medio PDAsembrando 4 cepas seleccionadas por caja distribuidas en 4 cuadrantes a una distancia del hongo de 4 cm aproximadamente. Se dejaron incubar a 28 °C por 48 horas.

Pruebas de producción de sideróforos
Las 50 cepas elegidas se probaron sobre la producción de sideróforos en el medio agar CAS.Para la preparación del medio CAS se prepararon 4 soluciones:

La solución 1, o solución indicadora Fe-CAS se preparará mezclando 10 ml de una solución 1 mM de FeCl3.6H2O (en HCl 10mM) con 50 ml de una solución acuosa de CAS (Cromo azurol S, SIGMA) con una concentración de 1.21 mg/ml. La mezcla se adiciona a 40 ml (1.82 mg/ml) de una solución acuosa de HDTMA (Bromuro de Hexadecil-trimetil-amonio, Fluka). La solución resultante se esteriliza. La solución 2, o solución reguladora se preparó disolviendo 30.24 g de PIPES (piperazina-N,N´-bis[2-ácido etanosulfónico] Sigma, en 800 ml de una solución salina (0.3 g KH2PO4, 0.5 g NaCl, 1.0 g de NH4Cl, pH 6.8). Se adicionan 15 g de agar y se esteriliza. La solución 3, 70 ml de agua se adicionaron 2 g de glucosa, 2 g de manitol, 493 mg de MgSO4.7H2O, 11 mg de CaCl2, 1.17 mg MnSO4.H2O, 1.4 mg H3BO3, 0.04 mg CuSO4.5H2O, 1.2 mg ZnSO4.7H2O y 1.0 mg Na2MoO4.2H2O y se esteriliza. La solución 4, consiste de 30 ml de casaminoácidos al 10% (p/v) Difco, esterilizados por filtración. La solución 3 se adiciona a la solución reguladora junto con la solución de casaminoácidos. La solución indicadora se adiciona al final con suficiente agitación evitando la formación de burbujas y obteniendo una coloración azul celeste.Para la detección de producción de sideróforos los aislados bacterianos se inoculan en el medio y se incuban a 28°C por 48 hrs. Se detectan halos naranjas alrededor de las colonias. Siguiendo las indicaciones Alexander y Zuberer 1991.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en las pruebas realizadas nos demuestran que los 50 aislados seleccionados presentaron características que promueven el crecimiento de la planta.

En la caracterización de las cepas con tinción Gram, el 92% son grampositivas y el resto gramnegativas.
En las pruebas de germinación de lenteja, se obtuvo un porcentaje mayor al del control, siendo las más representativas las cepas A1-103, A1-109, A1-112, B2-203, C1-255, C1-256, C1-270,D1-302, D1-305, D1-314 y D1-317, además, el efecto positivo de las cepas en las plantas, también se vió reflejado en el tamaño radicular, como se puede observar en la figura 2. En las pruebas de germinación de rábano, la

efectividad de las rizobacteriasse vio reflejada en el tamaño radicular y en la gran cantidad de vellosidades que aparecieron en las raíces,como se puede observar en la radícula de la cepa A1-112 de la figura 3, en contraste con el control.Los porcentajes de germinación obtenidos de ambas semillas se pueden observar en la gráfica de la figura 1. Posiblemente el efecto de las cepas tuvo un mayor impacto sobre la germinación de las lentejas porque se incubaron por más tiempo que las semillas de rábano, y debido a que la semilla de rábano posee como característica vellosidades radiculares, inmediatamente el efecto se reflejó en el aumento de los mismos.

En las pruebas de antagonismo contra hongos fitopatógenos, todas las cepas seleccionadas presentaron actividad de control biológicoal menos contra 1 hongo. Las cepas más representativas que presentaron actividad de control biolólogico contra todos los hongos fitopatógenos elegidos *Fussariumoxisporum,Alternariasp y Bipolarissp* fueron C1-258 y D1-303. La cepa B2-205 tuvo control biológico solamente contra los hongos *Alternariasp* y *Bipolarissp*, por otro lado, la cepa D1-308 fue efectiva contra los hongos *Fussariumoxisporum, yAlternariasp.* En la figura 4, se puede ver el efecto de inhibición de algunas cepas contra el hongo *Bipolarissp.*

En las pruebas de producción de sideróforos, la gran mayoría de las cepas mostraron el halo naranja característico, entre algunas de ellasse encuentran A1-111, A1-112, A1-116, A1-117 y A1-119.

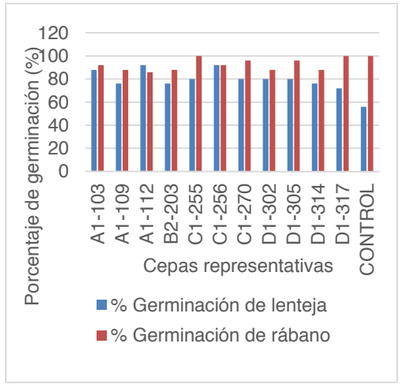


Figura 1. Porcentaje de germinación de semillas de lenteja y de rábano con las cepas más representativas.

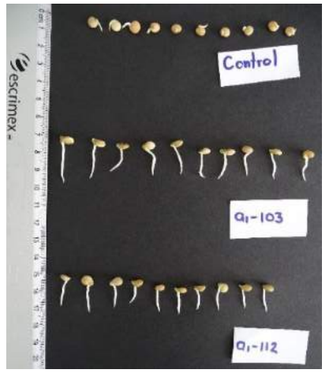


Figura 2. Fotografía que muestra de manera comparativa el efecto de las cepas en el tamaño de la radícula de semillas de lenteja, en contraste con el control.

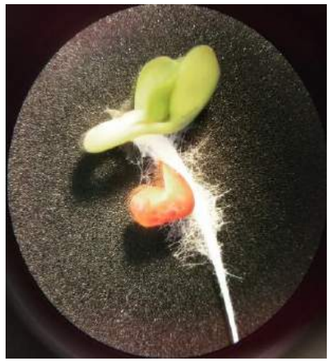


Figura 3. Fotografía tomada al estereoscopio de una radícula de rábano. Se ve el efecto positivo de las rizobacterias en la aparición de pelos radiculares.

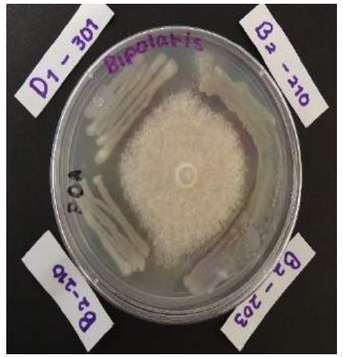


Figura 4. Fotografía que muestra el efecto de control biológico de las cepas contra el hongo fitopatógenoBipolarissp.

CONCLUSIONES

Las bacterias promotoras de crecimiento de plantas,son una herramienta biotecnológica que tendrá un gran impacto en el ámbito agrícola y de conservación de especies de plantas debido a que son microorganismos que promueven el crecimiento de plantas, mejoran la salud vegetal y previenen enfermedades mediante mecanismos de defensa contra hongos fitopatógenos, producción de sideróforos, aumento en el tamaño y número de radículas y vellosidades para una toma de nutrientes más efectiva.

Como perspectiva se planea probar con semillas de árboles de áreas naturales protegidas (ANP) de la región para su preservación, sin embargo por cuestiones de tiempo, se probaron en semillas de rápido tiempo de germinación obteniendo resultados positivos en las pruebas realizadas.

BIBLIOGRAFIA

Alexander, D.B. &Zuberer, D.A. (1991). *Use of chromeazurol S reagents to evaluatesiderophoreproductionbyrhizosphere bacteria*. BiolFertSoils. Vol. 12. [pp. 39–45].

Curl, E., Truelove, B. (1986). *The Rhizosphere. Advanced Series in Agricultural Sciences*. Vol. 15. Springer-Verlag, Berlin. 288.

Dworkin, M., Foster, J. W. (1958). *Experimentswithsomemicroorganismswhichutilizeethane and hydrogen*. Journal of Bacteriology, Núm. 5, Vol. 75, [pp.592–603].

Do Carmo, F., dos Santos, H., Martins, E., Van Elsas, J., Rosado A., Peixoto R. (2011).*Bacterial structure and characterization of plant growth promoting and oil degrading bacteria from the rhizospheres of mangrove plants*. J. Microbiol. 49: 535-43.

Glick, B. (1995). *The enhancement of plant growth by free-living bacteria.* Can. J. Microbiol. 41:109-117.

Glick, B., Penrose, D., Li J. (1998). *A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria*. J. Theor. Biol. 190:63-68.

Instituto de Ecología del Estado Guanajuato. *Comisión nacional de áreas naturales protegidas (CONANP)*, consultada en http://anps.guanajuato.gob.mx/index.html (fecha de consulta 15-07.2016).

Malik, D., Sindhu, S. (2011). *Production of indole acetic acid by Pseudomonas sp: effect of coinoculation with Mesorhizobium sp. Cicer on nodulation and plant growth of chickpea (Cicer arietinum*). Physiol. Mol. Biol. Plants 17: 25-32.

Penrose, D M., Glick, B R. (2003).*Methodsforisolating and characterizing ACC deaminase-containingplantgrowth-promotingrhizobacteria*. Physiol. Plant. Vol. 118 [pp.10-15].

Victoria, J. (2015). Análisis de compuestos involucrados en la promoción de crecimiento de plantas por rizobacterias de guayaba. Licenciatura. Universidad de Guanajuato.

Villagomez, A. (2015). *Análisis de compuestos involucrados en la promoción de crecimiento de plantas por rizobacterias de Guayaba.* Licenciatura. Universidad de Guanajuato.

EFECTO POTENCIAL DE LAS ESPECIES ÍCTICAS EXÓTICAS IVASORAS EN RÍOS DE LA RESERVA DE LA BIOSFERA SIERRA GORDA DE QUERÉTARO

Ebsheidi Yaritza Rosales Marquez[1] y Juan Pablo Ramírez Herrejón[2]

RESUMEN

El objetivo de este proyecto es identificar las diferentes especies de peces exóticos y nativos que se encuentran en algunos de los ríos y puntos específicos de la Reserva de la Biósfera "Sierra Gorda" para realizar estudios en laboratorio de contenidos estomacales, de esta forma será posible conocer, si las especies nativas y exóticas están compitiendo por alimento o si las especies exóticas están excluyendo algunas de las especies nativas. También se lleva a cabo la identificación a nivel familia de los macroinvertebrados acuáticos, con el fin de utilizarlos como bioindicadores para medir la calidad de hábitats y la condición biológica del ecosistema.

ABSTRACT

The objetive of this project is to identify different exotic species and native fish found in some of the rivers and specific points of the Biosphere Reserve "Sierra Gorda" to make stomach contents studies in the laboratory. Thus, it will be possible to know if native and exotic species are competing for food or if exotic species axclude some native species. It also carries out family level identification of aquatic macro-invertebrates, in order to use them as bio-indicators to measure the quality of habitats and the biological condition of the ecosystem.

Palabras Clave: Especies exóticas, contenidos estomacales, macro invertebrados y calidad ambiental.

INTRODUCCIÓN

La Reserva de la Biosfera "Sierra Gorda de", Querétaro, está ubicada en el norte del estado de Querétaro, con una extensión de 383, 567 hectáreas, distribuidas entre los municipios Jalpan de Serra, Landa de Matamoros, Arroyo Seco, Peñamiller y Pinal de Amoles, lo que representa un 32. 02% del territorio total del estado. La reserva cuenta con cuerpos de agua: como los Ríos Escalena, Blanco, Ayutla, Carrizal, Tangojó, Concá, y Santa María, la Presa Jalpan y el manantial Chuveje. Las especies de peces que han sido introducidas a arroyos, ríos y presas son: *Oreochromis niloticus* (mojarra tilapia), *Oreochromis mossambicus* (tilapia roja), *Cyprinus carpio* (carpa espejo), *Macrobrachium carcinus* y *M. acanturua* (acamaya), *Oncorhynchus mykiss* (trucha arcoiris), *Micropterus salmoides* (lobina negra), *Lepomis macrochirus* (pez sol) e Ictalurus punctatus (bagre de canal).

Una especie exótica es una especie que se encuentra fuera de su área de distribución original o nativa, no acorde con su potencial de dispersión natural. Algunas de estas son capaces de adaptarse y usualmente las actividades humanas son las principales causantes de la introducción de algunas especies exóticas.

Los peces son indicadores de largo plazo de las condiciones del hábitat porque son longevos y móviles, representan una variedad de niveles tróficos (omnívoros, insectívoros, carnívoros, etc.) y las estructura de la comunidad de peces es un reflejo de la salud ambiental integrada.

[1]Universidad Autónoma de Zacatecas, Licenciatura en Ciencias Ambientales , facultad de Ciencias de la Tierra. Calzada Universidad 108, progreso, C.P: 98058, Zacatecas, Zac, México, yariheidi@hotmail.com
[2]Universidad Autónoma de Querétaro, facultad de Ciencias Naturales, laboratorio de Integridad Biótica, Campus UAQ Aeropuerto, carreta. Chichimequillas, Ejido Bolaños, C.P: 76140, Santiago de Querétaro, Qro, México. ramirezherrejon@gmail.com

Gracias a los análisis de contenidos estomacales en los peces se puede obtener información sobre cuál es el alimento de los peces, en qué lugares se alimenta, cada cuando y en qué cantidad. Esto explica cuál es el hábito alimentario de cada especie, así como la relación entre especies y la posible disputa por el alimento que se encuentra en su hábitat.

Los macroinvertebrados acuáticos son organismos que se pueden ver a simple vista, pueden tener un tamaño superior a los 0.5mm de longitud. Los taxa más comunes incluidos en este grupo son: Moluscos, Coleóptera, Díptera, Ephemeroptera, Hemiptera, Odonata y Trichoptera. La diversidad de macroinvertebrados es utilizada como bioindicador ya que estos organismos integran efectos de las variaciones ambientales a corto plazo, la tolerancia a la contaminación de su hábitat es diferente, componen especies de una amplia gama de niveles tróficos, el muestreo, no requiere de muchas personas para realizar y su identificación a nivel familia es fácil.

MÉTODOS Y MATERIALES

Una evaluación de la calidad de hábitat es fundamental para cualquier evaluación de la integridad ecológica, y debe realizarse en cada sitio en el momento de la toma de muestras biológicas.

Macroinvertebrados y Peces.

Para empezar la recolección de ejemplares de peces y macroinvertebrados es necesario identificar los HMU (unidad hidromorfológica) que tienen los ríos, puede ser; rapid, plunge pool, cascade, side arm, rifle, pool, backwater, fast run, run o giide (Parasiewicz. 2007). También se evalúa la calidad de hábitat, esta es fundamental para cualquier evaluación de la integridad ecológica y debe realizarse en cada sitio en el momento de la toma de muestras biológicas. Esta evaluación incluye una descripción general de cada sitio y se puede lograr mediante la caracterización de parámetros físico-químicos del agua, los parámetros a medir son la velocidad de corriente, vegetación de ribera, morfología del canal, marca de agua, temperatura, conductividad específica, oxígeno disuelto, solidos disueltos totales, % oxígeno disuelto, pH, potencial de óxido reducción y turbidez (Barbour et al. 1999).

Para la recolección de ejemplares de peces se usó métodos como la electro-pesca, la tarraya y chinchorro. La electro-pesca consiste en usar, la electricidad para "aturdir" los peces y así capturarlos con mayor facilidad. El modelo cuanta con dos electrodos que gracias a estos dispersa corriente en al agua y esto hace que los peces que están cerca se "aturdan" y esto facilita la captura de ejemplares de los peces.

Figura 1. Técnica de electro-pesca

Figura 2. Recolección de macroinvertebrados

Figura 4. Medición de parámetros fisicoquímicos

Figura 5. Medición de parámetros fisicoquímicos

Procesamiento de los peces: después de haber recolectado los peces con las diferentes técnicas, se hace procesamiento solo a algunos ejemplares (30 aproximadamente). Cada pez se pesó, se midió y se extrajo el estómago para el análisis del contenido estomacal. El resto de los ejemplares se depositaron en frascos con una solución de alcohol al 70% para llevarlos a laboratorio...

Figura 5. Procesamiento del pez, contenido estomacal.

Figura 6. Procesamiento del pez, peso.

Figura 7. Procesamiento del pez, medición

Recolección de macroinvertebrados: para la recolección de macro invertebrados se utilizó una red tipo D. los sitios de recolecta también son elegidos por los diferentes HMU que puede tener cada río. Después de recolectar la muestra con la red esta se deposita en una charola, y todo macroinvertebrado que se vea (por un rango de 5 minutos) es separado con ayuda de unas pinzas.

Estos se colocan en frascos pequeños con una solución de alcohol 70%, cada uno con su correspondiente etiqueta, los datos que se integran son; lugar de recolecta y fecha, a cada una de las muestras se le asigna una clave. Después en laboratorio los macroinvertebrados son identificados y cuantificados a nivel familia, con ayuda de un microscopio, estos datos se incorporan a tablas de Excel, y de esta forma según la suma de familias que se identifican se puede valorar la calidad del agua de cada sitio.

Figura 8. Separación de macroinvertebrados

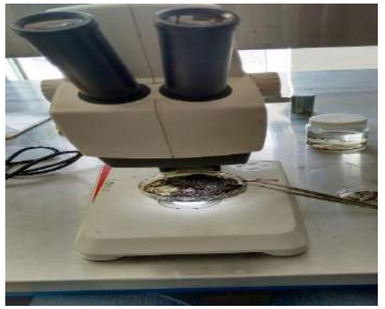


Figura 9. Identificación de macroinvertebrados

Adicionalmente se contribuyó con la recolección de las muestras en el proyecto de la empresa “Toyota” para la recuperación de un canal colector de aguas pluviales y una sección del rio Querétaro. También en un proyecto sobre la evaluación de la calidad ambiental del lago de Pátzcuaro con identificación de macroinvertebrados y en el proyecto sobre la ecología trófica de una especie exótica el pez guatopote mexicano (*Heterandria bimaculata*), con análisis de contenidos estomacales.

RESULTADOS

Los peces recolectados en mayor cantidad fueron, *Pecilia mexicana*, *Poeciliopsis gracilis*, Astyanax mexicanus, diferentes especies de cíclidos (se cree que probablemente alguno de estos ejemplares son híbridos) mojarras y *Micropterus salmoides* (lobinas). Poeciliopsis gracilis es considerada como una especie exótica invasora, así como especies que son de consumo humano como son las mojarras y las lobinas. Se espera realizar los estudios de contenido estomacal de todos los peces (los ejemplares que se tienen son cientos, y aún falta muestrear más) y así se podrá entender la dieta de cada una de las especies que forman parte de la biodiversidad de los ríos en la Reserva de la biosfera “Sierra Gorda”. También se podrá llegar a conclusiones si las especies están compitiendo por el alimento y si algunas de las especies exóticas se están alimentado de peces más pequeños endémicos, está poniendo en peligro las poblaciones de las especies nativas, algunas de las especies nativas son *Poecilia mexicana* y *Astyanax mexicanus*.

En la recolección de macroinvertebrados se notó una gran diferencia en cuanto calidad ambiental entre dos proyectos diferentes, en los sitios de muestreo de Sierra Gorda se pudieron observar diferentes tipos de familias de macroinvertebrados (ordenes como: Coleóptera, Ephemeroptera, Odonata, Hemiptera, Trichoptera), y en los sitios muestreados para el proyecto de la empresa Toyota, solo se encontraron en grandes cantidades especies que toleran grandes niveles de contaminación como son Chironomidae y Syrphidae ambas de orden díptera.

Al realizar el conteo de las diferentes familias encontradas en los diferentes sitios de muestreo se utiliza un índice se establece el nivel de calidad este puede ser alta, buena, media escasa o mala.

CONCLUSIONES

Los estudios sobre contenidos estomacales en peces son de gran importancia para entender la red trófica de los ecosistemas dulceacuícolas, en el caso de este proyecto se debe poner énfasis, ya que existe la posibilidad que las especies exóticas estén poniendo en riego a especies endémicas de Sierra Gorda. Para

que esta ANP llegue a su objetivo en su categoría como Reserva de la Biosfera es necesario que se logre algunos proyectos para la conservación de las especies endémicas. Por otro lado el uso de macroinvertebrados como bioindicadores es importante para medir la calidad de hábitat y del agua, así se puede llevar un control de calidad de las reservas de agua dulce que se tienen al mismo tiempo que protegerla o remedirla según lo que se necesario.

BIBLIOGRAFIA

Barbour, M.T,.J Gerritsen, B.D. Snyder, y J.B. Stribling 1999. Rapid Bioassessment Protocols for Use in Streams and Wadeable Rivers: Periphyton Benthic Macroinvertebrates and Fish, Second Edition. EPA 841-B-99-002. U.S. Environmental Protection Agency; Office of Water; Washington, D.C

EFECTO DE LA TRH EN REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS Y LIBERACIÓN DE LA HORMONA DEL CRECIMIENTO (GH) EXPRESADA EN LOS LINFOCITOS B DE POLLO

Diana Alejandra Rubio Delgado[1] y Maricela Luna Muñoz[2]

RESUMEN

Se sabe que la GH se expresa en los tejidos del sistema inmune (timo y bolsa de Fabricio [BF]) donde participa en la proliferación y anti-apoptosis. Sin embargo, no se conoce como está regulada su expresión. Por lo tanto, en cultivos primarios de linfocitos B de BF de pollo, se determinó el efecto de la administración de TRH (1, 10 y 100 nM). La cuantificación de la expresión de GH por qPCR, no mostró diferencias significativas entre los tratamientos. Sin embargo, la liberación de la GH en los medios de cultivo evaluada mediante SDS/Western Blot mostró una disminución significativa ($P<0.05$) en la proporción con respecto al control.

ABSTRACT

Now is know that GH is expressed in tissues of immune system (thymus and bursa of Fabricius [BF]), and it is involved in proliferation and anti-apoptosis. Chicken B-lymphocytes of the bursa of Fabricius were treated with different concentrations of TRH (1, 10 and 100 nM). The GH mRNA expression in cells was quantified by qPCR and no significant differences ($P < 0.05$) between treatments were observed. The GH release was quantified in cell culture media by western blot and a significant diminution ($P <0.05$) was observed in all treatments compared with the control.

Palabras Clave: Bursa de Fabricio, TRH, GH, qPCR, Western Blot

INTRODUCCIÓN

En el área médica, la hormona del crecimiento (GH) sirve como tratamiento para deficiencias intrínsecas como el hipopituitarismo o el estudio de efectos adversos relacionados con su hipersecreción como la acromegalia. El primer tratamiento exitoso se realizó en 1965 en un paciente joven con déficit de GH, el cual consistió en la administración de GH purificada de hipófisis, obteniendo como resultado la restitución del crecimiento (Ayyar, 2011). Además de la principal expresión de GH a nivel hipofisiario actualmente existen diversos estudios que han demostrado que la GH se sintetiza en tejidos extrahipofisarios como; el tejido neural (Yoshizato & Fujikawa, 1996), sistema inmune (Hull & Thiagarajah, 1996), sistema esquelético (Harvey & Johnson, 2000), sistema respiratorio (Allen & Bloor, 2000), aparato digestivo (Tresguerres, 1999) y sistema cardiovascular (Costa & al, 1993).

Existe una relación estrecha entre el sistema inmune y el eje somatotrópico, además, la GH puede actuar como inmunomodulador (Enríquez & Paez, 2013). En humanos la GH incrementa el número de timocitos en individuos infectados con VIH (Redelman, 2008).Por otra parte en estudios *in vitro* con macrófagos de murinos se observó una mejora significativa en la producción de citoquinas tales como interleucina-1β, interleucina-12p40 e IFN-γ, además de quimocinas como la proteína inflamatoria de macrófagos-1 beta (Tripathi & Sodhi, 2008).

[1] Universidad Autónoma de Aguascalientes, Centro de Ciencias de la Salud; Av. Universidad #940, Ciudad Universitaria, C.P: 20131, Aguascalientes, Aguascalientes, ale.rubio127@gmail.com
[2] [2]Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Neurobiología, Depto. Neurobiología celular y molecular, Campus UNAM Juriquilla, Blvd. Juriquilla 3001, Querétaro, Qro. C.P 76230, lunam@unam.mx

En el pollo se ha demostrado la expresión de la proteína y ARNm de GH en el timo, bolsa de Fabricio (órganos linfoides primarios) y bazo (órgano linfoide secundario) a lo largo del desarrollo (Luna, 2005), observando que a las 4 semanas es donde se encontraron las concentraciones mayores de GH (Luna, 2008). La bolsa de Fabricio de pollo (BF) es un órgano que sirve de reservorio para los linfocitos B (95% de células son linfocitos B), es además donde se diferencian y maduran, por lo tanto es importante determinar cómo se regula la expresión de GH en esa etapa de desarrollo. Por otra parte, la síntesis y liberación de GH a nivel hipofisiario se regula mediante el estímulo de diversos secretagógos como la hormona liberadora de la hormona del crecimiento (GHRH), hormona liberadora de tirotropina (TRH) y ghrelina**.** La TRH es una potente liberadora de la hormona del crecimiento en aves (Szabo, 1986) y se sabe que los receptores de la TRH están presentes en linfocitos humanos periféricos (Raiden, 1995) sin embargo en el pollo no se han evaluado.

Por lo tanto, el objetivo de este proyecto es determinar si la TRH promueve la síntesis y liberación de GH en los linfocitos B de la bolsa de Fabricio de pollo como ocurre en la hipófisis.

MARCO TEÓRICO

La GH es una proteína de 191 aminoácidos que actúa como mensajero endocrino, sintetizada principalmente en los somatotropos de la hipófisis anterior (adenohipófisis) y regulada a través de factores hipotalámicos principalmente por GHRH y somatostatina (Grenvik & Shoemaker, 2002). Existen diversas variantes moleculares provenientes de un solo gen, 22 kDa, 20 kDa y otras que sufren modificaciones postraduccionales como una glicosilada de 26kDa y otros fragmentos de 16.5 kDa en el humano, se ha demostrado que las variantes de la GH pueden ser liberadas a la circulación, aunque la isoforma que se libera principalmente corresponde a la forma monomérica de 22 kDa. La GH se libera al torrente sanguíneo para llegar a las células blanco y ejercer su efecto de manera directa o a través del factor de crecimiento insulinoide tipo I (IGF-1) secretado en el hígado. (Gunawardane & Hansen, 2015). Cuando la GH se une a su receptor (GHR), una proteína transmembranal perteneciente a la familia de las citocinas tipo I, desencadena la vía de señalización JAK2/STAT 5 promoviendo la expresión del gen IGF-1 (Herrington & Smit, 2000).

La principal función de la GH es estimular el crecimiento longitudinal de tejidos blandos y esqueléticos, sin embargo, también regula el metabolismo de lípidos, proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos, participa en la respuesta inmune, angiogénesis y retención de nitrógeno (Morales & Velázquez, 2010). En tejidos inmunes y células de distintas especies se ha reportado la presencia de ARNm de GH, tales como médula, bazo y timo de roedores (Weigent, 1992), tejidos linfoides de pollos (Render, Hull, & Harvey, 1995) linfocitos B de ratas (Weigent & Rohn, 1995) y leucocitos humanos (Wu, 1996).

La GH es capaz de estimular la proliferación de linfocitos T y B, la síntesis de inmunoglobulinas, mejorar la maduración de las células precursoras mieloides, modular la respuesta de citocinas (Meazza, 2004) e incrementar la producción de citocinas pro-inflamatorias en procesos infecciosos (IL-1ß, IL-6, IL-12, TNF α, INF γ) (Becker, 2001). En humanos, la deficiencia de GH no se asocia con inmunodeficiencias y solo pequeñas anormalidades en el sistema inmune han sido reportadas en comparación con las deficiencias que se han observado en modelos animales. Es posible que en humanos la producción local de GH en el sistema inmune compense la falta de GH endocrina (Meazza, 2004). Se ha sugerido que la síntesis y secreción de la GH en células inmunes podrían ser regulada de forma semejante a lo que ocurre en la hipófisis, ya que existen evidencias que muestran elementos que controlan la expresión de GH en hipófisis como el factor liberador de la hormona de crecimiento (GHRH) y la somatostatina (SRIF) en linfocitos (Weigent y col., 1988). Sin embargo en aves se sabe que la TRH tiene efectos muy importantes en la regulación de la liberación de GH (Szabo, 1986). La TRH es un tripéptido producido en el núcleo paraventricular del hipotálamo, su principal función es promover la síntesis de la hormona estimulante de la tiroides (TSH), así como regular la liberación de otras hormonas como la prolactina, vasopresina e insulina. La hormona se acopla al receptor (TRH-R), que pertenece a la familia de los receptores acoplados a proteína Gq, con siete pasos transmembranales en TRHR1 y 5 para TRHR2. La unión al receptor induce la actividad GTPasa

de la proteína Gq/11 que se encarga de activar a la fosfolipasa C, la cual hidroliza el fosfatidil – inositol-bifosfato (PIP2) en inositol – trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG) promoviendo la movilización de calcio intracelular y activación de proteincinasa C (Hinkle, Gehret, & Jones, 2012). El mecanismo para la liberación de GH por TRH en los linfocitos no se ha esclarecido, sin embargo, estudios *in vitro* de células adenohipofisiarias de pollos y peces han mostrado un aumento en la producción de GH al administrar diferentes concentraciones de TRH, además, se propone que la TRH moviliza calcio intracelular necesario para la liberación de esta hormona (Perez, Malamed, & Scanes, 1989; Xin-Wei, Hao-Ren, & Peter, 1993).

MÉTODOS Y MATERIALES

CULTIVOS PRIMARIOS DE LINFOCITOS B:

a) Se extrajeron las bolsas de Fabricio de pollos de 4 semanas de edad y se colocaron en tubos falcón de 15 ml con 13 ml de medio RPMI 1640 (1X de la marca Gibco, L-glutamine mM y 25 mM HEPES).
b) En campana de flujo laminar, en cajas de Petri se cortaron los tejidos en trozos de ½ mm^3 aproximadamente (con medio RPMI 1640), para posteriormente homogeneizarlos mecánicamente por 10 minutos en homogenizador vidrio/vidrio.
c) Se filtró la suspensión y se centrifugó por 5 minutos a 1800 rpm, a temperatura ambiente (Centrífuga BECKMAN COULTER Avanti J-25), se descartó el sobrenadante con pipeta Pasteur, se aforó a 10 ml (con medio RPMI 1640) y se repitió el lavado x 3 veces.
d) Se realizó el conteo celular y viabilidad con hematocitómetro (cámara de Neubauer) y azul de tripano. Alícuotas de 10,000 células se colocaron en tubos eppendorf y se incubaron con el tratamiento de TRH:
    1. Tubo1: sin TRH (control); Tubo:2 TRH a 1 nanomolar (nM); Tubo3: TRH a 10 nM; Tubo4: TRH a 100 nM.
e) Se incubaron en una atmosfera de 95% aire +5% CO_2 durante una hora a 36ºC, después se centrifugó por 5 minutos a 1800 rpm (temperatura ambiente), se separaron en tubos eppendorf el medio de cultivo de las células y se congelaron.

- RT-PCR:

a) Extracción de ARN: Se realizó con el equipo Direct-zol RNA MiniPrep, siguiendo el método de Trizol y la cuantificación a través del Thermo Scientific Nanodrop 1000 spectrophotometer.
b) Retrotranscripción de ARN: Después de la cuantificación de ARNm se tomó 1µl de cada muestra (Ctrl, 1nM, 10 nM y 100 nM) y agregaron las siguientes mezclas:
    1. Mezcla 1: 8 µl Buffer, 1 µl Oligos dT (INVITROGEN ® .5µg/µl), 1 µl Hexámeros (INVITROGEN ®), 1 µl dNTP´s (INVITROGEN ®) y la cantidad respectiva de ARN para alcanzar los µg requeridos y completando a 23 µl con agua estéril.
    2. Mezcla 2: 4 µl de DTT (INVITROGEN ®), 0.25 µl de RNAsa out (Recombinant Ribonuclease Inibitor INVITROGEN ®), 0.75 µl agua estéril y 1µl de transcriptasa reversa Superscript.
c) La reacción para la transcripción se llevó a 42°C durante 50 minutos y una vez terminada la retrotranscripción se guardaron las muestras a -70°C

-PCR PUNTO FINAL:

a) Se usó el oligonucleótido para la proteína gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).
b) La reacción para amplificar los ARNm fue la siguiente:
    i. Buffer 1x (5µL), dNTPs .2 mM (1µl), oligo F .1 mM (1µl), oligo R .1 mM (1µl), Mg2Cl 2 mM (2 µl), Taq (0.2 µl), cDNA 1 µl y H2O para 25 µl.
c) El programa de amplificación fue de 10 min. a 95 ^{0}C, 30 seg. a 95 ^{0}C, 30 seg. a 58 ^{0}C, 1 min. a 72 ^{0}C, y 7 min. a 72 ^{0}C. Después se realizó una electroforesis con gel de agarosa al 2% por 50 minutos a 100 volt y se reveló con un visor de UV.

-PCR TIEMPO REAL:

a) Se amplificó cada punto de dilución por duplicado incluyendo en cada reacción 0.05 µM de cada oligonucleótido específico, 2.5 mM de MgCl2 y 1 µl de la mezcla de reacción (Syber Green / Taq polimerasa de Roche / dNTPs)

b) Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo de desnaturalización a 95 ºC por 10 min, 40 ciclos de amplificación con 10 seg. a 95 ºC, 10 seg. a 65 ºC y 20 seg. a 72 ºC, después de incubación a 72 ºC en cada ciclo se cuantificó el registro de la fluorescencia del Syber green. Una vez terminados los ciclos de amplificación, se realizó una curva melting para descartar amplificaciones inespecíficas. Las curvas obtenidas se analizaron en el paquete computacional Master de Roche.
c) Se obtuvo la cuantificación del producto de qPCR a partir de la determinación de CT comparativo, usando como gen de referencia la fracción 18s ribosomal. La significancia de las diferencias entre las medias de los niveles de expresión de los ARNm se determinó con un ANOVA de una vía y se consideró diferencia estadísticamente significativa a $P<0.05$.

-SDS/PAGE y WESTERN BLOT

a) Alícuotas de 20 µl de medios de cultivo de linfocitos T con tratamiento de TRH (Control, 1 nM, 10 nM y 10nM) se corrieron en geles de acrilamida al 12.5% en condiciones reductoras (SDS/PAGE). Posteriormente las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa a 200mA por 60 min. La membrana se bloqueó con leche descremada 5% en TBS (Tris 100 mM, NaCl 2.5 M, pH 7.5) por 2 horas a temperatura ambiente. Para la inmunodetección se utilizaron anticuerpos contra GH (rabitt-anti-chicken GH, dilución 1:10000), en TTBS (Tween 20 al 0.05% en TBS) con leche al 1% durante 12 horas. Las membranas se lavaron con TTBS y se incubaron con el segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa de rábano (anti-rabitt IgG–HRP, dilución 1:6000) por 2 horas. Las bandas inmunorreactivas se revelaron con un sustrato quimioluminiscente ECL (Amersham/Accesolab) por 5 minutos y se expusieron en una película Kodak Biomax ML.

RESULTADOS

En la **tabla 1** se muestran las cantidades de ARN total extraído de las células tratadas con TRH.

Tabla 1. Cuantificación de ARNm de linfocitos B

Muestras	Control	1 nm	10 nm	100 nm
1	376.2 ng/µl	469.4 ng/µl	435.5 ng/µl	684.8 ng/µl
2	375.8 ng/µl	447.7 ng/µl	560.2 ng/µl	693.4 ng/µl
3	396.8 ng/µl	419.5 ng/µl	581.8 ng/µl	793 ng/µl

Para separar el ARNm del total de ARN extraído de las células, se realizó una retrotranscripción utilizando Oligo dT y posteriormente un PCR punto final para el gen constitutivo GAPDH, que se muestra en la **Fig. 1,** para corroborar que el cDNA fuera óptimo para los siguientes experimentos.

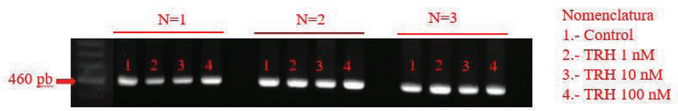


Figura 1. Expresión del ARNm de GAPDH por PCR punto final de linfocitos B

Se realizaron los PCRs en tiempo real con los cDNAs de las células tratadas con TRH **(Fig. 2 A)**, donde se observa que el ARNm de la GH no cambia significativamente con los tratamientos, sin embargo, se observa un incremento con la concentración de 10 nM de TRH (Control, 1.66 ± .699 vs 10 nM, 2.420 ± .593).

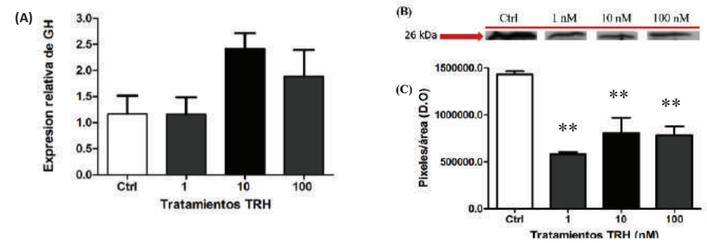


Fig. 2 A) Expresión del ARNm de GH de linfocitos B con tratamientos de TRH. Cada barras representan la media ± error estándar de n=2, por triplicado. B) Bandas representativas de los medios de cultivo con diferentes concentraciones de TRH. C) Densitometría de las bandas con los tratamientos de TRH, cada barra representa la media ± E.E. de n=3 (ANOVA de una vía, y Dunnet mostraron diferencias significativas **(P<0.05)

Se cuantificó la GH liberada en los medios de cultivos de linfocitos B por Western Blot **(Fig.2B)** se muestra un gel representativo con bandas inmunoreactivas de peso molecular aparente de 26 kDa. Al realizar el análisis densitométrico de los luminogramas se observó una disminución significativa en su liberación con respecto al control **(Fig. 2C).**

DISCUSIÓN

Con estos datos preliminares determinamos que la expresión del ARNm de GH en linfocitos B de la BF en presencia de TRH no mostró diferencia significativa con respecto a el control en concentraciones bajas, pero hay una tendencia a aumentar con TRH a 10 nM, seguramente al incrementar el número de experimentos se podrían obtener resultados más claros de este efecto y significancia. En el caso de la liberación de GH, se observa una inhibición; se requiere llevar a cabo otros experimentos para poder definir cuál es el mecanismo por el cual disminuye GH, una es que sea procesada a nivel intracelular generando fragmentos que no son detectados por este anticuerpo o bien degradarse por completo. En el caso de somatotropos el efecto observado es de un incremento en la síntesis, sin embargo en el caso de los tejidos extrahipofisiarios quizás los reguladores son otros péptidos.

En humanos se ha reportado una disminución de la GH liberada en plasma al inducir la liberación de GH con L-dopa y arginina y administrar posteriormente1 mg de TRH intravenosa (Maeda & Kato, 1975; 1976). Estudios más recientes en equinos reportan una disminución en las concentraciones de GH al administrar TRH (Pruett & Thompson, 2003), sugiriendo que la TRH no sólo tiene un efecto estimulante en la liberación de GH, sino también inhibitorio. Hasta el momento solo podemos señalar que TRH disminuye su liberación, en tanto que la síntesis de ARNm de GH queda pendiente definirla con un mayor número de experimentos.

CONCLUSIONES

- TRH disminuye la liberación de GH en los medios de linfocitos B de pollos.
- A concentraciones 10 nM de TRH se observa un aumento en la síntesis de ARNm GH.

BIBLIOGRAFÍA

Allen, J., & Bloor, C. (2000). Expression of growth hormone-releasing factor, growth hormone, insulin-like growth factor-1 binding proteins in human lung. *Neuropeptides*, 98-107.

Ayyar, V. (2011). History of growth hormone therapy. *Indian Journal Endocrinoly and Metabolism*, 162–S165.

Becker, K. (2001). Critical Illness and Systemic Inflammation . En K. Becker, *Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism* (pág. 2070). EUA: Lippincott Williams and Wilkins.

Chen, H. (1997). Growth hormone and Pit-1 expression in bovine fetal lymphoid cells. *Domestic animal endocrinology*, 399 - 407.

Costa, A., & al, e. (1993). Immunolike growth hormone substance in tissues from human embryos/fetuses and adults. *Journal Endocrinology Investigation*, 625 - 633.

Enríquez, C., & Paez, P. (2013). Comunicación bidireccional entre el sistema inmune y neuroendocrino a través de la hormona de crecimiento, prolactina y hepcidina. *Revista MVZ Córdoba*, 3585 - 3593.

Grenvik, A., & Shoemaker, W. (2002). Inmunología neuroendocrina en el paciente en estado crítico. En *Tratado de medicina crítica y terapia intensiva* (pág. 803). Madrid: Editorial Medica Panamericana.

Gunawardane, K., & Hansen, T. (2015). *Normal Physiology of Growth Hormone in Adults.* Dinamarca: Endotext.

Harvey, S., & Johnson, C. (2000). Extrapituitary growth hormone in peripheral tissues of early chick embryos. *Jurnal Endocrinology*, 489 - 502.

Herrington, J., & Smit, L. (2000). The role of STAT proteins in growth hormone signaling. *Oncogene*, 2585 - 2597.

Hinkle, P., Gehret, A., & Jones, B. (2012). Desensitization, trafficking, and resensitization of the pituitary thyrotropin - releasing hormone receptor. *Frontiers in Neuroscience*, 1-3.

Hull, K., & Thiagarajah. (1996). Cellular localization of growth hormone receptors/binding proteins in immune tisssues. *Cell Tissue Research*, 69 - 80.

Iwasaki, K., & Fujii, A. (1987). The stimulation of somatostatin release by hpGRF44 from rat hypothalamic cells and fragments in vitro. *Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine*, 117–124.

Jutisz, M. (1980). *Synthesis and Release of Adenohypophyseal Hormones.* EUA: Springer.

Kanasaki, H., & Yonehara, T. (2002). Differential Regulation of Pituitary Hormone Secretion and Gene Expression by Thyrotropin-Releasing Hormone. A Role for Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Cascade in Rat Pituitary GH3 Cells. *Biology of Reproduction* , 107 - 113.

Lantinga van, L. (2000). Growth hormone gene expression in normal lymph nodes and lymphomas of the dog. *Anticancer Research*, 2371 – 2376.

Laverriere, J. (1983). Inverse control of prolactin and growth hormone gene expression: effect of thyroliberin on transcription and RNA stabilization. *The EMBO Journal*, 1493- 1499 .

Luna, M. (2005). Heterogeneity of growth hormone immunoreactivity in lymphoid tissues and changes during ontogeny in domestic fowl. *General and Comparative Endocrinology*, 28 - 37.

Luna, M., A.J. Rodríguez-Méndez, L. Berumen, J.Riesgo-Escovar. M-L Baudet, S. Harvey and C. Arámburo. Immune Growth Hormone (GH): Localization of GH and GH mRNA in the Bursa of Fabricius. *Dev Comp Immunol 32(11): 1313-1325, 2008*.

Maeda, K., & Kato, Y. (1975). Suppression by Thyrotropin - releasing hormone (TRH) of human growth hormone release induced by L-dopa. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 408 - 411.

Maeda, K., & Kato, Y. (1976). Suppression by Thyrotropin-Releasing Hormone (TRH) of Growth Hormone Release Induced by Arginine and Insulin-Induced Hypoglycemia in Man. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 453 - 456.

Meazza, C. (2004). Effect of growth hormone (GH) on the immune system. *Pediatric Endocrinology Reviews*, 490 - 495.

Mijiddorj, T. (2011). Stimulatory effect of pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide (PACAP) and its PACAP type I receptor (PAC1R) on prolactin synthesis in rat pituitary somatolactotroph GH3 cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 172–179.

Morales, J., & Velázquez, M. (2010). *Integración neuroinmunoendócrina.* México: Imprenta Universitaria.

Perez, F., Malamed, S., & Scanes, C. (1989). Possible participation of calcium in growth hormone release and in thyrotropin-releasing hormone and human pancreatic growth hormone-releasing factor synergy in a primary culture of chicken pituitary cells. *General and Comparative Endocrinology*, 481 - 491.

Pruett, H. E., & Thompson, D. L. (2003). Thyrotropin releasing hormone interactions with growth hormone secretion in horses1. *American Society of Animal Science*, 2343 – 2351.

Raiden, S. (1995). TRH Receptor on Immune Cells: In Vitro and in Vivo Stimulation of Human Lymphocyte and Rat Splenocyte DNA Synthesis by TRH. *Journal of Clinical Immunology*, 242 - 249.

Redelman, D. (2008). Neuroendocrine hormones such as growth hormone and prolactin are integral members of the immunological cytokine network. *Cellular Immunology*, 111-121.

Render, C., Hull, K., & Harvey, S. (1995). Expression of the growth hormone gene in immune tissues. *Endocrine*, 729 – 735.

Schonbrunn, A., & Tashjian, A. (1979). Modulation of Somatostatin Receptors by Thyrotropin-releasingHormone in a Clonal Pituitary Cell Strain. *The Journal of Biological Chemistry*, 190-198.

Szabo, M. (1986). TRH and GRF stimulate release of growth hormone through different mechanisms. *The American Journal of Physiology*, 1344 - 1351.

Tresguerres, J. (1999). Salivary gland is capable of GH synthesis under GHRH stimulation. *Journal Endocrinology*, 217 - 222.

Tripathi, A., & Sodhi, A. (2008). Growth hormone-induced production of cytokines in murine peritoneal macrophages in vitro: Role of JAK/STAT, PI3K, PKC and MAP kinases. *Immunobiology*, 430 – 440.

Weigent. (1992). The production of growth hormone and insulin-like growth factor-I by the same subpopulation of rat mononuclear leukocytes. *Brain, behavior and immunity*, 365 - 376.

Weigent, D., & Rohn, W. (1995). Cloning and nucleotide sequencing of rat lymphocyte growth hormone cDNA. *Neuroimmunomodulation*, 108 - 114.

Wu, H. (1996). Localization of growth hormone messenger ribonucleic acid in the human immune system. A clinical research center study. *The Journal of clinical Endocrinology and metabolism*, 1278 - 1282.

Xin-Wei, L., Hao-Ren, L., & Peter, R. (1993). The regulatory effects of thyrotropin-releasing hormone on growth hormone secretion from the pituitary of common carp in vitro. *Fish Physiology and Biochemistry*, 71.

Yoshizato, H., & Fujikawa, T. (1996). The growth hromone (GH) gene is expressed in the lateral hyphotalamus: enhacement by GH-releasing hormone and repression by restraint stress. *Endocrinology*, 2545 - 2551.

SÍNTESIS DE CHALCONAS POR METODOLOGÍA VERDE

Jorge Antonio Saldaña Rios[1] y Catalina M. Pérez Berumen[2]

RESUMEN

Las chalconas son compuestos orgánicos precursores de los flavonoides, los cuales además son utilizados extensamente como agentes antibacterianos, antiinflamatorios, fungicidas y anticancerígenos, tales usos dependen en gran medida de los sustituyentes localizados en cualquiera de los dos anillos bencénicos que conforman su estructura C_6-C_3-C_6. Su síntesis se efectúa a partir de un aldehído y una cetona a través de la reacción Claisen-Schmidt por diversas metodologías; sin embargo, son cada vez más utilizadas técnicas amigables con el medio ambiente siguiendo los principios de la Química Verde, el presente trabajo aborda la técnica de mecanosíntesis y los resultados obtenidos.

ABSTRACT

Chalcones are organic compounds precursors of flavonoids, which also are widely used as anticancer, antibacterial, antiinflammatories and fungicides agents, such uses depend heavily on the substituents located at any of the two benzene rings up its structure C_6 - C_3- C_6. Its synthesis is performed from an aldehyde and a ketone through the Claisen - Schmidt reaction by various methods; however, they are increasingly used techniques friendly to the environment by following the principles of green chemistry, this paper addresses the solid state reaction and the results obtained.

Palabras Clave: Chalconas, química verde, mecanosíntesis.

INTRODUCCIÓN

En la antigüedad los fármacos se obtenían de extractos de origen vegetal. La actividad de estos extractos motivó a los químicos a investigar el principio activo del mismo y cuando lograron identificarlo buscaron llevar a cabo la síntesis de dicho principio activo e incluso la síntesis de compuestos análogos más efectivos y seguros.

Compuestos naturales, como las chalconas (con estructura C_6-C_3-C_6), también conocidas como bencilidenoacetofenonas, son compuestos polifenólicos precursores de los flavonoides y pueden verse como flavonoides de cadena abierta, dichos compuestos cuentan con diversas propiedades biológicas, entre las que destacan actividad antibacterial, antiinflamatoria, antimalárica, antifúngica, antiviral, antioxidante, mutagénica y citotóxica las cuales están determinadas dependiendo de la sustitución en los anillos aromáticos en la estructura de la chalcona.

La estructura química de una chalcona consiste en dos anillos bencénicos unidos por un sistema carbonilo α,β-insaturado. Estos anillos son nombrados por comodidad como anillo A, para el anillo cerca del grupo carbonilo, y anillo B, para el anillo del lado del doble enlace carbono-carbono (Fig. 1).

[1]Universidad de Guanajuato, División de Ciencias Naturales y Exactas; Noria Alta S/N, Colonia Noria Alta, C.P: 36050, Guanajuato, Guanajuato, ja.saldanarios@ugto.mx
[2]Universidad Autónoma de Coahuila, Departamento de Química Orgánica. Facultad de Ciencias Químicas, Blvd. Venustiano Carranza y José Cárdenas, C.P: 25280, Saltillo, Coahuila, catalinaperez@uadec.edu.mx

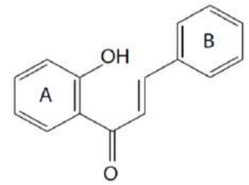


Figura 1. Estructura general de una chalcona.

La principal forma de obtención de chalconas reportada en la literatura, es la síntesis de estos compuestos a través de la condensación de un aldehído con una cetona, conocida como reacción de Claisen-Schmidt. Aunque éste método es el más común, se han encontrado reportadas en la literatura varias modificaciones al mismo, tratando de hacer más eficiente el método y buscar mejoras tanto en el incremento de los rendimientos del producto, así como en la búsqueda de tiempos de reacción más cortos, incorporando tecnologías más limpias aplicando también métodos de sustitución.

Adicionalmente se han implementado métodos como la isomerización y ciclación oxidante. En el primero, no es necesario el uso de disolventes empleando la mecanosíntesis, así mismo la implementación de fuentes de energía alternativas que aceleren la reacción, como el reactor de microondas o ultrasonido, las cuales son en la actualidad de gran uso y eficiencia en la síntesis química de diferentes compuestos.

En el presente trabajo se busca efectuar la síntesis de chalconas utilizando la metodología Claisen-Schmidt partiendo de 2-hidroxiacetofenona y benzaldehído, llevada a cabo a través de la técnica de mecanosíntesis, teniendo como objetivo además la purificación y posterior caracterización de las chalconas obtenidas.

MARCO TEÓRICO

Esta sección es opcional. En caso necesario, se puede incluir esta sección para describir los modelos utilizados para la descripción de los fenómenos y/o procesos en estudio.

A continuación, se describe paso a paso el mecanismo de reacción de Claisen-Schmidt promovida por una base donde la cetona forma el ion enolato que ataca nucleofilicamente al aldehído:

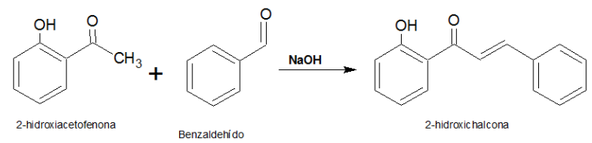
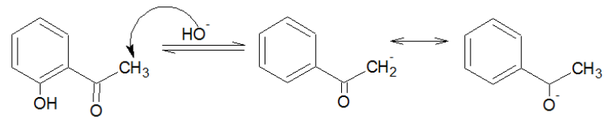


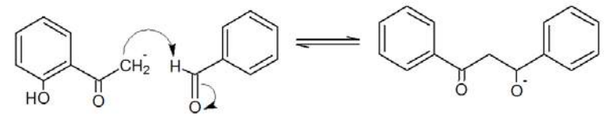
Figura 2. Esquema de la condensación Claisen-Schmidt

El mecanismo de la reacción consta de cuatro etapas cuando el aldehído y la cetona son aromáticos, se produce la deshidratación *in situ* del β-cetol generando una cetona α,β-insaturada.

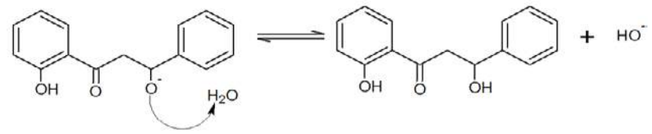
Etapa 1. Formación del enolato.
La base reacciona con un hidrógeno α al carbonilo formando un carbanión estabilizado por resonancia con el enolato.



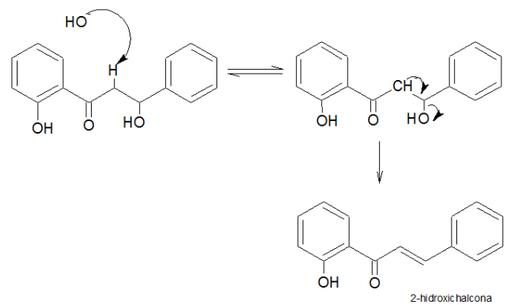
Etapa 2. Condensación.
El carbonilo del benzaldehído sufre un ataque nucleofílico del carbanión.



Etapa 3. Protonación.
El disolvente protona el alcóxido formado.



Etapa 4. Deshidratación del cetol.



MÉTODOS Y MATERIALES

Tabla 1. Material, equipo de laboratorio y reactivos.

Material	Equipo de laboratorio.	Reactivos
Mortero con pistilo Embudo de separación de 250 mL	Balanza analítica Evaporador rotatorio Buchi B-490 rango 20-200°C.	Hidróxido de sodio 2-hidroxiacetofenona Benzaldehído

Anillo de hierro Matraz de destilación de 50 mL Vidrio de reloj Probeta de 10 mL Embudo de vidrio	Aparato para medir punto de fusión Fisher-Johns 12-144 rango 20-300°C Espectrofotómetro infrarrojo de transformada de Fourier	Agua destilada Bicarbonato de sodio Acetato de etilo

Método.

1. Agregar al mortero 1g de 2-hidroxiacetofenona (7,35 mmol), 0,62 g (7,38 mmol) de bicarbonato de sodio y 0.6 g de hidróxido de sodio (14,7 mmol) y moler con el pistilo hasta obtener un sólido homogéneo.
2. Adicionar 0,75 mL de benzaldehído (7,33 mmol) a la mezcla y continuar moliendo hasta obtener un sólido que se divida en partículas pequeñas.
3. Transferir el sólido a un matraz Erlenmeyer de 100 mL y agregar 10 mL de acetato de etilo y 10 mL de agua destilada, enjuagar el mortero con un poco de actetato de etilo.
4. Trasladar a un embudo de separación y dejar reposar por 10 minutos.
5. Separar fase acuosa (fase inferior) en un matraz Erlenmeyer de 100 mL y la fase orgánica (fase superior) en otro matraz.
6. Adicionar 10 mL de agua destilada a la fase orgánica y transferir al embudo de separación dejando reposar 10 minutos. Separar la fase orgánica de la acuosa nuevamente juntando la fase acuosa y orgánica en el mismo matraz.
7. Adicionar una vez más 10 mL de agua destilada a la fase orgánica y separar después de un lapso de 10 minutos de reposo.
8. Añadir sulfato de magnesio a la fase orgánica hasta no observar grumos ni rastro de agua. Dejar reposar un poco.
9. Filtrar por gravedad en un embudo de vidrio y colectar el filtrado en un matraz redondo de 50 mL.
10. Evaporar el disolvente en evaporador rotatorio a 40°C, hasta observar un líquido aceitoso.
11. Recristalizar con 10 mL de etanol caliente, vaciar el líquido a un vidrio de reloj colocado sobre hielo y dejar reposar.
12. Determinar punto de fusión de los cristales obtenidos.

RESULTADOS

Es conveniente indicar con claridad que planteamientos u objetos de estudio quedan resueltos, sugiriendo así el impacto del trabajo. Se solicita no replicar los resultados de las tablas en figuras y viceversa.

Tabla 2. Propiedades de las chalconas sintetizadas.

	Chalcona	Apariencia	Masa (g)	Punto de fusión (°C)	% rendimiento
1	2-hidroxichalcona	Cristales color anaranjado.	0,0956	73-79	5,76
2	2-hidroxichalcona	Cristales en forma de aguja color amarillo.	0,0489	80-82	2,94
3	2-hidroxichalcona	Cristales en forma de aguja color anaranjado.	0,094	76-78	5,66

Se efectuó en tres ocasiones la síntesis variando la técnica con el uso de bicarbonato de sodio que sólo se utilizó en la chalcona 3 tratando de evitar el uso de ácido clorhídrico para neutralizar el exceso de hidróxido de sodio, observando que el cambio en cuanto a rendimiento no fue muy grande, pero el cambio se hizo para ir acorde con los principios de la química verde.
Las características físicas de la 2-hidroxichalcona obtenida se muestran en la figura 3. Su punto de fusión fue cercano al reportado en una base de datos en línea de 88°C.

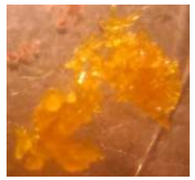


Figura 3. Cristales de la 2-hidroxichalcona.

El rendimiento obtenido fue bajo, comparado con el reportado en un artículo (Tiecco, Germani y Cardenilli, 2016) de 22%, sin embargo la síntesis reportada en el artículo fue efectuado bajo condiciones de reflujo a 90°C 16 horas.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos fueron buenos ya que la síntesis efectuada se llevó a cabo sin disolventes ni uso de la electricidad, simplemente con fuerza mecánica de acuerdo con los principios 5 y 6 de la química verde, además se logró demostrar que el producto obtenido era 2-hidroxichalcona mediante su punto de fusión que fue cercano al reportado y en un rango corto, indicando una alta pureza del compuesto químico. Queda abierta la posibilidad de continuar investigando la mejora de esta técnica para obtener un porcentaje de rendimiento mayor y la posibilidad eliminar el uso de disolventes en la purificación del producto obtenido.

BIBLIOGRAFIA

BARAJAS, B. L., LÓPEZ L. L., PÉREZ B. C. M., SÁENZ G. A., HERNÁNDEZ C. E., RAMÍREZ E. M. E., ANDRADE G. M. L., MARTÍNEZ E. M. I. (2012) “Fuentes alternas en la activación en la síntesis de chalconas bioactivas” en Ávalos B. F. y Zapata G. I de J. (editores) *Química hoy, tópicos selectos de investigación*. Saltillo, Coahuila, Universidad Autónoma de Coahuila, 2012, [pp. 13-23]

TIECCO M., GERMANI R., CARDELLINI F. (2016). “Carbon-carbon bond formation in acid deep eutectic solvent: chalcones synthesis via Claisen-Schmidt reaction” en RSC Advances. 6. 43740-43747.

PALLEROS D. (2004) “Solvent-free synthesis of chalcones” en Journal of Chemical Education, No. 9, Vol. LXXXI, Septiembre 2004

BARAJAS, B. L., PÉREZ BERUMEN C. M., SÁENZ G. A., RAMÍREZ E. M. E., SILVA B. S. Y., (2012) “Síntesis y actividad biológica de chalconas” en Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas No. 4, Vol. XLIII, 2012

Base de datos de propiedades físico-químicas de diversos compuestos químicos. http://www.tcichemicals.com/eshop/en/gb/commodity/H0385 (fecha de consulta 04-07-2016)

APLICACIONES EN ACELERADORES DE PARTICULAS

Luis Alberto Salgado Paredes[1] y Alejandro Gutiérrez Rodríguez[2]

RESUMEN

Este reporte está estructurado con el fin de destacar la importancia de los aceleradores de partículas en la investigación científica básica, así como sus múltiples aplicaciones en distintas áreas del conocimiento, como la Física nuclear, Cosmología, Astrofísica, Electrónica, Ingeniería de Materiales, Química, Biología y Medicina.

ABSTRACT

This report is structured in order to highlight the importance of particle accelerators in basic scientific research and its many applications in different areas of knowledge, such as nuclear physics, Cosmology, Astrophysics, Electronics, Materials Engineering, Chemistry, biology and Medicine.

INTRODUCCIÓN

Los humanos siempre nos hemos preguntado de dónde venimos, como empezó todo, porque existimos, pero una cosa es segura, somos una especie con la capacidad intelectual para descubrirlo, ya que si observamos los grandes avances científicos a través de la historia, como lo son los aceleradores de partículas, que son nada menos que microscopios que permiten adentrarse en lo más profundo de la materia donde se colisiona partículas para poder entender el principio de todo, podemos ver cuánto hemos logrado. Este campo de estudio es de los más importantes actualmente, para descubrir día a día alguno de todos los misterios que nos guarda el universo, todavía tenemos mucho tiempo por delante y nuestra curiosidad humana nos llevara a averiguarlo. En un principio se pensaba que el átomo era lo más pequeño de la materia y que no se podía dividir en nada más a través de la teoría de Dalton. Posteriormente Thompson descubrió el electrón, con las investigaciones de Bohr sobre el modelo atómico del hidrógeno .Uno de los descubrimientos científicos más importantes fue el ocurrido en el año de 1896 cuando el físico francés Henri Becquerel, descubrió el fenómeno conocido como radiactividad y que consiste en la propiedad que poseen algunos átomos (tales como radio, polonio y torio) de emitir energía espontáneamente a través de partículas y fotones, y se usaron las primeras letras del alfabeto griego para designarlas como radiación: alfa, beta y gama. La naturaleza pone a nuestro alcance diversos tipos de proyectiles, algunos de energía muy grande. Por ejemplo, las partículas emitidas por ciertos elementos radiactivos pueden tener energías hasta unos pocos MeV, lanzando estos proyectiles sobre los átomos se descubrió la existencia de los núcleos, que tienen dimensiones del orden del fermio o del femtómetro (10^{-15} m). La radiación cósmica contiene partículas con energías que pueden llegar a 10^{20} eV, una energía

[1]Instituto Tecnológico de Querétaro, Departamento de Metalmecánica, Av. Tecnológico s/n esq. Mariano Escobedo Col. Centro, C.P. 76000, Querétaro, Qro. luigi.homero24@gmail.com
[2]Universidad Autónoma de Zacatecas, Unidad Académica de Física, Calzada Solidaridad s/n frente al Monumento a la Marina, Apartado Postal C-580, C.P: 98060, Zacatecas, Zac. alexgu@fisica.uaz.edu.mx

enorme que es un millón de veces la energía alcanzada en los aceleradores actuales. Pero los rayos cósmicos tienen muchos inconvenientes para ser usados como proyectiles: tipos de partículas desconocidas, intensidad débil, gran dispersión en energía. Por esta razón, a principios de los años treinta se construyeron los primeros aceleradores de partículas, para obtener haces intensos y controlables de proyectiles con una energía desconocida La necesidad de disponer de instrumentos para generar proyectiles con los cuales el experimentador pudiera controlar el tipo de partícula , así como su energía y flujo de estos (corriente eléctrica) fue lo que originó el invento de esos instrumentos a los cuales se les llamó aceleradores de partículas, es por eso que a partir del siglo xx a través de la física nuclear y posteriormente la física cuántica donde se han venido descubriendo nuevas partículas y el progreso que se ha realizado desde entonces ha sido considerable.

Para conocer la estructura de las partículas elementales es necesario disponer de energías superiores al GeV. El estudio del núcleo atómico dio origen a una nueva rama de la ciencia llamada la física nuclear y el estudio experimental de estos sistemas se hizo inicialmente estudiando las colisiones de los núcleos con proyectiles producidos por fuentes radiactivas. La sonda o proyectil es una partícula dotada de la energía necesaria para que su longitud de onda sea comparable al tamaño de los detalles que se quieran estudiar. Cuanto más grande sea la energía de la sonda, menor será su longitud de onda, tal y como se puede deducir de la relación de De Broglie.

$$\lambda = \frac{h}{p} = \frac{h}{m \cdot v}$$

MÉTODOS Y MATERIALES

Durante la elaboración de este estudio se uso la bibliografía disponible en el centro de computo y biblioteca de la unidad de física, se utilizaron folletos que el doctor tiene directamente de visitas a diferentes laboratorios como es el CERN, así como diferentes artículos científicos, presentaciones, videos, etc. Debido a la dificultad de llevar acabo alguna experimentación, aunque se trata de ciencia básica, son equipos difíciles de tener acceso, por lo tanto este proyecto se basa en una recopilación científica, para poder hacer más fácil la búsqueda de alguien que le interese adentrarse en este tema. Se tuvo al alcance el centro de cómputo de la unidad académica de física, así como el programas LATEX para la edición de textos científicos.

DESARROLLO

Desde hace ya varios años, los físicos han sabido que hay dos fuerzas fundamentales de la naturaleza, la fuerza electromagnética y la fuerza débil, y esta se pueden unificar en una única fuerza, la fuerza electro-débil, siempre y cuando las partículas que transportan estas fuerzas no tengan masa. El fotón, que es una pieza clave en este tema, el cual transporta la fuerza electromagnética, no tiene masa, pero las partículas que llevan la fuerza débil tienen una masa considerable, lo que explica el por qué la fuerza débil es más débil que la fuerza electromagnética. Esta unificación puede todavía funcionar si un nuevo bosón de spin-cero, el bosón llamado bosón de Higgs, se introduce, permitiendo que las partículas que llevan la fuerza débil sean masivas. Además, las interacciones con el bosón de Higgs son responsables de las masas de todas las partículas. Estas ideas forman la base del modelo estándar de física de

partículas, el cual es consistente con casi todas las observaciones. La gravedad puede actuar una vez que las partículas tienen masa debido al bosón de Higgs. El bosón de Higgs no es la fuente de la fuerza gravitatoria. La pieza que falta en esta excelente imagen completa es el bosón de Higgs. ¿Entonces cuáles son las perspectivas de su descubrimiento? Tal vez nada importante o tal vez entenderlo todo.

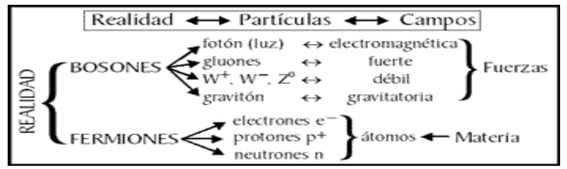


Figura 1. Clasificación general de Bosones y Fermiones.

El primer ciclotrón fue desarrollado por Ernest Orlando Lawrence en 1929 en la Universidad de California. En ellos las partículas se inyectan en el centro de dos pares de imanes en forma de "D". Cada par forma un dipolo magnético y además se les carga de forma que exista una diferencia de potencial alterna entre cada par de imanes. Esta combinación provoca la aceleración, Estos aceleradores tienen un límite de velocidad bajo en comparación con los sincrotrones debido a los efectos explicados anteriormente. Aun así las velocidades que se alcanzan son muy altas, llamadas relativistas por ser cercanas a la velocidad de la luz. Por este motivo se suelen utilizar unidades de energía (electronvoltios y sus submúltiplos habitualmente) en lugar de unidades de velocidad. Por ejemplo, para protones, el límite se encuentra en unos 10MeV. Por este motivo los ciclotrones solo se pueden usar en aplicaciones de bajas energías. Existen algunas mejoras técnicas como el sincrociclotrón o el ciclotrón síncrono, pero el problema no desaparece.

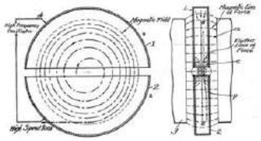


Figura 2. Esquema de Primer Ciclotrón.

Actualmente uno de los centros más importantes del tema es el CERN, el cual está instalado el LEP (Large Electronic Positron). Comenzó a funcionar en el 1989 haciendo colisionar electrones y positrones a 45 GeV por haz. La energía ha ido aumentando hasta los actuales 103 GeV por haz. A finales del 2000 se desmanteló para ubicar en su túnel el nuevo LHC (Large Hadron Collider) donde se producirán colisiones protón-protón a 7 TeV por haz. Desafortunadamente, aumento de energía significa también aumento de tamaño y por tanto aumento de costos.

Figura 3. Vista Interna del LEP.

Los primeros ciclotrones eran pequeños, y su inventor construyó incluso uno de demostración que le cabía en una mano. Se puede observar en una vista aérea de los alrededores del CERN, con el dibujo de una circunferencia de unos 27 km, que corresponde al LEP. El nivel tecnológico necesario para desarrollar estos aceleradores es cada vez más alto. En el caso del LHC todos los imanes serán superconductores que llegarán a campos magnéticos de 9 teslas. Eso hará que el tipo de funcionamiento sea totalmente diferente del LEP, donde sólo una pequeña parte de los imanes son superconductores.

Antes de entrar en un acelerador como el LEP, las partículas salen de una fuente de iones, electrones, positrones o protones, y pasan por los sistemas de inyección que las aceleran antes de entrar en la cámara de vacío. Esta es como una cañería por la cual circulan las partículas. Se tiene que hacer el vacío para evitar que las partículas aceleradas colisionen con las partículas del aire. El vacío es de 10^{-9} torr, comparable al vacío lunar. La cámara está rodeada de un campo magnético guía que hace que las partículas giren en una órbita cerrada, y por un campo focalizador para que se mantengan alrededor de la órbita ideal, para lo que deben hacer oscilaciones laterales, radiales y verticales.

Figura 4. Esquema de un detector dentro del LEP.

Física nuclear

Los aceleradores son la herramienta esencial por el cual los físicos han sido capaces de sondear el núcleo y determinar su estructura y comportamiento. Dependiendo de las propiedades de interés, uno es el uso de electrones, protones y más recientemente haces de iones pesados. El aumento de la energía disponible y la intensidad también está abriendo nuevas oportunidades. En el pasado, la física nuclear, la investigación se ha dedicado al estudio de la estructura de núcleos individuales, sus estados excitados y la espectroscopia asociado a áreas actuales de interés son, por ejemplo núcleos con altísima momentos angulares o núcleos exóticos lejanos-súper deformado desde la línea de estabilidad producida por instalaciones como Isolda en el CERN o GANIL en Francia.

Cosmología y Astrofísica

Los aceleradores se están convirtiendo cada vez más complementarios a los telescopios. El universo se originó en un Big Bang caliente. Temperatura disminuyó con el tiempo y la creciente la energía de los aceleradores y colisionadores permite el físico experimental para estudiar los procesos más cerca del origen del universo. A temperaturas equivalentes a una energía de 100 GeV, que es donde las máquinas actuales permiten observaciones, se trata de 10 "10 segundo desde este origen y es posible estudiar el momento cuando las partículas W y Z adquieren su masa y desaparecieron de la escena.

Ingeniería de Materiales

Las principales herramientas utilizadas por los físicos para probar la estructura y propiedades de la materia en el de estado sólido tiene desde hace mucho tiempo ha sido rayos X producidos por fuentes convencionales y neutrones generada por los reactores nucleares. Esta imagen ha cambiado drásticamente en los últimos años con el advenimiento de la nueva fuentes de radiación derivada del acelerador, la radiación de sincrotrón de electrones producidos por ahora dedicada máquinas y neutrones procedentes de fuentes de separación de neutrones Química y Biología.

La radiación de sincrotrón permite único información sobre el estado químico que se obtiene (por ejemplo, la oxidación de las moléculas, el producto químico enlace en sólidos, gases y absorbidos capas, la estructura de las moléculas complejas y dieir dinámica, cinética de las reacciones químicas). Aceleradores de electrones con energías de hasta unos pocos MeV se utilizan en la química de la radiación estudios, por ejemplo, las reacciones químicas de radiación mejorada de mueren de gran actividad intermedia estados químicos producidos por el haz de electrones.

Medicina

Los aceleradores se utilizan de dos formas generales en la medicina: para el diagnóstico y para la terapia. Los diagnósticos médicos Radioisótopos han demostrado que pueden dar bioquímica y fisiológica, para obtener información cuando se inyecta en los organismos vivos. La posibilidad de detección externo ofrece una de forma no invasiva para seguir los cambios en la distribución de los átomos marcados, observar anomalías de metabolismo (cambios en el flujo sanguíneo, la utilización de oxígeno, metabolismo de la glucosa) o detectar tumores.

Figura 5. Tomografía de una mano.

Esta es una lista de Colisionadores de Hadrones específicamente, comparando características más relevantes.

Acelerador	Locación	Años de Operación	Tamaño	Partículas	Energía
Intersección de Anillos	CERN	1971-1984	948 m	Protón/Protón	31.5 Gev
Spps	CERN	1981-1984	6.9 Km	Protón/Antiprotón	270-315 GeV
Tevatron 1	Fermilab	1992-1995	6.3 Km	Proton/Antiproton	900 Gev
Tevatron 2	Fermilab	2001-2011	6.3 Km	Proton/Antiproton	980 Gev

RHCI Polarizado	Nueva York	2001-presente	3.8 Km	Proton Polarizado/Proton	100-255 GeV
RHCI Iónico	Nueva York	2000-presente	3.8 Km	Iones de Elementos	3.85-100 GeV
LHC Protones	CERN	2008-presente	27 km	Proton/Proton	6.5 TeV
LHC Iones	CERN	2008.presente	27 km	Iones de Elementos	2.76 TeV

CONCLUSIONES

Los aceleradores de partículas constituyen herramientas muy importantes construidas por el hombre para el estudio de la materia a escala microscópica. Los aceleradores de partículas han venido evolucionando desde aceleradores lineales hasta los aceleradores circulares, desde la utilización de campos eléctricos hasta el uso de imanes para inducir además campos magnéticos mejorando la eficiencia de dichas máquinas.

Las nuevas partículas observadas por los actuales y futuros aceleradores de partículas nos darán una mejor comprensión de nuestro universo. Solo con el tiempo y a través de mucha experimentación desecharemos y comprobaremos diversas teorías que se plantean y se seguirán planteando, esperando algún día nos encontrarnos satisfechos para comprender de dónde venimos.

BIBLIOGRAFIA

1- A.FERRER , ER MARTINEZ. (2004). *Física de Partículas y Astro partículas,* Valencia: Servei de Publicacions.
2- M.CUBELLS (2014), Aplicaciones en la Medicina en Física de Partículas, Valencia, ICHEP.
3- Several papers on a variety of applications (synchrotron radiation for microlithography, radiotherapy, nuclear waste incineration, heavy ion fusion) were presented at the June 1990 EPAC, held in Nice.
4- Aplicaciones en la industria son patrocinadas por conferencias y Aplicaciones de Aceleradores en la Industria cada Año, Texas, editado por I.L. Morgan (Noviembre 2008).
5- E.A. Abramyan,(2008) Industrial Electron Accelerators and Applications 7.- Juarez, HN.2011. Elaboración de estufas solares; Guatemala. CEIBA.

ADMINISTRACIÓN DE NAPROXENO CON NANOMATERIALES CON MESOPOROSIDAD ORDENADA

Sara Sabina Sánchez Berlanga[1] y Vicente Rodríguez Gonzalez[2]

RESUMEN

La baja eficiencia de los sistemas de administración de fármacos llevan a los pacientes a ingerir dosis más altas de medicamentos para alcanzar el efecto terapéutico deseado, provocando una variedad de efectos secundarios nocivos para la salud. Para resolver este problema, en la actualidad se ha aumentado el uso de cargadores biocompatibles que poseen la capacidad de entregar agentes terapéuticos. Las nanopartículas de dióxido de silicio han sido contempladas como una opción gracias a su versatilidad química, estabilidad térmica y alta biocompatibilidad. En este trabajo se presenta la funcionalización de nanopartículas de dióxido de silicio y su evaluación como posibles vehículos de liberación controlada de fármacos.

ABSTRACT

The low efficiency of drug delivery systems take patients to ingest higher drug doses to achieve the desired therapeutic effects. Causing thus way a variety of harmful side effects for their health. To address this problem, the research and use of biocompatible drug carriers with ability to deliver therapeutic agents has increased. Silicon dioxide nanoparticles have been referred to as an option as drug carriers due to their chemical versatility, thermal stability and high biocompatibility. This work exposes the process of silica nanoparticles functionalitazion and their evaluation as potential drug vehicles for controlled release.

Palabras Clave: nanopartículas, liberación controlada, materiales porosos, dióxido de silicio

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, los fármacos son componentes importantes en nuestra vida en términos de salud y tratamiento de distintas enfermedades. En los últimos años, su consumo así como la cantidad de efectos secundarios provocados por su falta de especificidad y baja eficiencia ha aumentado considerablemente. Las razones de los efectos secundarios en el consumo de un fármaco pueden ser variadas e incluso deberse a las propiedades de la misma molécula.

Para poder solucionar este problema es necesario encontrar nuevos sistemas de liberación de fármacos que posean una mayor biocompatibilidad y una alta eficiencia. Los nanomateriales se presentan como una posible solución gracias a sus distintas propiedades: cuentan con un tamaño que es óptima en cuanto a excipientes de liberación, debido a su reducido tamaño hay poca probabilidad de causar respuestas inmunes. Además, los materiales nanométricos favorecen la captación celular y el transporte a través del torrente sanguíneo y desde el punto de vista estructural poseen una gran área superficial lo que permite que la adsorción del fármaco sea mayor.

A través de los años, el estudio de las nanopartículas de dióxido de silicio ($NPSiO_2$) ha aumentado notablemente. Estas partículas son consideradas posibles liberadores de fármacos ya que cuentan con las características antes mencionadas al tiempo que poseen otras ventajas como una gran estabilidad química, la posibilidad de funcionalizar su superficie y una mayor biocompatibilidad en comparación con óxidos de

[1] Universidad Autonoma de Coahuila, Facultad de Ciencias Químicas, Ing J.Cardenas Valdez, República, C.P: 25280, Saltillo, Coah, sabina.sanchez@uadec.edu.mx
[2] Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, División de Materiales Avanzados, Camino a La Presa de San José 2055, Lomas 4 sección, C.P: 78216 San Luis, S.L.P., vicente.rdz@ipicyt.edu.

otros metales. La estabilidad de sus enlaces Si-O le otorga resistencia a los estímulos externos como el estrés mecánico o la degradación. Además posee una gran capacidad de carga debido a su estructura mesoporosa, y el tamaño de sus poros y porosidad pueden ser manipulados fácilmente de acuerdo al tamaño y tipo de fármaco. [1]

MARCO TEORICO

Materiales porosos
Dentro de los distintos tipos de materiales, los nanomateriales porosos se han convertido en uno de los campos más estudiados. Siendo los materiales mesoporosos de los más importantes. Generalmente, los nanomateriales porosos pueden ser clasificados en tres categorías de acuerdo a su tamaño de poro: microporosos, mesoporosos y macroporosos. Además de ofrecer tamaños de poro más grandes que los microporosos, entre 2 y 50 nm, los materiales mesoporosos son capaces de ofrecer un área superficial más grande, un sistema de poros ordenado y una distribución de poro bien definida. Estas características permiten una liberación o movimiento más rápido de las moléculas que son cargadas por el material, lo que convierte a los materiales mesoporosos en buenos liberadores de distintos compuestos químicos o moléculas con actividad biológica. [2]

Nanomateriales
La importancia de la nanotecnología dentro de la medicina ha aumentado notablemente en los últimos años. Uno de los campos de la nanotecnología con mayor estudio son los nano sistemas para aplicaciones de diagnóstico y tratamiento de diferentes enfermedades. Recientemente ha surgido una gran cantidad de nanomateriales con distintas aplicaciones entre las que se encuentran las aplicaciones biomédicas como vehículos de fármacos o tratamientos contra el cáncer. Las nanopartículas son materiales a escala nanométrica que pueden transportar distintas cargas como moléculas de fármacos, proteínas, ácidos nucleicos u otro tipo de contenido. Estos nano cargadores están diseñados para mejorar la eficacia y seguridad en la entrega de fármacos. Entre los nano cargadores más conocidos se encuentran los liposomas, dendrimeros, polímeros, nanotubos de carbono, nanopartículas metálicas, nanopartículas orgánicas, nanogeles y nanopartículas peptídicas entre otros. [3]

Sistemas de liberación controlada
La liberación de fármacos es un proceso para administrar compuestos farmacéuticos con el objetivo de lograr un efecto terapéutico en humanos o animales. Durante las últimas décadas, la práctica de entrega de fármacos ha cambiado drásticamente. El desarrollar nuevos métodos de liberación, la función del fármaco puede mejorar significativamente.
Los sistemas actuales poseen diferentes propiedades fisicoquímicas que resultan adecuados para el transporte de fármacos. El objetivo principal de un sistema de liberación es transportar y liberar las moléculas de fármaco a un objetivo de una manera controlada. Por lo que, idealmente, el sistema debería de ser biocompatible, no causar ninguna reacción celular o inmunogenica y liberar el fármaco en el objetivo sin alterar sus efectos terapéuticos. [4]

MÉTODOS Y MATERIALES

Funcionalización de las nanopartículas de SiO_2
1. En un vaso de precipitado con una solución con concentración de 10mg/mL de nanopartículas de SiO_2, agregar ácido acético en una concentración de 0.05% y 3-aminopropiletoxisilano (APTES) en una concentración de 0.3%. Lo anterior, en una relación 1:1:1.
2. Tratar la solución en un baño ultrasónico durante 1 minuto
3. Agitar la solución a 400rpm durante 2 horas
4. Incubar a 90°C por 1 hora
5. Centrifugar por 20 minutos a 13500rpm
6. Realizar 3 lavados con etanol
7. Re suspender las partículas en agua y dejar 16 horas a temperatura ambiente.

Preparación de la solución de fluido corporal simulado PBS
1. En un matraz aforado, disolver 8g de NaCl, 0.2g de KCl, 1.44g de Na_2HPO_4, 0.24g de KH_2PO_4 y aforar con 1L de agua mili-Q.
2. Medir pH de la solución y ajustar con HCl o NaOH a un pH de 7.4 (pH de la sangre)

Adsorción del Naproxeno a las nanopartículas de SiO_2
1. A una concentración de 10mg/mL de Naproxeno, agregar nanopartículas de SiO_2 en una concentración de 2mg/mL.
2. Mantener en agitación por 48 horas
3. Colocar la solución en baño ultrasónico durante 30 minutos y tomar una alícuota de 5mL.
4. Centrifugar a 12000 durante 5 minutos
5. Realizar 3 lavados con una solución 1:1 Et-OH:PBS
6. Resuspender el material en PBS para realizar los análisis de liberación

Liberación del Naproxeno
1. A las $NPsSiO_2$ con naproxeno recuperadas de la filtración re suspenderlas en una solución de 1:1 de etanol y solución búfer de fosfatos (PBS), siendo la concentración de $NpsSiO_2$ 1mg/mL en etanol
2. Pasados 30minutos tomar una alícuota de 2mL, centrifugarla a 12,000rpm por 5min.
3. Repetir cada media hora, por 4hrs.
4. Realizar una curva patrón del naproxeno y determinar la ecuación de la recta
5. Leer las alícuotas a 240nm y determinar la cantidad de naproxeno liberado

Prueba de hemolisis
1. Realizar por triplicado cada una de los ensayos en condiciones de luz y obscuridad a condiciones de 37 °C por 6 horas a una agitación de 65 r.p.m.
2. Una vez preparadas las muestras de sangre, colocar las cantidades de reactivos y nano polvos conforme a la siguiente tabla:

Tubo	NPs SiO_2 (mg)	SSF (mL)	H_2O destilada (mL)	Sangre total (µL)	NPs SiO_2 (mg/mL)
Control (-)	-	10	-	100	-
1	1	10	-	100	0.1
2	2	10	-	100	0.2
3	3	10	-	100	0.3
4	4	10	-	100	0.4
5	5	10	-	100	0.5
Control (+)	-	-	10	100	-

3. Una vez trascurrido el tiempo, centrifugar por 5 minutos a 3500 r.p.m.
4. Observando la formación de hemólisis, leer a 540 nm frente a un blanco (control negativo).

$$\% \, Hemólisis = \frac{Abs \; muestra}{Abs \; control \; positivo} * 100 \quad (2)$$

RESULTADOS

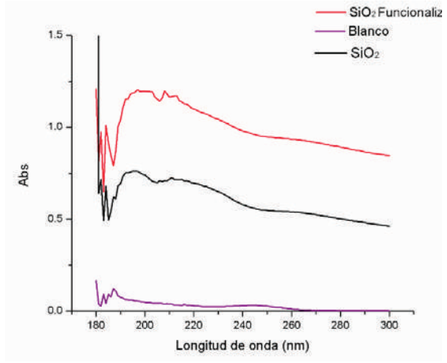


Figura 1. *Espectro UV-vis de las $NPSiO_2$*

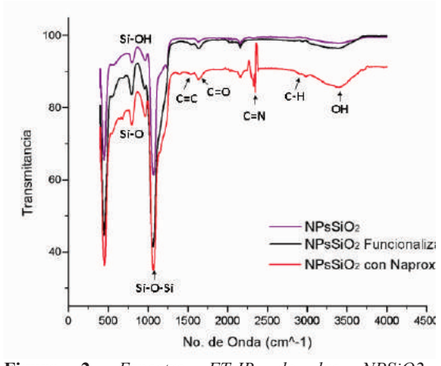


Figura 2. *Espectro FT-IR de las NPSiO2 funcionalizadas, no funcionalizadas y funcionalizadas con naproxeno.*

En la Figura 1, se presentan los espectros del análisis UV-vis de las $NPSiO_2$ y las $NPSiO_2$ funcionalizadas. Se puede observar un incremento en la absorbancia, lo cual es indicador de un cambio en la molécula, comprobando la funcionalización de las nanopartículas. En la Figura 2 se observan los espectros FT-IR para cada una de las muestras ($NPSiO_2$, $NPSiO_2$ funcionalizadas y $NPSiO_2$ adsorbidas con Naproxeno). En esta figura se pueden observar los picos correspondientes a los enlace Si-O y Si-OH, los cuales son indicativos de los grupos silano y silanol. Adicionalmente se encuentran las bandas correspondientes a los enlaces C=C, OR, C=O y C-H, características de los grupos funcionales del Naproxeno. Se observa un pico correspondiente al enlace C=N que puede ser atribuido al NH_3OH residual que fue utilizado en la síntesis de las nanopartículas.

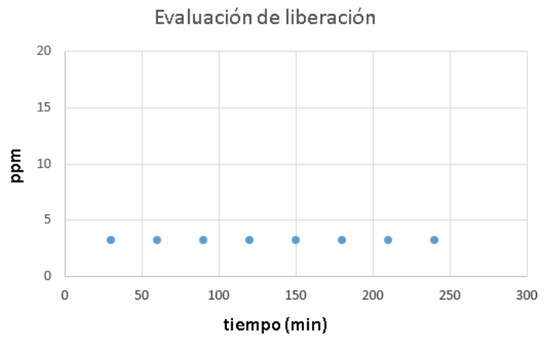


Figura 3. *Resultados de la evaluación de la liberación de Naproxeno en un medio de PBS*

En la Figura 3 se puede observar la gráfica del patrón de liberación del fármaco. La grafica no muestra ningún cambio significativo en la concentración inicial de fármaco en el medio. Según la literatura [1] existen diferentes parámetros que influyen en los mecanismos de descarga de las $NPSiO_2$. Por lo que el comportamiento de liberación puede atribuirse a la falta de un estímulo externo que fomente una mayor liberación. Esta grafica puede demostrar que a pesar de que las $NPSiO_2$ presentan buenas características para la adsorción de fármacos, el proceso de liberación sin estímulos externos no es tan efectivo.

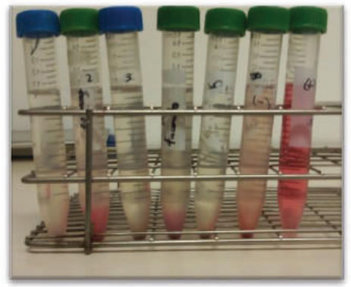


Imagen 1. Prueba de hemólisis. En orden de izquierda a derecha se encuentran las concentraciones de 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5mg/mL de $NPSiO_2$ y después los controles negativo y positivo

Tabla 1. Porcentaje de hemolisis.

Muestra	$NPSiO_2$ (mg/mL)	abs	% Hemolisis
1	0.1	-0.05	-38.40
2	0.2	-0.08	-62.22
3	0.3	-0.08	-59.40
4	0.4	-0.11	-86.08
5	0.5	-0.09	-72.47

En la Imagen 1, se pueden observar los resultados de la prueba de hemólisis. En ninguna muestra se observó la presencia de hemolisis. Adicionalmente se obtuvieron valores teóricos negativos del porciento de hemólisis por lo que se puede demostrar que las $NpsSiO_2$ no presentan ninguna toxicidad en las concentraciones manejadas.

CONCLUSIONES

- Fue posible comprobar la funcionalización del material por medio de FT-IR.
- Las nanopartículas de dióxido de silicio presenta los grupos siloxano y silanol necesarios para actuar como centros de adsorción del fármaco
- La adsorción del Naproxeno por fisisorción fue posible y comprobada mediante FT-IR.
- La liberación del Naproxeno no se realizó de la manera esperada, probablemente debido a la falta de estímulos y parámetros externos que la favorecieran.
- Se descartó la toxicidad de las nanopartículas de dióxido de silicio.
- La adsorción y liberación dependen del tipo de fármaco utilizado en el proceso, así como las condiciones bajo las que se realice la evaluación.
- El comportamiento y las características de las nanopartículas de dióxido de silicio es comparable con lo reportado en la literatura.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera comenzar por agradecer al Dr. Vicente Rodríguez González, director de esta investigación, por la orientación, el seguimiento y la supervisión durante la realización de este proyecto. A los técnicos del Laboratorio Nacional de Investigaciones en Nanociencias y Nanotecnología (LINAN) del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica por su apoyo y colaboración y al proyecto SEP-CONACyT CB-2011/169597. Finalmente, quisiera agradecer al Verano de la Ciencia Región Centro por hacer posible esta estancia.

BIBLIOGRAFIA

[1] Kwon, S., Singh, R., Perez, R., Abou Neel, E., Kim, H.W., Chrzanwski, W. (2013) “Silica-based mesoporous nanoparticles for controlled drug delivery” Journal of Tissue Engineering 4. [pp 1-18]
[2] Wang, G. (2012) “Silica Nanoporous Materials Adsorption and Release Study” Chemistry-

Dissertations. Paper 190.
[3] Lehner, R., Wang, X., Marsch, S., Hunziker, P. (2013) “Intelligent nanomaterials for medicine: Carrier platforms and targeting strategies in the context of clinical application.” Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine 9 [pp 742-757]
[4] Tiwari, G., Tiwari, R., Sriwastawa, B., Bhati, L., Pandey, S., Pandey, P., Bannerjee, S. (2012) “Drug delivery systems: An updated review” Int J Pharmaceutical Investigation. [pp 2-11]
[5] https://www.nibib.nih.gov/science-education/science-topics/drug-delivery-systems-getting-drugs-their-targets-controlled-manner (Online, fecha de consulta 07-07-2016)

DISEÑO, SIMULACIÓN Y SÍNTESIS DE NANOTUBOS DE CARBONO

Francisco Javier Sánchez Blanco[1] y Florentino López Urías[2]

RESUMEN

En este experimento se simularon dos tipos de nanotubos de carbono, cada uno con quiralidad distinta y por lo tanto con propiedades distintas, al mismo tiempo se sintetizaron nanotubos de carbono por medio del método de deposición química de vapor (mejor conocido por sus siglas en CVD), utilizando precursores con nitrógeno como la benzilamina con una liberación de presión la cual nos generó resultados interesantes. El producto de la síntesis se extrajo con facilidad, a comparación de otras síntesis realizadas en el mismo tiempo pero a diferentes presiones. Como resultado, obtuvimos exactamente nanotubos de carbono CNT por sus siglas en inglés) un tanto deformados.

ABSTRACT

In this experiment were simulated two kind of carbon nanotubes, each one with different chirality, therefore, with different properties, at the same time carbon nanotubes (CNT) were synthetized by CVD using precursors such as benzylamine with a pressure relief which gave interesting results. The synthesis product was extracted easily compared with other synthesis performed at different pressures. Consequently by the pressure variation we got deformed pipes. Consequently we don’t got well defined pipes, in fact were a little deformed.

Palabras clave: CNT: Carbon nanotube, CVD: chemical vapor deposition, quiralidad: geometría de la base y estructura de la molécula,

INTRODUCCION

Los nanotubos de carbono (CNT) son alótropos de carbono que se asemejan a un cable cuántico unidimensional (1D); tienen una estructura tubular hecha de capas de átomos de carbono (laminas grafénicas) enrolladas entre sí. [1], los nanotubos de carbono pueden tener tres tipos de quiralidades, de las cuales dos son las mas comunes y con comportamientos muy distintos, particularmente los nanotubos con quiralidad “arm-chair” presentan propiedades metálicas, mientras que los de quiralidad en zigzag presentan propiedades semiconductoras o semimetálicas [2]. En esta estancia de investigación, se hicieron cálculos de primeros principios con ayuda del programa SIESTA el cual nos provee variada información sobre el nanotubo, como conductividad, densidad de estados, etc. También con ayuda de otro programa llamado Gdis pudimos obtener la estructura del nanotubo y junto con SIESTA obtuvimos la estructura molecular y diagrama de bandas para el nanotubo de carbono (10-0), con quiralidad en zigzag es decir con propiedades semimetálicas. Una de las características de los nanotubos de carbono dopados con nitrogeno es la biocompatibilidad ya que estos nanotubos dopados con nitrógenos no generan alteraciones en los tejidos de seres vivos como los nanotubos multicapa o monocapa sin dopar con nitrogeno “*We therefore believe that CN_x nanotubes are less harmful than MWNTs or SWNTs and might be more advantageous for bioapplications.”* [3].

[1] [1]Universidad Autonoma de Zacatecas, Unidad Academica de Fisica, Calzada Solidaridad esq. Paseo, La Bufa s/n C.P. 98060 Zacatecas, Zac. México francisco.sanchez@fisica.uaz.edu.mx
[2] IPICYT, División de materiales avanzados Camino a La Presa de San José 2055, Lomas 4 sección, 78216 San Luis, EMS ems@ipicyt.edu.mx; FLU: flo@ipicyt.edu.mx;

METODOLOGIA

Primero para la simulación del nanotubo (10-0) se hizo la estructura en el programa Gdis para obtener la estructura molecular de nuestro nanotubo con enlaces C-C generando una red hexagonal de carbonos, se tomó con un máximo de 40 átomos, una vez terminada la estructura se analizó con 100 puntos K con spin polarizado y con doble núcleo, convergió a una energía mínima de 0.03 eV. En el programa SIESTA, con el cual obtuvimos el diagrama de bandas, la estructura molecular y la densidad de estados.

Para la síntesis por CVD se prepara la solución presurosa, en este caso se quiere estudiar los nanotubos dopados con nitrógeno por lo cual se utilizó bencilamina. En la solución precursora se utilizó bencilamina, etanol, ferroceno con concentraciones de 48.75%, 48.75%, y 2.5% respectivamente, todo en peso, en este caso se utilizaron 250 ml de bencilamina, 250 ml de etanol y 11.3gr de ferroceno. Se mezclan las tres sustancias en una campana para evitar accidentes, una vez juntas se ponen a sonicar por 2 horas para que se disuelvan lo mejor posible.

Una vez lista la solución precursora se monta en el sistema de CVD para comenzar la síntesis, el cual consiste en dos hornos circulares un tubo de cuarzo, una trampa de acetona, un sprayer, y un flujometro que mantenga el flujo del gas argón en la síntesis.

Se introduce la solución precursora en el sprayer, se conecta el sprayer al tubo de cuarzo que pasa por en medio de los dos hornos circulares y sale a la trampa de acetona (la cual debe de estar a 16.5 cm de la altura de la base del sprayer, para evitar cambios de presión), ambas puntas del tubo de cuarzo se sellan con grasa de vacío y se protege la junta con teflón para evitar fugas, también se marcan 10 cm a partir del cuello del tubo y la parte superior en la posición del tubo, esta distancia es a la que debe de estar el primer horno, se hace fluir gas argón por el sistema con un flujo de 2.5 L/min en este experimento se liberó presión mediante una pequeña válvula ubicada antes del sprayer lo cual hizo variar un poco el flujo total dentro del tubo, después se calientan los hornos a 850°c, una vez alcanzada esta temperatura se dejan 10 minutos y después se enciende el sprayer durante 30 min, después de este tiempo se apaga el sprayer, se baja la temperatura de los hornos a 0°c y se deja hasta que los hornos lleguen a los 100°c entonces se apagan, se cierra el flujo de gas argón y se deja enfriar los tubos de cuarzo hasta que lleguen a temperatura ambiente. Se retira el tuvo protegiendo las puntas con parafilm para evitar estrellarlo y/o contaminarlo. De la parte final del tubo se sonican los últimos 15 cm (que son los que tienen más residuos) en una probeta de 250 ml con etanol por 15 min.

Extracción de muestras: a partir de la marca de los 10 cm donde entraba el tubo al horno se marca de centímetro en centímetro hasta el centímetro 80. Posteriormente se comienza a raspar de centímetro en centímetro y se recolectan las muestras cada una en un papel aluminio cerrado y con la notación del tipo de síntesis de cada uno, centímetro y persona que extrajo la muestra. Después de esto se pesan las muestras y se realiza un histograma para observar la distribución de pesos.

Preparación de muestras: se toman los centímetros 25, 29, 33, 37, 43, 50 y 58 para analizarlos, se toman 2/3 partes de la muestra de cada centímetro la tercera parte restante se guarda y se marca como control. Se sonican en 200 ml de etanol por 30 min cada muestra, si la muestra que se sonicó tenía una masa mayor a 5mg se filtra, si la muestra es menor se pone a secar en un vidrio de reloj y se vuelven a guardar las muestras en papel aluminio.

Después de este proceso se preparan las muestras para SEM y TEM. Para analizar las muestras por SEM se preparan los pines poniéndoles cinta de carbono, se toma una pequeña parte de las muestras preparadas sobre 2 * 2 mm aproximadamente, se colocan sobre la cinta de carbono, se guarda en su respectivo lugar y se etiqueta en la parte superior de la caja, por centímetro, tipo de solución precursora y un nombre de la persona a cargo para identificarla. Para TEM se toma otra porción similar y se sonica en 50 ml de etanol, esta debe quedar después de sonicarla en un tono transparente, mas no claro para asegurarnos de depositar una cantidad de materia necesaria para observarla. Una vez sonicada (no debe de tener grumos) con ayuda

de probetas Pasteur, se coloca la rejilla de TEM y se le ponen dos gotas, se deja un momento, se mueve y se le colocan otras dos gotas, se repite el proceso unas cinco veces aproximadamente, se deja secar mínimo 8 horas, se guarda y se etiqueta.

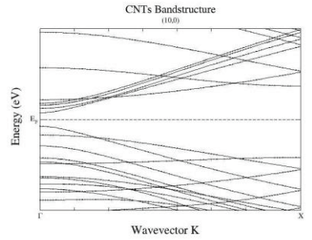
Para analizar los nanotubos por TGA se ponen 5mg en el porta muestra se da un flujo de oxigeno de 20ml/min y la temperatutra llega a 50°C, de ahí sube 5°C/min hasta llegar a los 950°C

RESULTADOSY DISCUSION

Figura 1.- estructura molecular del nanotubo (10-0)

Como se puede observar el nanotubo (10-0) es de quiralidad zigzag lo que le dará propiedades semiconductoras, como se podrá observar en la siguiente figura del diagrama de bandas.

Figura 2.- diagrama de bandas del nanotubo (10-0)



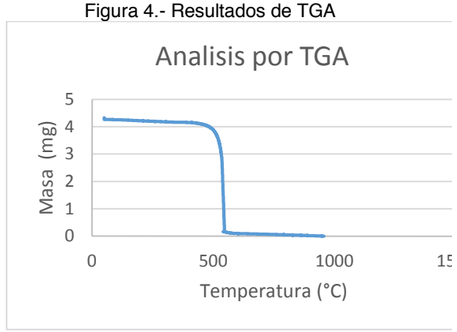
En el diagrama de bandas se puede observar el comportamiento semiconductor del nanotubo, ya que sus bandas estan casi juntas, en este caso el Band Gap es de .06 eV

En la sintesis de nanotubos de carbono:

Figura 3.- pesos dependiendo de la posicion del tubo

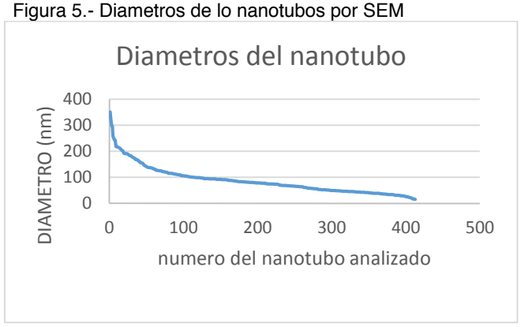
En la gráfica podemos ver como la mayor producción de nanotubos de carbono se da aproximadamente a la mitad del primer horno ya que si tomamos en cuenta que cada horno mide 40cm y tenemos 10 cm fuera del horno la mitad del primero sería en el centímetro 30, siendo más específicos el máximo de los pesos fue en el centímetro 33, mientras que en el segundo horno la masa de los nanotubos producidos es muy pequeña.
En total se produjeron 273.8 mg

Figura 4.- Resultados de TGA



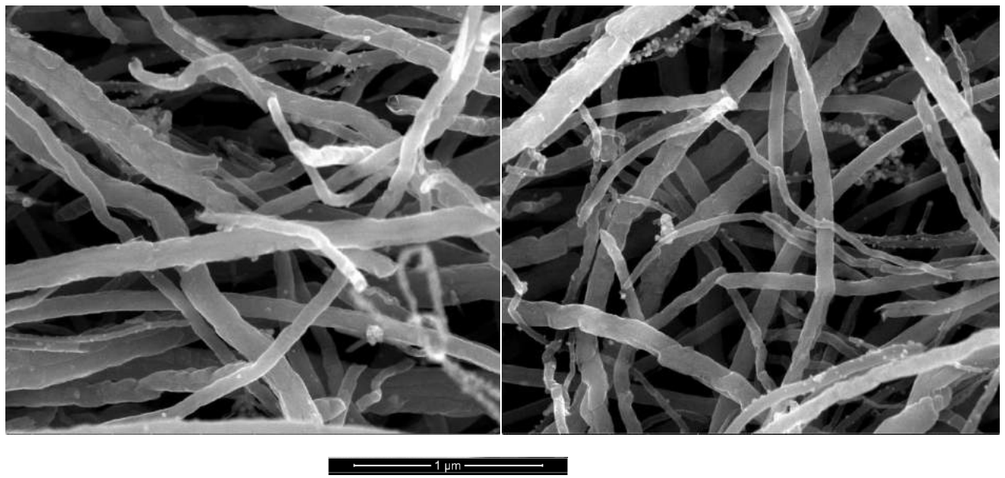
En el analisis por TGA se puede ver como decae la masa de la muestra a una temperatura de 538°C, esto a comparacion de otras muestras con la misma solucion precursora, tiempo de sintesis pero sin liberacion de presion es alrededor de 10°C menos, se podria suponer que la superficie de los nanotubos generados es mas cristalina, aunque por el analisis de SEM nos muestra lo contrario.

Figura 5.- Diametros de lo nanotubos por SEM



Como se puede apreciar en el grafico nanotubos muy grande entre 350 y 200 nanometros son muy pocos en esta muestra, mientras que en la parte de los 100 nanometros es donde se encuentra la mayor cantidad de nanotubos, a su vez en alrededor de los 50 nanometros hay un numero importante de nanotubos.

Figura 5 y 6.- REresultados de SEM (centimetro 33)



Se amplifico la imagen 50000X en el microscopio SEM HELIOS NANOLAB 600. A la par de los resultados del análisis de diámetros la mayoría de los nanotubos generados miden alrededor de 100 y 50 nanómetros, a su vez presentan muchas deformaciones y algunas acumulaciones de pequeñas partículas adheridas a los nanotubos. Algunos tubos (los más grandes en su mayoría) muestran como placas despegándose de la superficie esto pudo ser causado por la liberación de presión en la síntesis que no les permitiera formarse con una superficie más suave y definida.

En la síntesis de los nanotubos la liberación de presión genero varios efectos, por ejemplo la forma de los nanotubos o fibras generadas es irregular al presentar "escamas" en la superficie, otro efecto importante es menor cantidad de producto de la síntesis, a comparación de otras síntesis de la misma solución y procedimiento a excepción de la liberación de presión, se llegaron a producir en los otros casos hasta un gramo, en cambio en el experimento actual solo se produjeron 273 mg, un poco más de la cuarta parte en comparación a los otros dos experimentos otra diferencia es que al entrar en el segundo horno el producto casi fue nulo. Sin embargo el resultado de TGA nos dice que la temperatura de descomposición de los nanotubos es muy baja ya que normalmente los nanotubos con etanol-benzilamina y con ferroceno como catalizador se descomponen a 800°C, incluso a los 950°C como lo muestran los artículos [4] y[5], esa temperatura tan baja se puede deber a que la superficie de los nanotubos es muy irregular lo que facilita que el oxígeno se adhiera a esta y se degraden mas rápido.

Otro aspecto importante en este experimento es que la liberación de presión en CVD nos generó comportamiento magnético en los nanotubos de los primeros centímetros del tubo de cuarzo, lo que no sucedió en la trampa de acetona, tampoco se precipito el residuo capturado por la trampa, esto posiblemente suceda porque algunas partículas de hierro del catalizador no fueron arrastradas hasta la trampa si no que se distribuyeron en el tubo de cuarzo.

CONCLUSIONES

La simulacion de nanotubos de carbono pristinos, con ayuda de calculos de primeros principios nos acercan al resultado final de un experimento , aunque a una escala pequeña debido a la cantidad de atomos tratada. Por medio del programa SIESTA pudimos corroborar el comportamiento de los nanotubos de carbono dependiendo de la quiralidad, comprobamos con el diagrama de bandas las propiedades semiconductoras del nanotubo (10-0) con quiralidad "zigzag" al tener un espacio muy pequeño entre la banda de valencia y la banda de conducción.

Al liberar la presion mediante sintesis de CNT por medio de CVD disminuimos la cantidad de material producido, y hacemos que las particulas residuales del catalizador se queden en el tubo de cuarzo, generando comportamiento magnético en algunas regiones del tubo, por consecuencia captura menos reciduo la trampa.

BIBLIOGRAFIA

[1] D. Qian, E. C. Dickey, R. Andrews, T. Rantell , «Load Transfer and Deformation Mechanisms in Carbon Nanotube-Polystyrene Composites,» Applied Physics Letters, vol. 76, pp. 2868-2870, 2000

[2] Eduardo Garcia E. Florentino López U. Humberto T. Mauricio T., «Novel Carbon Adsorbents» ELSEVIER 1st ed., pp 4.

[3] J. C. Carrero-Sánchez ,† A. L. Elías ,‡ R. Mancilla ,† G. Arrellín ,† H. Terrones ,‡ J. P. Laclette ,*† and M. Terrones « Biocompatibility and Toxicological Studies of Carbon Nanotubes Doped with Nitrogen »*Nano Lett.*, 2006, *6* (8), pp 1609–1616. Consultada en http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/nl060548p (fecha de consulta (13/julio/2016))

[4] Ghadimi, N. (2011). "*CVD synthesis of nitrogen doped carbon nanotubes using iron pentacarbonyl as catalyst*." mestria. University of the Witwatersrand.

[5] Edward N. Nxumalo and Neil J. Coville (2010) "Nitrogen Doped Carbon Nanotubes from Organometallic Compounds: A Review" en materials No: 3, pp: 2141-2171, consultada en www.mdpi.com/journal/materials (Fecha de consulta (12/julio/2016))

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi gratitud al Dr. Florentino López Urías 246023-CONACYT por aceptarme en su proyecto de investigación e instruirme en diseño y simulación, al Dr. Emilio Muñoz Sandoval CB-2013-220744-CONACYT en la parte experimental y teórica de la síntesis de nanotubos de carbono, a la Dra. Dulce Carolina Camacho Mojica por la enseñanza en el manejo del software en simulación. También quiero agradecer a las siguientes instituciones por hacer posible este proyecto que es muy importante para mí como persona y como estudiante en mi desarrollo profesional: IPICYT; División de Materiales Avanzados, LINAN, Verano de la Ciencia de la Academia Mexicana de Ciencias y CONACYT

MEDICIÓN DE POTENCIAL ZETA MEDIANTE MICRO-ELECTROFORESIS

Javier Alejandro Sánchez Gallegos[1] y Bernardo José Luis Arauz Lara[2]

RESUMEN

En el presente trabajo se explicará detalladamente el proceso para analizar experimentalmente el fenómeno llamado electroforesis, que forma parte de los fenómenos electrocinéticos y que tiene gran relevancia en el estudio de coloides, en particular para determinar el potencial zeta, el cual permite caracterizar y así poder cambiar las propiedades de dichos coloides en gran diversidad de procesos. La electroforesis es ampliamente usada en procesos como lo es la separación de moléculas. En el actual trabajo no solo se enfatizó en el análisis del fenómeno, si no en los retos de usar materiales de bajo costo para la elaboración de una celda electroforética, con un diseño adecuado para calcular el potencial zeta usando videomicroscopía.

ABSTRACT

In the present work will be explained in detail the process to analice expermimentally a phenomena called electrophoresis which is one of the electrokinetic phenomenas which are of importance on the study of colloids, in particular to determine the zeta potential, which allows to characterize and change the properties of colloids in many kind of processes. Electrophoresis is widely used in process like the molecular separation. The present work not only was oriented on the study of the phenomena if not in the challenge of use low-coast material to the production of the electrophoretic cell and its design for calculate the zeta potential.

Palabras clave: Suspensión coloidal, fenómenos electrocinéticos, modelo de doble capa, potencial zeta.

INTRODUCCIÓN

Los primeros trabajos basados en el fenómeno de electroforesis datan del siglo XIX basados en las leyes de Faraday de electrolisis. Algunos científicos usaron este fenómeno para estudiar las propiedades y comportamientos de pequeños iones, moviéndose en una solución acuosa bajo la influencia de un campo eléctrico. También fueron creadas ecuaciones para variar la concentración de partículas cargadas moviéndose a través de una solución.

Más tarde Arne Teselius creó un aparato que le daba una nueva aplicación a la electroforesis en el análisis de mezclas químicas. En 1940 nuevos métodos de electroforesis comenzaron a ser estudiados ya que en el aparato de Teselius tenía fallas, para 1950 con las aportaciones de científicos como Oliver Smithies se permitió la separación eficaz de proteínas con un método relativamente barato.

En la actualidad existen diferentes aparatos comerciales que mediante el uso de la electroforesis son capaces de analizar mezclas de proteínas o de ácidos nucleicos, secuencias de ADN, etc.

La pretensión del trabajo actual es, mediante la micro-electroforesis, determinar el potencial zeta de las partículas a estudiar y con dicha información poder conocer las interacciones coloidales en la solución.

[1] Unidad Académica de Física, Universidad Autónoma de Zacatecas; Calzada Solidaridad, Campus Universitario II, C.P: 98060, Zacatecas, Zac., halovierjunior@hotmail.com
[2] Instituto de Física, Universidad Autónoma de San Luis Potosí; Álvaro Obregón 64, C.P: 78290, San Luis Potosí, S.L.P., arauz@ifisica.uaslp.mx

MARCO TEÓRICO

Cuando dos fases están en contacto se presenta, en general, una diferencia de potencial entre ellos. Si una de las fases es un líquido polar, como el agua, sus moléculas (dipolares) tenderán a ser orientadas en la dirección de la interface y eso generará una diferencia de potencial. Si hay iones o electrones en exceso en una o ambas fases, o grupos iónicos presentes, habrá una tendencia para las cargas eléctricas de distribuirse de forma no uniforme en la interface. Solo en casos muy especiales la región entre las fases adyacentes estará marcada por la separación de cargas eléctricas, cerca o en la superficie de la primera fase hay un exceso de carga de algún signo y las cargas balanceadas están distribuidas de alguna manera a través de la unión de la superficie de la región de la segunda fase. El "arreglo" de cargas (positivas) en la superficie de la fase I y las cargas en el líquido (fase II) es referida como la *doble capa eléctrica* en la interface.

Cuando una de estas fases es provocada a moverse tangencialmente a través de la otra fase, son observados diversos fenómenos que están agrupados bajo el título "efectos electrocinéticos". Existen cuatro diferentes efectos dependiendo de la forma en que el movimiento es inducido: Electroforesis, electro-osmosis, potencial de "transmisión" y potencial de sedimentación (Hunter, 1998).

(a) Electroforesis: Si una fase consiste de líquido o gas en el cual la segunda fase está suspendida como partículas de solido o líquido, entonces las partículas pueden ser inducidas a moverse aplicando un campo eléctrico a través del sistema. La medición de la velocidad de las partículas bajo el campo eléctrico conocido nos da información acerca de su carga electrica neta, o el potencial de su superficie con respecto al "bulto" de la fase suspendida.
(b) Electro-osmosis: Cuando el sólido permanece estacionario y el líquido se mueve en respuesta a un campo eléctrico aplicado.
(c) Potencial de transmisión.
(d) Potencial de sedimentación.

En el caso de la electroforesis para una partícula grande con una doble capa delgada moviéndose a través de un líquido estacionario, de modo que la partícula se mueve en dirección opuesta se propuso la siguiente ecuación:

$$u_E = \frac{(4\pi\varepsilon_0)D\zeta}{\eta} = \frac{\varepsilon\zeta}{\eta} \quad (1)$$

Donde u_E es la movilidad de la partícula, ésta es conocida como la ecuación de Smoluchowski para la movilidad electroforética.
Hückel re-examinó el problema de la electroforesis y obtuvo un resultado diferente:

$$u_E = \frac{(4\pi\varepsilon_0)D\zeta}{6\eta} = \frac{2\varepsilon\zeta}{3\eta} \quad (2)$$

Se puede obtener una ecuación similar haciendo balance de fuerzas eléctricas en la partícula y la ecuación de Stokes para la resistencia a la fricción para obtener:

$$u_E = \frac{v_e}{E_z} = \frac{Q}{6\pi a\eta} \quad (3)$$

Donde u_E es la movilidad electroforética de la partícula, Q es la carga de la partícula, E_z el campo eléctrico, a es el radio de la partícula, v_e es la velocidad, η es la viscosidad del líquido, ζ es el potencial zeta, ε es la constante dieléctrica del líquido, D es la permitividad relativa.

MÉTODOS Y MATERIALES

Microscopio óptico Zeiss , cámara para microscopio, grabador de DVD, disco virgen, TV, porta objetos, cubre objetos, sonicador, pipetas de diferentes volúmenes, partículas de poli-estireno de $2\mu m$, resina epo-tek 302, fuente de poder, caimanes, metanol, vaso de precipitado, jeringas, electrodos de acero ferrítico, electrodos de aleación de plata, electrodos de acero austenítico, cortador de vidrio, láminas de acrílico, lamina de polietileno, seguetas, computadora de escritorio, dremel.

1) Diseño de la celda: se desea hacer una celda de tamaño pequeño ya que la micro-electroforesis (técnica de medición de la movilidad electroforética mediante el uso de un microscopio) necesita tener un portaobjetos y un cubreobjetos, se debe tener en consideración que una vez que la suspensión coloidal este dentro de la celda no exista ninguna fuga, lo cual es el reto más grande en el diseño, se desea también que sea reutilizable, fácil de desmontar y lavar. El material del que estén hechos los electrodos no debe liberar óxidos o iones al momento de que se genere la diferencia de potencial, ya que se contaminaría la muestra dando resultados incorrectos.

2) Construcción de la celda: las piezas de la que está constituida la celda son cinco, electrodos (aleación de plata, acero ferrítico, acero austenítico) con dimensiones variables dependiendo del material (10x3x27mm, 10x1x30mm, 10x1x27mm, éstas son las dimensiones respectivas de los electrodos), cubre objetos de 60x24x0.1mm, porta objetos de 75x25x1mm, lámina de acrílico de 3mm de grosor, lamina de polietileno de 1mm de grosor, lamina de polietileno de 1.5mm de grosor.

Se cortan rectángulos de acrílico de longitud de 7x1.5cm, después se limpian con metanol, al cubre objetos se le hace una perforación a una quinta parte de su longitud y se biselan los lados para que la resina se adhiera mejor al momento de pegar. Es necesario fabricar también un portamuestras con el polietileno de 1.5mm de grosor para poder fijar la celda al estantivo del microscopio, las dimensiones del portamuestras son 14x22cm con sus respectivos cortes para poder fijarlo y el rectángulo de en medio para que la luz del microscopio ilumine la muestra.

Se limpian los cubreobjetos y portaobjetos en un soporte especial que va dentro del vaso de precipitado usando agua desionizada, metanol, una plancha calentadora y un agitador magnético, una vez secos se pegan todas las partes de la celda con resina epo-tek (el portaobjetos se pega del lado que esta biselado) como se muestra en la figura 1, tomando siempre en cuenta que la parte de los electrodos que va a estar en contacto con el agua esté libre de resina, la celda se deja secando 24 horas dentro de una cámara de vacío (tiempo de secado de la resina).

Figura 1. Celdas electroforéticas, con electrodos de aleación de plata, acero ferrítico, acero austenítico

La solución que se utiliza en el experimento es de agua con partículas de poliestireno de $2\,\mu m$, la solución se hace de $1950\mu l$ de agua desionizada y $50\ \mu l$ de partículas de poliestireno, dicha solución se pone a sonicar durante diez minutos para hacer que las partículas no formen agregados, se inyecta en la celda y se sella con cinta y acetato.

3) Colocar la celda en el microscopio y se conectan los electrodos a la fuente de poder, el arreglo debe quedar como se muestra en la figura 2, hecho lo anterior se procede a hacer pruebas del funcionamiento de las celdas. Las primeras celdas que se hicieron fueron hechas con los electrodos de aleación de plata, las segundas con acero ferrítico y las terceras con acero austenítico, todas con el mismo procedimiento.

Figura 2. La celda electroforética conectada a la fuente de poder colocada sobre el portamuestras hecho de polietileno

La técnica de videomicroscopía es utilizada para observar nuestro sistema y consiste en conectar el microscopio a una cámara, a una televisión y un DVD para poder documentar y analizar posteriormente los fenómenos que ocurran.

Figura 3. Aparatos necesarios para observar y grabar el sistema

4) Una vez analizado el comportamiento de cada celda (grabar en varias zonas y a varios voltajes) se procede a grabar en alguna región dentro de la celda, la cual será fija para todas las grabaciones, dicha región no es elegida al azar sino que debe ser en una región en la que el movimiento electro-osmótico no influya en las mediciones, esta región está cerca de las paredes inferior y superior.

Cuando se tiene ya el área para medir se inserta un disco en el grabador de DVD para comenzar a grabar, la duración del video y la variación del voltaje dependerán del comportamiento de las partículas con cada par de electrodos.

5) Para analizar los videos es necesario descomponer el video en fotogramas usando un software especializado que se encuentra instalado en las computadoras del laboratorio de fluidos complejos, se obtienen imágenes de 640x480 pixeles, en las imágenes se encuentran las partículas y para obtener el centro de dichas partículas se utilizó un programa en IDL para poder hacer tracking de partículas. Para encontrar las trayectorias y calcular las velocidades de las partículas se utiliza un programa hecho en Fortran.

RESULTADOS

La movilidad electroforética puede ser obtenida de las gráficas, la teoría nos dice que la movilidad es constante. De 1) despejamos el potencial zeta $\zeta = \frac{3\eta}{2\varepsilon} u_E$ donde $\eta = 1.02x10^{-3} Pa \cdot s$ y $\varepsilon = 7.11x10^{11} C^2/Nm^2$ para agua a 20°, la pendiente de las rectas $slope = u_E$ se observa en las siguientes gráficas.

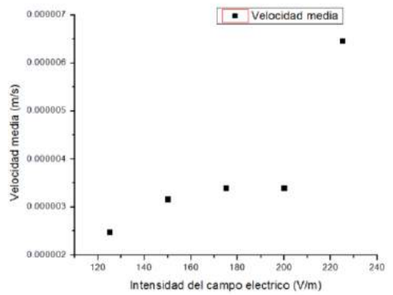


Figura 4. Datos obtenidos para la celda con electrodos de aleación de plata

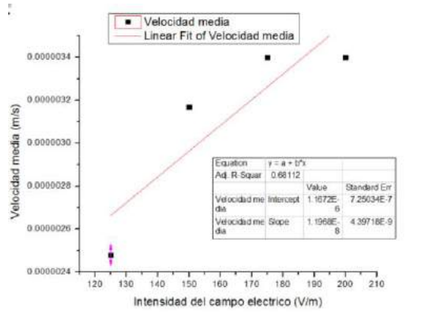


Figura 5. Recta obtenida despreciando datos para la celda con electrodos de aleación de plata

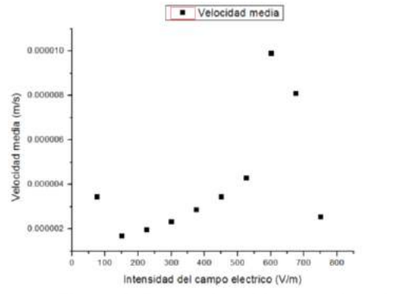


Figura 6. Datos obtenidos para la celda con electrodos de acero ferrítico

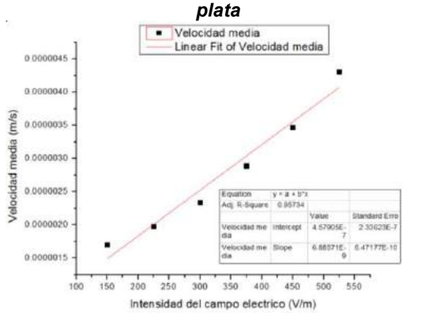


Figura 7. Recta obtenida despreciando datos para la celda con electrodos de acero ferrítico

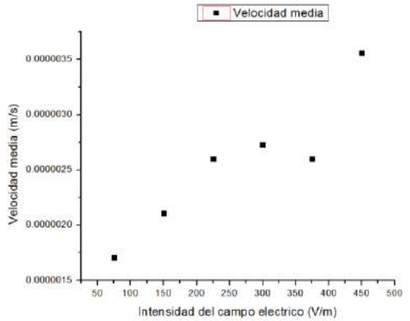


Figura 8. Datos obtenidos para la celda con electrodos de acero austenítico

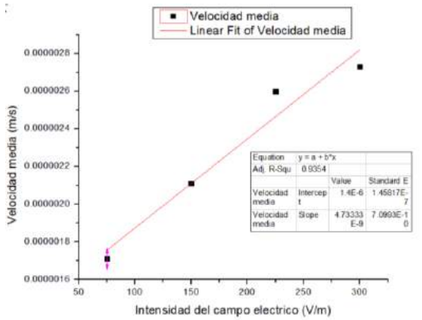


Figura 9. Recta obtenida despreciando datos para la celda con electrodos de acero austenítico

Potencial zeta calculado con las mediciones de la celda con electrodos de aleación de plata: $\zeta = 25.7mV$
Potencial zeta calculado con las mediciones de la celda con electrodos de acero ferrítico: $\zeta = 14.8mV$
Potencial zeta calculado con las mediciones de la celda con electrodos de acero austenítico: $\zeta = 10.2mV$

CONCLUSIONES

-La diferencia en los tres resultados se debe a que las propiedades de las aleaciones metálicas usadas en los electrodos no son las mismas.
-Después de cierto voltaje las celdas comienzan a dar mediciones erróneas debido a que los electrodos comienzan a liberar sustancias que cambian las propiedades de la solución coloidal.
-Las celda con electrodos de acero ferrítico soportaron un voltaje más alto y se observan resultados más lineales lo que las hace más adecuadas para la medición del potencial zeta.

BIBLIOGRAFÍA

Libros
Hunter, R.J. (1998). Z Potenial in Colloid Science. New South Wales, Australia: ACADEMIC PRESS.

Artículos en linea
Weiner BB, Tsharnuler WW, Fairhurst D. (1993). Zeta Potential: a new approach. 05-07-2016, Brookhacen Instruments, Sitio web: http://www.laborchemie.com/data/Weiner%20Zeta%20Potential.pdf

Colloidal Dynamics Inc. (1999). The Zeta Potential. 29-06-2016, de Colloidal Dynamics, Sitio web: http://www.colloidal-dynamics.com/docs/CDElTut1.pdf

ANÁLISIS DEL CLC-2 DE RATÓN MEDIANTE ESTIMACIÓN DEL COSTO ENERGÉTICO DEL TRANSITO DE IONES, POR MEDIO DE CALCULOS DFT EN EQUIPOS DE SUPERCOMPUTO

Sánchez Trujillo Diana Laura[1] y Nieto Delgado Pablo Guillermo[2]

RESUMEN

Los canales de cloruro ClC, son proteínas transmembranales que permiten el paso selectivo de iones cloruro por la membrana celular. De la familia de los ClCs el ClC-2, a pesar de estar presente en una gran variedad de células, tejidos y órganos, aún se ignora mucho de su funcionamiento. En el presente trabajo planteamos dos mutaciones en el residuo Y561, primeramente cambiando por Fenilalanina (mutación Y-F) y posteriormente por alanina (Y-A), con el fin de analizar como se afecta el perfil de la conducción iónica en cada estructura. Planteamos un modelo que considera 17 aminoácidos fundamentales, del total que constituye al canal, a partir de la estructura de un modelo por homología para la secuencia de aminoácidos del ClC-2 de ratón. Empleamos la metodología de Teoría Funcional de la Densidad (DFT) para encontrar la posible estructura optimizada restringida, donde solo son libres los residuos mutados y la parte residual de los aminoácidos que se infiere, tienen influencia en el proceso de la conducción iónica (S170, E213). Mostramos el perfil energético de la estructura conforme el Cl sale del poro, y realizamos un importante comparativo entre la estructura silvestre y las mutaciones planteadas.
Palabras Clave: Canales ionicos, DFT, modelo por homología, CLC-2, mutación.

INTRODUCCIÓN

Los canales de cloro ($ClC\text{-}Cl^-/H^+$) son estructuras moleculares complejas que controlan el movimiento de iones cloro (Cl^-) y protones (H^+) a través de las membranas biológicas. Estas proteínas son homodimeros, cada monómero está conformado por 448 aminoácidos, y su estructura atómica se ha podido resolver en alta resolución y cristalizar gracias a técnicas de difracción de rayos X. Esto ha facilitado su estudio y ha generado como tal una nueva línea de investigación, ya que median muchas funciones fisiológicas como lo es; controlar el ritmo del corazón, regular la secreción de las hormonas en el torrente sanguíneo, y generar los impulsos eléctricos que subyacen a la transferencia de información en el sistema nervioso, entre otras (P. G. Nieto-Delgado et al. 2013).

En el trabajo reportado por el profesor de bioquímica Roderick MacKinnon “Gating the Selectivity Filter in ClC Chloride Channels” en el 2003, se postula la existencia de tres sitios por los cuales ocurre el intercambio de iones; $S_{interno}$, $S_{central}$ y $S_{externo}$. Dichos sitios están delimitados por ciertos aminoácidos como tal y se plantea que dichos aminoácidos tienen cierta influencia en el transporte de iones cloruro y protones a través de la membrana. El sitio interno es aquella parte de la estructura posterior a la S107, el sitio central está delimitado entre la parte anterior de la S107 y el E148 así como la Y445. El sitio externo tiene una carga negativa gracias a la E148.

Una de las proteínas ClC más importantes es el ClC-2, ya que desempeña un importante papel fisiológico. ClC-2 es un canal de doble poro ampliamente expresado en los tejidos de los mamíferos, el ClC-2 regula la actividad neuronal mediante el transporte de iones al medio extra e intra celular. Este es necesario para la absorción electroneutral de NaCl y KCl. El mal funcionamiento de los canales de cloro ClC-2 puede resultar en leucoencefalopatía, y su ablación en ratones degenera severamente la retina y los testículos; causando ceguera e infertilidad (Jesús-Pérez et al. 2015).

[1] Universidad Autónoma de Zacatecas “Francisco García Salinas”, Unidad Académica de Ciencias Químicas; “Campus UAZ SIGLO XXI” Edificio 6. Carr. Zacatecas-Guadalajara Km. 6, Ejido La Escondida, C.P. 98160, Zacatecas, Zac. MÉXICO. dlst_diana@hotmail.com.
[2] Facultad de Ingeniería, DFM, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Manuel Nava No. 6, C.P. 78260, San Luis Potosí, S.L.P., MÉXICO. memov921@dec1.ifisica.uaslp.mx.

En los seres humanos una deficiencia en el gen CLCN2; gen que codifica para la proteína ClC-2, se relaciona con el padecimiento de epilepsia idiopática generalizada en infantes, está claro que la homeostasis en el equilibrio electroquímico del cuerpo es de suma importancia y lo que genera esta homeóstasis es un correcto funcionamiento de dichas bombas o canales dedicados al transporte de iones y que los genes que las traducen para dichas proteínas sean expresados correctamente. El código genético que traduce para el CLC-2 presenta más similitudes con el de *Homo sapiens*, que aquel que traduce para el intercambiador de Cl^- de la *E.coli;* es por ello que es más conveniente trabajar con el modelo por homología del CLC-2 de ratón, tomando únicamente como referencia la información existente del intercambiador.

En el presente trabajo se plantea una serie de mutaciones en el sitio central de un canal ClC-2 de ratón, estructura obtenida mediante un modelo por homología, generado a partir de la secuencia de aminoácidos del código genético que traduce para dicha proteína. Las mutaciones realizadas son en la Y561, por Fenilalanina y por Alamina respectivamente, se optimizaron dichas estructuras según la metodología DFT y se midió la energía del sistema, para posteriormente realizar una comparación con el modelo inicial sin mutaciones, cabe recalcar que en esta ocasión se utilizó el cristal (3ORG), puesto que en un modelo por homología donde se utilizó el cristal (1OTS) no se reportaron cambios significativos tanto energéticamente como estructuralmente.

METODOLOGÍA

MODELO MOLECULAR.

El código genético que codifica para el ClC-2 de ratón sirvió para obtener una estructura generada por homología gracias a un modelador en línea SWISS-MODEL, el cual genero tres modelos mostrados en la figura 1, el seleccionado fue el que tenía mayor grado de convergencia (0.68) y mayor resolución (3.5 Å) y se muestra en la figura 1 a.

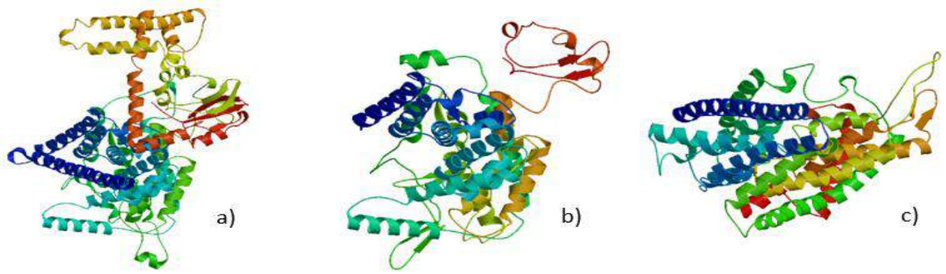


Figura 1, Modelos por homología obtenidos en línea gracias a SWISS-MODEL. a) *el primer modelo tenía un grado de convergencia de 0.60 y una resolución de 3.50 Å, es por ello que se seleccionó como el más apto para trabajar.* ***b)*** *este modelo tenía el mismo grado de resolución que el anterior; 3.50 Å, pero una convergencia de 0.50.* ***c)*** *modelo obtenido por homología de ClC-2 de ratón con 3.40 Å de resolución y 0.40 de convergencia.*

Se localizó la S170 ya que es equiparable a la S107 reportada en el trabajo ya mencionado de MacKinnon. Para obtener las estructuras a optimizar y a estudiar.

OPTIMIZACIONES MOLECULARES Y ENERGIAS.

La metodología DFT que se utilizó para optimizar las tres estructuras moleculares asociadas al ClC-2, consiste en resolver las ecuaciones de Khon-Sham:

$$\left[-\frac{1}{2}\nabla^2 + v_{eff}\right]\psi_i = \varepsilon_i\psi_i \tag{1}$$

$$v_{eff}(\vec{r}) = v(\vec{r}) + \int \frac{\rho(\vec{r}')}{|\vec{r} - \vec{r}'|} d\vec{r}' + v_{xc}(\vec{r}) \tag{2}$$

$$\rho(\vec{r}) = \sum_i^N \sum_s |\psi_i(\vec{r}, s)|^2 \tag{3}$$

Donde la energía total del sistema usando el funcional de la energía es:

$$E = \sum_i^N \varepsilon_i - \frac{1}{2}\int \frac{\rho(\vec{r})\rho(\vec{r}')}{|\vec{r} - \vec{r}'|} d\vec{r} d\vec{r}' + E_{xc}[\rho] - \int v_{xc}(\vec{r})\rho(\vec{r}) d\vec{r} \tag{4}$$

Dicha solución numérica fue obtenida mediante el software "Quantum-espresso" (P. Giannozzi et al. 2009). Los parámetros que se establecieron en el software fue el tamaño de la celda cubica, este determina la libertad que se le dará a la molécula para moverse y optimizar su nueva estructura; se determinó mediante la medición del largo de la molécula y se le sumo 16 Å para brindarle ese grado de libertad necesario. El resultado de dicha suma fue 38 Å, el tamaño de la celda es igual al corte de energía para la expansión de ondas planas (38 Ry). Adicionalmente se empleó el potencial de intercambio y correlación de Perdew-Wang, puesto que para resolver las ecuaciones de Khon-Sham, se ha probado que dicho potencial brinda resultados precisos en sistemas débilmente interactuantes. El uso de softwares de simulación de estructuras como Jmol (versión 13.0) y PyMOL (versión 1.7.4.5 2015) permitió el análisis y la interpretación de las interacciones obtenidas por las optimizaciones del "Quantum-espresso".

RESULTADOS

Los residuos importantes; es decir los que tienen influencia en el proceso de transporte de iones a través de la membrana, son aquellos que se encuentran alrededor de la S170 del modelo obtenido por homología del CLC-2 de ratón, (S107 en el caso del intercambiador de *E.Coli*), es por ello que se crearon tres moléculas con los residuos que estuvieran a 4 Å, 5 Å y 6 Å alrededor del residuo de la S170.

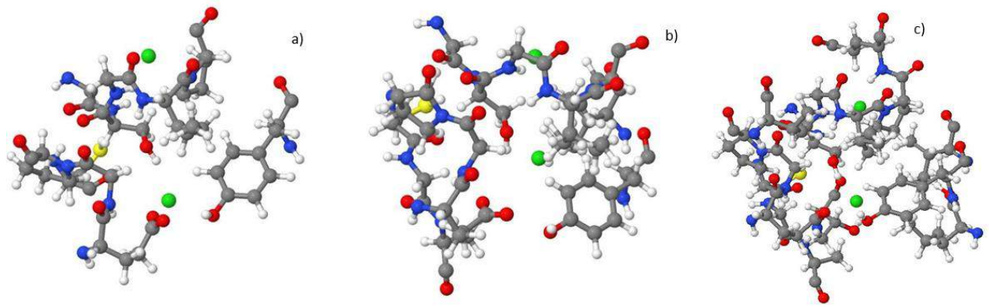


Figura 2.- a) *residuos alrededor de 4Å del residuo de la S170 la secuencia de aminoácidos que la conforman es GSGIPEGPCY.* ***b)*** *residuos alrededor de 5Å del residuo de la S170 la secuencia de aminoácidos que la conforman es GSGIPEGPCGAYI.* ***c)*** *residuos alrededor de 6Å del residuo de la S170 la secuencia de aminoácidos que la conforman es GSGIPEEGPVTCGALYI. En los tres modelos se insertaron los Cl^- tomando como referencia la posición de los reportados en el cristal de Christopher Miller del intercambiador de E.coli. La posición de dichos cloros se estabilizo sometiendo los datos de las estructuras a una optimización mediante DFT en el software "Quantum-espresso".*

La estructura obtenida con los residuos a 6Å alrededor del fragmento residual de la S170 (figura 2c) fue la seleccionada para trabajar ya que incluye los aminoácidos relevantes en el transporte de iones,

reportados en diversos trabajos (2) (3) (4). Dichos aminoácidos son la S170, E213 y Y561. En general la estructura consta de 17 aminoácidos. Se remplazó la Y561 por una fenilalanina esperando que existiera algún cambio en la posición de los iones cloro, lo cual no sucedió de forma relevante, es por ello que se sustituyó en segunda instancia por alanina, obteniendo un cambio en la posición del cloro del sitio central, este se acercó a la alanina 0.85Å y por ende se alejó del E213; (figura 3a). Al ver que existía un cambio en la posición del ion cloruro que ocupa la posición central, las tres estructuras WT (wild type), Y-F y Y-A, se sometieron nuevamente a una optimización, pero ahora dejando libre la parte residual del E213, S170 y del aminoácido 561 ya fuera Y,F o A (dependiendo el caso). Esto con el objeto de establecer como se adecua el sistema al momento del paso de iones hacía el sitio central. Los resultados de la optimización en la mutación Y-F dejando mover la parte residual de los aminoácidos ya mencionados, el cloro del sitio central se movió hacia el E213 1.2 Å, se infiere que la falta del oxígeno de la tirosina y la libertad que se le dio a la fenilalanina de moverse, le dio la capacidad necesaria al sistema de buscar la posición estructural más relajada, además la carga positiva de la fenilalanina calculada en la estructura optimizada que tenía fijos los residuos es menor, comparada con la que tiene la tirosina es por ello que el grado de atracción entre el Cl^- y la F561 disminuyo. (Ver figura 3b). Se infiere que cuando se calcule la carga de las estructuras optimizadas con los residuos libres, la carga de la F561 se vuelva negativa y el grado de repulsión del anillo bencénico sea mayor que el que ejerce el E213 y por ello el ion Cl^- se acerque al E213 aún más. La estructura optimizada donde se dejó libre la parte residual de los aminoácidos de interés de la mutación Y-A (figura 3c) resulto bastante interesante, ya que el E213 se alineo con el ion Cl^- posicionado en el $S_{central,}$ la S170 también se movió y oriento su grupo OH^- hacia el ion Cl^- que ocupa el $S_{central}$, el ion Cl^- se acerca al E213 1.27 Å un poco más que en lo reportado para la mutación Y-F, al analizar las cargas calculadas para la estructura donde se mantenían fijos los residuos, se encuentra que la carga del aminoácido que ocupa la posición 561 se reduce significativamente de 0.6196 (Y561) a 0.1991 (A561) por lo tanto ya no existe tanta atracción hacia esa posición y el ion Cl^- tiende a alejarse, además la carga de repulsión negativa que tiene el E213 hacia el ion Cl^- también disminuye en la mutación Y-A, por lo cual el ion Cl^- es más propenso a acercarse al $S_{externo}$ que delimita la E213. Claro está que se plantea realizar un análisis de cargas para las estructuras donde la parte residual de los aminoácidos de interés se encuentren libres, para dar más veracidad a la hipótesis planteada.

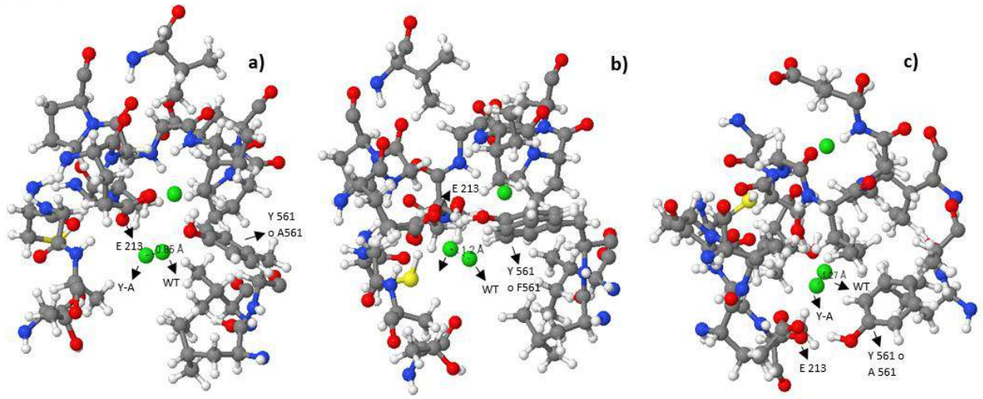


Figura 3. Estructuras optimizadas gracias a la metodología DFT. a) *se muestra el empalme de la estructura optimizada WT con la mutación Y-A mientras los residuos de los aa de interés se mantienen fijos. Se denota que el ion Cl^- de Y-A se acerca al E213.* ***b)****El empalme de las estructura optimizadas de WT con la mutación Y-F mientras los residuos de los aa de interés se encontraban libres, muestran como el ion Cl^- de la mutación Y-F se aproxima al $S_{interno}$ es decir a la E213, también se denota como la F561 se orienta hacia el Cl^- Y-A.* ***c)*** *El análisis de las estructura optimizada de la mutación Y-A mientras se tenía en libertad de movimiento los residuos de los aa de interés, denota al momento de compararla con el WT que el ion Cl^- se aleja de la A561 y se aproxima al E213 a pesar de que este tiene carga negativa, además el E213 se orienta hacia dicho ion, lo cual nos hace inferir que la carga negativa del E213 disminuye considerablemente en dicha mutación.*

Se procedió a medir la energía de las tres estructuras; Wild Type, Y-F, Y-A, en las estructuras que mantenían fijos a los residuos de los aminoácidos de interés. Para determinar si existe un cambio energético significativo en el sistema, se planteó una ruta de transición del ion Cl^- del sitio interno hacia el sitio central (ver figura 4), la energía se calculó en cada punto después de que el ion recorría 1 Å hacia el sitio central.

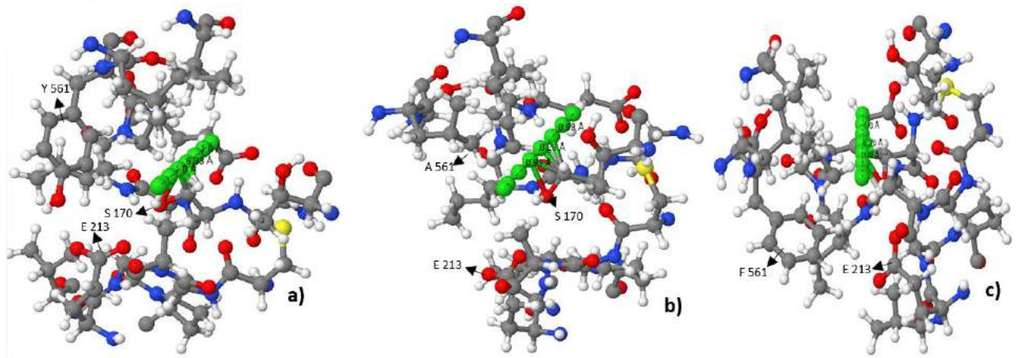
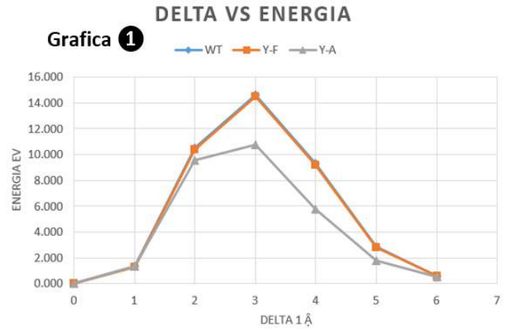
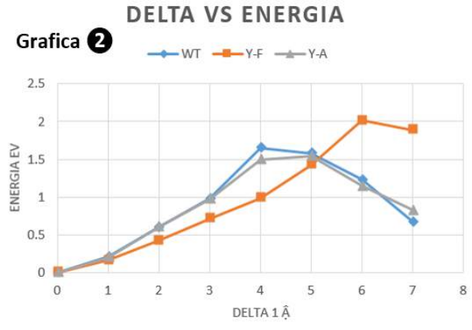


Figura 4.- ruta del Cl^- a través de la membrana, del sitio interno al sitio central. a) *ruta planteada en el Wild Type.* ***b)*** *ruta planteada para la mutación de tirosina por alanina (Y-A).* ***c)*** *ruta planteada para la mutación de tirosina por fenilalanina (Y-F). Estas rutas se plantearon respectivamente para medir posteriormente el grado energético de dichos puntos.*

Las energías de las tres estructuras se calcularon en el software "Quantum-espresso". Y se encontró que la estructura de referencia WT y la estructura de la mutación de Y-F mantenían niveles de energía altos muy similares; con 14.6280 eV como punto más alto, claro está que se esperaba que la energía del sistema aumentara porque la ruta planteada pasa muy cercana de la S170, e incluso llega a enlazar con su parte residual, pero la ruta planteada para la mutación Y-A también pasa a una distancia similar de la S170 y también se enlaza con su parte residual y a pesar de ello reporta un estado energético menor, reportando como punto más alto 10.7880 eV. Los resultados obtenidos fueron comparados con los calculados resultantes de otras estructuras que utilizaron el cristal (1OTS) para obtenerse, en dichos resultados, al contrario que en los obtenidos en las estructuras que utilizaron el nuevo cristal (3ORG), el WT y la mutación Y-A reportaban resultados de energía muy similares.





Grafica 1.- *Resultados de los cálculos de energía obtenidos mediante metodología DFT por las estructuras que utilizaron cristal nuevo para generarse, donde se puede observar como la mutación de Y-A reduce la energía del sistema.*
Grafica 2.- *Resultados de los cálculos de energía obtenidos mediante metodología DFT gracias a las estructuras que utilizaron un cristal distinto al nuevo para generarse, se observa como el WT y la mutación Y-A tienen un comportamiento energético muy similar, y la mutación Y-F no tiene un comportamiento energético significante ya que aumenta la energía del sistema, lo que hace más improbable su existencia.*

CONCLUSIONES

El estudio de los canales de cloro ($ClC\text{-}Cl^-/H^+$) en particular del ClC-2, permite conocer cómo es que ocurre el transporte iónico en ellos y las posibles alteraciones que podría tener si la estructura se modificara; como lo fue en este caso. Las mutaciones realizadas en las estructuras obtenidas por homología del ClC-2 de ratón permitieron dar a conocer, que cuando se sustituye la Y561 por alanina el sistema reduce su energía y por lo tanto facilita el paso de los iones hacia el sitio externo, en cambio cuando se sustituye Y561 por fenilalanina la energía del sistema también se reduce, pero no lo suficiente para ser significativa, puesto que se reduce en decimales de eV.

El estudio del ClC-2 en nuevos cristales sintetizados (3ORG) abre una nueva puerta para la investigación de las estructuras de los canales de cloro, puesto que como se discutió en el presente trabajo, en unas estructuras anteriores obtenidas con un cristal diferente (1OTS) no existía una reducción de la energía del sistema en ninguna de las mutaciones respecto al WT. La estructura que favorece más al sistema es aquella con la mutación Y-A ya que favorece al paso de iones hacia el $S_{Externo.}$ Se plantea como trabajo a futuro realizar optimización en la ruta del Cl^- donde este se mantenga fijo y posteriormente se calcule la energía del sistema, buscando así que esta disminuya.

BIBLIOGRAFÍA

1. P. Giannozzi, S. Baroni, N. Bonini, M. Calandra, R. Car, C. Cavazzoni, D. Ceresoli, G. L. Chiarotti, M. Cococcioni, I. Dabo, A. Dal Corso, S. Fabris, G. Fratesi, S. de Gironcoli, R. Gebauer, U. Gerstmann, C. Gougoussis, A. Kokalj, M. Lazzeri, L. Martin-Samos, N. Marzari, F. Mauri, R. Mazzarello, S. Paolini, A. Pasquarello, L. Paulatto, C. Sbraccia, S. Scandolo, G. Sclauzero, A. P. Seitsonen, A. Smogunov, P. Umari, R. M. Wentzcovitch, J.Phys.:Condens.Matter, 21, 395502 (2009) Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1088/0953-8984/21/39/395502>
2. P. G. Nieto-Delgado , J. Arreola & R. A. Guirado-López (2013): *"Atomic charges of Cl- ions confined in a model Escherichia coli ClC-Cl-/H+ ion exchanger: a density functional theory study"*, Molecular Physics: An International Journal at the Interface Between Chemistry and Physics, DOI:10.1080/00268976.2013.776709
3. Raimund Dutzler, Ernest B. Campbell and Roderick MacKinnon (March 20, 2003) "*Gating the Selectivity Filter in ClC Chloride Channels"* Science 300 (5616), 108-112. [doi: 10.1126/science.1082708]
4. Bennetts, B. and Parker, M.W. Molecular determinants of common gating of a ClC chloride channel. Nat. Commun. 4:2507 doi: 10.1038/ncomms3507 (2013).
5. Marco Biasini, Stefan Bienert, Andrew Waterhouse, Konstantin Arnold, Gabriel Studer, Tobias Schmidt, Florian Kiefer, Tiziano Gallo Cassarino, Martino Bertoni, Lorenza Bordoli, Torsten Schwede. (**2014**). SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Research*; (1 July 2014) 42 (W1): W252-W258; doi: 10.1093/nar/gku340.
6. Kiefer F, Arnold K, Künzli M, Bordoli L, Schwede T (**2009**). The SWISS-MODEL Repository and associated resources. *Nucleic Acids Research*. 37, D387-D392.
7. José J. De Jesús-Pérez, Alejandra Castro-Chong, Ru-Chi Shieh, Carmen Y. Hernández-Carballo, José A. De Santiago Castillo, and Jorge Arreola (2015) "Gating the glutamate gate of CLC-2 chloride channel by pore occupancy" en The Journal of General Physiology, Núm. 1, Vol. 147, Diciembre 14. [pp. 25–37]

PRUEBA DE MÉTODOS TEÓRICOS EN ESTADOS ELECTRÓNICOS EXCITADOS RESPECTO A BASE DE DATOS EXPERIMENTAL

Tomás Santillán Gomez[1] y Leonardo Alvarez Valtierra[2]

RESUMEN

Cuando se habla de cuántica se habla de unas de sus principales ecuaciones la ecuación de Schrödinger sin embargo esta ecuación no es no es posible resolver en todos los casos analíticamente cuando se habla de átomos y de moléculas de echo el único elemento que pose soluciones analíticas es el átomo de hidrogeno sin embargo eso nos da una gran noción de cómo serán las soluciones para el resto de los elementos así como de moléculas, basándose en estas soluciones para el átomo de hidrogeno se han ido construyendo métodos a partir de cálculos variaciones o de perturbaciones con la finalidad de aproximar las soluciones no solo para otros elementos sino también para moléculas y en este trabajo se realizarán algunas pruebas de algunos métodos como hartree-fook, zindo, B3LYP, y cis para el primer estado excitado de algunas moléculas ya conocidas muy bien experimentalmente con la finalidad de encontrar un método y con qué base nos aproxima a los resultados experimentales de las constantes de rotación.

ABSTRACT

When you are speaking of quantum talking about one of its main equations the Schrödinger equation however this equation is not cannot be resolved in all cases analytically when speaking of atoms and molecules in fact the only element that pose analytical solutions is the hydrogen atom however that gives us a notion of how will the solutions for the other elements and molecules based on these solutions for the hydrogen atom have been built methods from calculations variations or disturbances in order to approximate the solutions not only for other elements but also to molecules and in this study some evidence of some methods such as the Hartree-Fook, ZINDO, B3LYP, and cis to the first excited state of some molecules will be made already known well experimentally in order to find a method and approaches us what basis the experimental results of constant rotation.

INTRODUCCION

1928: Hartree introdujo el método del campo auto consistente (SCF), al cual llegó por medio de argumentos físicos intuitivos y basados en el modelo atómico de Bohr.

En 1930: Fock y Slater indicaron que deben utilizarse espín-orbitales y tomar en cuenta una combinación lineal antisimétrica de productos espín-orbitales (método de Hartree-Fock).

El operador Hamiltoniano para un átomo con n electrones es:

$$\hat{H} = -\frac{\hbar^2}{2m_e}\sum_{i=1}^{n}\nabla_i^2 - \sum_{i=1}^{n}\frac{Ze^2}{r_i} + \sum_{i=1}^{n-1}\sum_{j=i+1}^{n}\frac{e^2}{r_{ij}} \qquad (1)$$

[1]UAZ-UAF, Calle a Escame #39 El Terrero 99750 Tepechitlan Zacatecas tomas.santillan@fisica.uaz.edu.mx
[2]UG-División de Ciencia e Ingenierías, Lomas del Bosque #103, Col. Lomas del Campestre, 37150 León, Gto. leoav@fisica.ugto.mx

En donde el primer termino de la derecha de 1) es la energia cinetica, el segundo termino el operador de potecial electron- nucleo y el tercer termino es el operar de potencial electron-electron devido a este termino es por que no se puede aplicar el metodo de la separacion de variables para enciontrar las soluciones analiticas pero se puede aproximar la solucion escogiendo una funcion de onda en la forma de producto:

$$\phi_0 = S_1(r_1,\theta_1,\phi_1)S_2(r_2,\theta_2,\phi_2)\dots S_n(r_n,\theta_n,\phi_n) \quad (2)$$

Donde

$$S_i(r_i,\theta_i,\phi_i) = h_i(r_i)Y_{m_i}^{l_i}(\theta_i,\phi_i) \quad (3)$$

Sumando las interaciones con los otros electrones electrones, se tiene:

$$V_{12}+V_{13}+\cdots+V_{1n} = \sum_{j=2}^{n} e'^2 \int \frac{|s_j|^2}{r_{1j}} dv_j \quad (4)$$

Se promedia la internación de un electrón considerado con los demás electrones:

$$V_{12} = \frac{Q_1}{4\pi\varepsilon_0}\int \frac{\rho_2}{r_{12}} dv_2 \qquad V_{12} = e'^2 \int \frac{|s_2|^2}{r_{12}} dv_2 \quad (5)$$

Donde: $\rho_2 = -e|s_2|^2$ y $e'^2 = e^2/4\pi\varepsilon_0$ (6)

Sumando las interacciones con los otros electrones, se tiene:

$$V_{12}+V_{13}+\cdots+V_{1n} = \sum_{j=2}^{n} e'^2 \int \frac{|s_j|^2}{r_{1j}} dv_j \quad (7)$$

La energía potencial de interacción entre un electrón y los restantes electrones y el núcleo es:

$$V_1(r_1,\theta_1,\phi_1) = \sum_{j=2}^{n} e'^2 \int \frac{|s_j|^2}{r_{1j}} dv_j - \frac{Z e'^2}{r_1} \quad (8)$$

Se promedia $V1$ $(r1,\ \theta1,\phi1)$ sobre los ángulos y se obtiene $V1$ $(r1)$ que se usa en la ecuación de Schrödinger mono electrónica:

$$\left[-\frac{\hbar^2}{2m_e}\nabla_1^2 + V_1(r_1)\right] t_1(1) = \varepsilon_1 t_1(1) \quad (9)$$

La energia de atomo es :

$$E = \sum_{i=1}^{n} \varepsilon_i - \sum_{i=1}^{n-1}\sum_{j=i+1}^{n} \iint \frac{e'^2 |g_i(i)|^2 |g_j(j)|^2}{r_{ij}} dv_i dv_j$$

$$E = \sum_{i=1}^{n} \varepsilon_i - \sum_i \sum_{j>i} J_{ij} \quad (10)$$

Fock y Slater introdujeron la determinante de Slater de spin-orbitales:

$$\psi(\vec{r}_1,\vec{r}_2) = -\psi(\vec{r}_2,\vec{r}_1)$$

$$\psi(\vec{r}_1,\vec{r}_2) = \frac{1}{\sqrt{2}}[\chi_1(\vec{r}_1)\chi_2(\vec{r}_2) - \chi_1(\vec{r}_2)\chi_2(\vec{r}_1)] = \frac{1}{2}\begin{vmatrix}\chi_1(\vec{r}_1) & \chi_2(\vec{r}_1)\\ \chi_1(\vec{r}_2) & \chi_2(\vec{r}_2)\end{vmatrix}$$

$$\psi(\vec{r}_1,\vec{r}_2) = \frac{1}{\sqrt{N}}\begin{bmatrix}\chi_1(\vec{r}_1) & \chi_2(\vec{r}_1)\dots & \chi_N(\vec{r}_1)\\ \chi_1(\vec{r}_2) & \chi_2(\vec{r}_2)\dots & \chi_N(\vec{r}_2)\\ \vdots & \vdots & \vdots\\ \chi_1(\vec{r}_N) & \chi_2(\vec{r}_N) & \chi_N(\vec{r}_N)\end{bmatrix} \quad (11)$$

Se aplica el principio variaciones para encontrar los spin-orbitales que minimicen la energía.

$$E = \int \psi^* \hat{H}\psi dv \quad (12)$$

Se obtiene entonces la ecuación de Hartree-Fock.

$$\hat{F}_i\chi_i(\vec{r}_i) = \varepsilon_i\chi_i(\vec{r}_i) \quad (13)$$

Siendo *F* el operador de Fock definido como:

$$\hat{F}_i = h_i^0 + \sum_{j=1} \hat{J}_j(i) - \sum_{j=1} \hat{K}_j(i) \quad (14)$$

Donde :

$$h_i^0 = -\frac{1}{2}\nabla_i^2 - \sum_k \frac{Z_k}{r_{ik}} \qquad \hat{J}_j(i)\chi_i(\vec{r}_i) = \chi_i(\vec{r}_i)\int \frac{\chi_j(\vec{r}_2)\chi_j(\vec{r}_2)}{r_{12}} dr_1 \qquad \hat{K}_j(i)\chi_i(\vec{r}_i) = \chi_j(\vec{r}_i)\int \frac{\chi_j(\vec{r}_2)\chi_i(\vec{r}_2)}{r_{12}} dr_1 \quad (15)$$

Se calcula la energía del sistema utilizando el operador de Fock.

$$E = \int \phi^* \hat{F} \phi dv \quad (16)$$

Sustituyendo el operador$F$ y aplicándolo a las funciones:

$$\varepsilon_i = <\phi_i|h|\phi_i> + \sum[2<\phi_i|\hat{J}_i|\phi_i> - <\phi_i|\hat{K}_j|\phi_i>]$$

$$\varepsilon_i = h + \sum_{j=1}^{n/2}(2\hat{J}_{ij} - \hat{K}_{ij}) \quad (17)$$

Considerando repulsión interelectrónica.

$$-\sum_{i=1}^{n/2}\sum_{j=1}^{n/2}(2J_{ij} - K_{ij}) \quad (18)$$

Dos electrones por cada orbital.

$$2\sum_i \varepsilon_i \quad (19)$$

Entonces la energia total es :

$$E_{HF} = 2\sum_{i=1}^{n/2} E_i\hat{h}_{ij} - \sum_{i=1}^{\frac{n}{2}}\sum_{j=1}^{\frac{n}{2}}(2J_{ij} - K_{ij}) + V_{NN} \quad (20)$$

Para orbitales moleculares la combinación lineal de funciones es:

$$\Phi_i = \sum_{s=1}^{b} C_{si} X_s$$

Donde Xs = conjunto de funciones de los espín-orbitales.

La ecuación de Hartree-Fock

$$\sum_s C_{si} \hat{F} X_s = \varepsilon_i \sum_i C_{si} X_s \quad (21)$$

Buscar coeficientes de la función de onda con menor energía.

$$\frac{\partial E}{\partial C_{ri}} = 0 \quad (22)$$

Para encontrar Ei se multiplica por Xr conjugado y se integra en todo el espacio.

$$\sum_{s}^{b} C_{si}(\hat{F}_{rs} - \varepsilon_i S_{rs}) = 0 \quad r = 1, 2, 3, \ldots, n \quad (23)$$

Donde:

$$\hat{F}_{rs} = \langle X_r | \hat{F} | X_s \rangle$$
$$S_{rs} = \langle X_r | X_s \rangle \quad (24)$$

De donde se obtiene una ecuacion con b incognitas y b ecuaciones por lo que se puede resolver:

$$det(\hat{F}_{rs} - \varepsilon_i S_{rs}) = |\hat{F}_{rs} - \varepsilon_i S_{rs}| = 0 \quad (25)$$

De donde se obtiene la energia cuyo algoritmo para este metodo llamdo de hartree fock asi como el de los metodos cis, zindo y B3LYP ya se encuentran progamados en gaussian por lo que utilizaremos este sofware para simular alguanas moleculas y mediante un analisis estadistico poder encontrar cual de los metodos y con que base se aproxima mas a los resultados experimentales de las constantes rotacionales de cada molecula.

METODOS Y MATERIALES

Como ya se dijo anteriormente se utilizaran los metodos zindo, B3YP, hartree fock y cis estodos metodos ya se encuentran progamados en gaussian que maneja orbitales de la forma.

$$X(GTO) = N\, r^{n-1} e^{-r^2 \xi / na^2} Y_l^m \quad (26)$$

Se correra con 7 diferentes bases las cuales son 6-31g, 6-311g, 6-31g dp, g-311 gd, cc-pVDZ, CC-pVTZ y CC-pVQZ las cuales lo unico que varian es la cantidad de gausianas que maneja para obter la aproximacion a las eigenergias.

RESULTADOS

Se hizo la simulacion molecular con las siguientes moleculas: Dibenzofuran, Dibenzothiophene, Fluorene, 3-toluidine, 7-azaindole, 1-naphthoic_acid, 2-5diphenylfura, 1-hydroxynaphthalene, 25DP134ODA, 2-toluidine, 4-toluidine, 9-fluorene-methanol, 2-hydroxynaphthalene.

Para ver que tan certero son nuestros resultados se compararon las contantes rotacionales (A, B y C) obtenidas con la simulación molecular con las experimentales de cada molécula mediante el cálculo de un erro absoluto luego se promediaron esos tres errores y luego se promedió el de las 13 moléculas con la finalidad de comparar resultados por método y base dicha comparación se muestra en la tabla 1.

Pero en general los métodos para la constante A tuvieron un 3.78% de error para B un 1.88% y para C un 1.79 % de error.

Tabla 1 promedio de errores porcentuales por base y método de las constantes rotacionales.

	Base								
Método	s1 6-31G	S1 6311G	S1 6-31G dp	S1 6-311G dp	S1 cc-pVDZ	S1 cc-pVTZ	S1 cc-pVQZ	base experimental	promedio
B3LYP	2.710616	2.6292295	1.8752961	1.722962	2.1479051	2.1633151	2.0083988	#	2.1796747
TD-HF	1.9559986	2.1657385	2.4224707	2.5695245	2.0905064	3.0199848	3.3148198	#	2.5055776
CIS	2.0390473	2.4668285	2.2663404	2.2835379	2.1950351	3.1387243	3.6714032	#	2.5801309
ZINDO	#	#	#	#	#	#	#	3.8428709	3.8428709
promedio	2.2352206	2.4205988	2.1880357	2.1920081	2.1444822	2.774008	2.9982072	3.8428709	#

Como se puede apreciar de la tabla 1 el método que tuvo un mayor error porcentual fue el ZINDO con 3.84% por lo que de este análisis es el que menos se recomiendo; por el contrario el de menor error es el método B3LYP con 2.17% que si comparamos los errores de las bases independiente del método vemos de la tabla 1 que la ideal es la base cc-pVDZ, pero como el mejor método fue el B3LYP y ese funciono mejor con la base S1 6-311G dp por lo que se recomienda para futuras simulaciones moleculares este método y esta base.

CONCLUSIONES

1. La constante rotacional que menos se les dificulto en general a los métodos fue la constante C que ya era un resultado esperado.
2. El método que menos se aproximo fue el ZINDO a pesar de correrse con resultados experimentales.
3. El mejor método es el B3LYP con la base S1 6-311G dp por lo que se recomienda si se quieren hacer futuros cálculos utilizar este método y esta base.
4. La mejor base independiente del método fue S1 cc-pVDZ que funciono mejor con el método TD-HF.

BIBLIOGRAFIA

Quantum Chemistry, D. A. McQuarrie, University Science Books, Mill Valley, Ca.

http://www.gaussian.com/g_tech/g_ur/k_cis.htm

http://www.gaussian.com/g_tech/g_ur/k_zindo.htm

http://www.gaussian.com/g_tech/g_ur/k_td.htm

http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/expoHartree-Fock_32480.pdf

https://sites.google.com/site/driverssystem/1-2-tipos-de-errores-error-absoluto-error-relativo-error-porcentual-errores-de-redondeo-y-truncamiento

CARACTERIZACIÓN DE UNA ASPARAGINASA PARA EL TRATAMIENTO DE LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

Paola Santos Jacobo[1] y Martha Leticia Santos Martínez[2]

RESUMEN

La L-Asparaginasa es empleada en el tratamiento de la LLA, una enzima que hidroliza asparagina. La depleción de este aminoácido inhibe la síntesis proteíca en los linfoblastos e induce su apoptosis. Actualmente las asparaginasas provenientes de *Escherichia coli* y *Erwinia crysanthemi* se administran pero su uso se acompaña de efectos secundarios, pues la depleción de este aminoácido disminuye la síntesis de otras proteínas como albúmina e insulina, originando trombosis, pancreatitis y fibrinólisis, además que su origen bacteriano causa reacciones de hipersensibilidad y formación de anticuerpos. En esta investigación se pretende caracterizar la L-asparaginasa de *Termoplasma acidophilum* mediante la ejecución de diferentes técnicas como PCR, electroforesis; así como la caracterización enzimática de la proteína.

ABSTRACT

L-Asparaginase is used in the treatment of ALL, an enzyme that hydrolyzes free asparagine. Amino acid depletion inhibits protein synthesis, thus inducing apoptosis in lymphoblasts. Asparaginases from *Escherichia coli* and *Erwinia crysanthemi* are currently administered but its uses is accompanied by side effects, since depletion this amino acid decreases the synthesis of other proteins such as albumin and insulin, causing thrombosis, pancreatitis and fibrinolysis, plus its bacterial origin cause hypersensitivity reactions and antibody formation. In this research we attempt to characterize the L-Asparaginase from *Thermoplasma acidophilum* by performing different techniques such as PCR, electrophoresis and enzymatic characterization of the protein.

Palabras Clave: *Asparaginasa, Thermoplasma acidophilum, Leucemia Linfoblástica Aguda.*

INTRODUCCION

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es la neoplasia más frecuente en la infancia, correspondiendo a 32-35% del total de cánceres, con una incidencia anual de 2,5 a 3 casos por cada 100 000 niños menores de 15 años. Se caracteriza por una proliferación incontrolada de una clona de células inmaduras de la hematopoyesis que infiltran la médula ósea e invaden la sangre periférica y otros órganos, condicionando una supresión del crecimiento y la diferenciación de las células normales. El tratamiento de las LLA en el niño ha tenido un notable impacto no solo en los resultados alcanzados en este campo sino en el de todas las leucemias y otras enfermedades neoplásicas. En los años cincuenta, utilizando tratamiento con un solo agente citostático se conseguían escasas remisiones completas y ninguna curación.

En los sesenta, con combinación de dos citostáticos (prednisona y vincristina) se alcanzaba más del 80% de remisiones completas aunque menos de un 10% de supervivencias prolongadas. En los setenta, la introducción de tratamientos dirigidos a disminuir las células leucémicas del SNC y la quimioterapia de mantenimiento elevó la supervivencia al 50%. En los ochenta, el reconocimiento de factores pronostico

[1] Universidad Autónoma de Aguascalientes, Centro de Ciencias de la Salud; Av. Universidad #940, Ciudad Universitaria, C.P. 20131, Aguascalientes, Aguascalientes; sts.jcb.pao@hotmail.com
[2] Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica; Camino a la Presa San José #2055, Colonia Lomas 4 sección, C.P.78216, San Luis Potosí, S.L.P.; lsantos@ipicyt.edu.mx

y grupos de riesgos diferenciados, junto a la intensificación del tratamiento y el empleo de tratamientos específicos para LLA permitió curaciones en el 65% de los pacientes. En la década actual, los mencionados avances y la posibilidad de recuperar pacientes de muy alto riesgo inicial o con recaídas mediante tratamientos muy intensivos y trasplante de médula ósea, hará que más del 70% de los niños afectados de LLA puedan lograr la curación.

La L-asparaginasa (L-ASP) es una enzima que hidroliza la asparagina en amonio y ácido aspártico y la glutamina en ácido glutámico y amonio. Aunque la función es simple y la asparagina es un aminoácido no esencial, tiene repercusión importante en el tratamiento de la leucemia, considerándosela como un elemento central en el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda pediátrica, además puede utilizarse como esquemas de terapia en linfomas no Hodgkin o leucemia mieloblástica aguda. La importancia de L-ASP se debe a que la mayoría de las células blásticas de la LLA, no posee la enzima para sintetizar la asparagina, dependiendo de la que se encuentra en la sangre, así vemos que los blastos que presentan la translocación TEL-AML1 son muy susceptibles a esta depleción.

La asparagina es un aminoácido importante para formar proteínas, motivo por el cual cuando disminuye este aminoácido los blastos entran en apoptosis. Hay blastos de LLA que contienen la enzima para sintetizar asparagina, lo que supone una razón para la resistencia a este medicamento. Actualmente hay disponibles tres formas de esta enzima, la producida por *Escherichia coli*, la producida por *Erwinia chrysanthemi* y una forma sintética, la L-asparaginasa pegilada de *E. coli.* El uso de esta enzima trae consigo efectos negativos en las terapias, como lo son las reacciones de hipersensibilidad, con formación de anticuerpos que producirá la inactivación de la enzima; inhibición de la síntesis de proteínas, que es la que tiene mayor repercusión, observándose alteraciones de la coagulación, hipoalbuminemia, elevación de enzimas hepáticas, pancreatitis e hiperglicemias.

METODOS Y MATERIALES

Sobreexpresión heteróloga de la proteína L-ASP
Para la expresión de la proteína de interés se realizó un cultivo LB a partir de una colonia de células E. coli BL21 pLysS que contenía el plásmido con el inserto clonado.
Para determinar el crecimiento bacteriano se utilizó el método de dispersión de luz, el cual permite conocer la cantidad de bacterias presentes en el cultivo a partir de la medida de densidad óptica (D.O.) a 600nm. El medio de cultivo contenía antibiótico (Cloranfenicol y Kanamicina), se incubó a 37°C en agitación hasta alcanzar una D.O. de 0.6. Una vez alcanzada la D.O. mencionada, se indujo la expresión proteica añadiendo IPTG a una concentración final de 1mM, se dejó en incubación 8 horas a una temperatura de 37°C. Se tomaron muestras antes de la inducción y posterior a esta cada 2H, las cuales fueron centrifugadas a 4,000 rpm durante 20 minutos y el pellet resultante fue congelado a -20°C.

Purificación de L-ASP por cromatografía de afinidad por níquel
Para la extracción del DNA plasmídico, el pellet derivado de la técnica anterior fue resuspendido en buffer de lisis e incubado en hielo durante 30 minutos. Posteriormente fue centrifugado a 12,000 rpm durante 20 minutos. La proteína del sobrenadado fue purificada mediante cromatografía por afinidad en columnas de Ni-NTA agarosa. La proteína ya purificada fue dializada, se colocó 1.800mL de la proteína en un tubo de diálisis, que después se colocó en Tris 10mM con un pH de 7.0, a una temperatura de 4°C y con agitación constante.

Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)
La electroforesis de proteínas se realizó en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 10%, se utilizó el colorante Benchmarck Ladder, y como muestras la proteína obtenida antes y después de la sobreexpresión, en la purificación y la proteína final de la diálisis. Las condiciones de corrido se mantuvieron a 180V durante 1 hora aproximadamente. Finalmente, los geles fueron teñidos con azul de coomasie y el peso molecular de las muestras se determinó comparando las bandas obtenidas con el marcador de peso molecular utilizado.

Determinación de la concentración de proteínas totales
Se utilizó la técnica de Bradford en varias ocasiones, utilizando como muestras el pellet resultante en el primer ensayo de la sobrexpresión heteróloga, la proteína resultante de la purificación por cromatografía y la proteína final de la diálisis. Los reactivos utilizados y cantidad se encuentran en la tabla 1. La curva de calibración se realizó con suero de albúmina bovina (BSA), a una concentración de 2mg/ml. La mezcla se dejó reposar 15 minutos, para posteriormente leer la absorbancia en el espectofotómetro a 595nm. Se calculó la concentración de acuerdo a una curva estándar de BSA y a la fórmula y=m.x+b

Tabla 1.

TUBO	H2Od	BSA (2mg/ml)	Bradford
1	1000	0	300
2	999	1	300
3	998	2	300
4	997	3	300
5	996	4	300
6	995	5	300
7	994	6	300
8	993	7	300
9	992	8	300
10	991	9	300

MUESTRAS

20µL proteína muestra + 980µL dH2O + 300µL Bradford

Determinación de la actividad enzimática de la proteína
La asparaginasa cataliza la conversión de L-asparagina en L-ácido aspártico y amoniaco. El amonio que se libera reacciona con fenol nitroprusiato y con hipoclorito en una solución alcalina, resultando en un color azul que determinará la actividad enzimática al medir la absorbancia a 600nm. Las condiciones del ensayo fueron a 37°C y a un pH de 5.

Tipificación molecular de las clonas E. coli mediante PCR y digestión
Se realizó digestión enzimática mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio, colocando en los pozos DNA plasmídico 10µL, en una ocasión con la enzima NcoI 5µL, y en otro ensayo se utilizó la enzima XhoI; Buffer NEB3 5µL y dH2O, tras lo cual se corrió a 80V, hasta que el colorante se visualizó casi al final del gel.

Para realizar el PCR se requirió del Plásmido pET28a previamente extraído por mini Prep, reactivos necesarios para este ensayo se encuentran en la tabla 2; se utilizó MJ Mini Gradient Thermal Cicler para hacer la reacción. Con los resultados del PCR se realizó electroforesis en Agarosa, para lo cual se empleó 0.3g de agarosa, 30mL de Buffer TAE 1X y 1µL de bromuro de etidio, donde se colocó en el 1° pozo el marcador de tamaño, 2° PCR 1+ 5µL del marcador de tamaño y en el 3° pozo PCR2 + 5µL.

Tabla 2.

REACTIVO/CONCENTRACION	VOLUMEN	CANTIDAD FINAL
Plásmido pET28a(+)-Ta0338/~100 pg/µl	2µL	200 ng
Buffer PCR/10X	2.5 µL	1X
MgSO4/50 mM	0.5 µL	1mM
Primer (F y R)/10µMol	0.75 µL	0.3µMol
Taq Pol/5U/µL	0.2 µL	1U
dNTP´s/10mM	0.75 µL	0.3Mm
Agua estéril MO	17.55 µL	Total 25µL

RESULTADOS

Producción y purificación de la proteína L-ASP a partir de la CEPA E. coli BL21D3pLysS pET28a(+)
Después de la expresión de la proteína L-ASP completa en la cepa E. coli BL21D3 pLysS y de lisar las células, se determinó la solubilidad de la proteína analizando la muestra total y las fracciones soluble e insoluble de las muestras mediante SDS-PAGE 10%.

En la figura 1 se puede observar que a partir de la inducción se obtiene la banda de 32 kDa más marcada; corresponde a la Asparaginasa. A las 8 horas, la proteína se encuentra sobreexpresada y puede comenzar a purificarse. El carril de los lavados, se utiliza como un control negativo para observar que la proteína no se está liberando de la membrana con la solución de imidazol y en el carril de la proteína dializada se puede observar solamente la banda que corresponde a la Asparaginasa. Para determinar si hemos purificado la proteína mediante cromatografía de afinidad, se realizó un perfil de las distintas etapas de purificación, concluyendo que se logró obtener la proteína de forma pura.

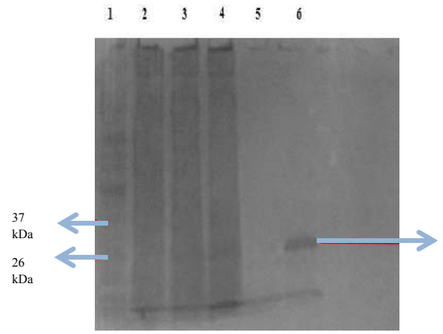


Fig.1.SDS-PAGE al 10%, ASNasa. Carriles: 1-Marcador de tamaño, 2-Inducción con IPTG a las 0 horas, 3-Inducción con IPTG a las 4 horas, 4-Inducción con IPTG a las 8 horas, 5-Lavados

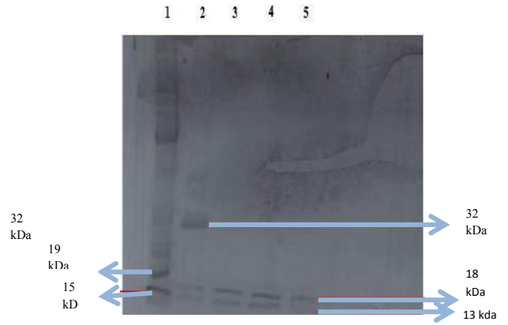


Fig.2.SDS-PAGE al 10%, ASNasa a diferentes horas de exposición a 37°C Carriles: 1-Marcador de tamaño, 2-24 horas, 3-48 horas, 4-72 horas, 5-96

En la figura 2, se pueden observar desde las 24 horas, cómo la banda de 32 kDa desaparece y sólo aparecen las de 18 y 13 kDa que corresponden a las cadenas alfa y beta de la proteína debido a su escisión intramolecular pues sufre de un proceso autocatalítico.

Determinación de la concentración de proteínas totales
La cuantificación de proteína total obtenida a partir de los lisados celulares se realizó mediante el método de Bradford (Bradford, M.M; 1976).

En la tabla 3 y figura 3, se presentan los resultados de la cuantificación de proteínas de los sobrenadantes obtenidos en el lisado celular de los cultivos con las cepas indicadas. Tomando el promedio de las dos muestras de proteína dializada se calcula la concentración de la proteína, obteniendo un total de 0.2mg/mL.

Tabla 3.

MUESTRA	ABSORBANCIA 1	ABSORBANCIA 2	PROM. ABS.	CONCENTRACION (mg/mL)
0	0	0	0	0
1	0.079	0.037	0.058	0.002
2	0.11	0.117	0.1135	0.004
3	0.076	0.183	0.1295	0.006
4	0.117	0.295	0.206	0.008
5	0.294	0.084	0.189	0.01
6	0.41	0.345	0.3775	0.012
7	0.392	0.378	0.385	0.014
8	0.446	0.475	0.4605	0.016
9	0.513	0.557	0.535	0.018
10	0.588	0.577	0.5825	0.02

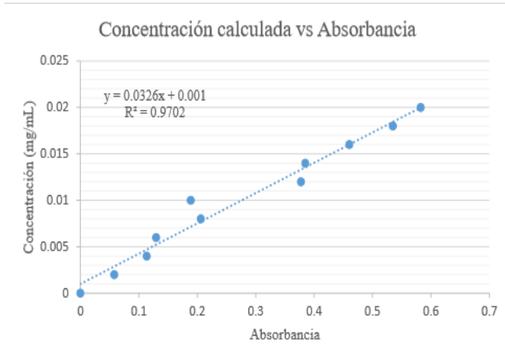


Fig 3

Tipificación molecular de las clonas E. coli mediante PCR y digestión

Con el ADN genómico de la cepa E. coli BL21 de referencia se realizaron reacciones de PCR en punto final y los productos se observaron en un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio. Se observaron bajo luz ultravioleta en un transiluminador UV, logrando obtener bandas de alrededor de 6050 pares de bases, acorde con lo esperado. Imagen 3°.

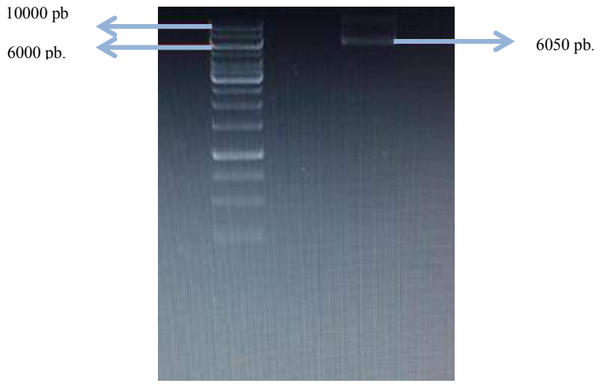


Fig. 4

CONCLUSIONES

Durante este trabajo se logró obtener la proteína L-asparagina en condiciones desnaturalizantes a partir de la cepa E. coli BL21DE3pLysS transformada con el vector de expresión pET28a. Esta proteína podría ser un elemento útil en ensayos funcionales donde se quiera estudiar el papel de esta proteína en la respuesta inmune antitumoral.

BIBLIOGRAFIA

1. C. Moscardó Guilleme, R.F. (2013). Actualización del tratamiento con L-asparaginasa en Pediatría. *Elsevier*,11.

2. Guzmán, M. Serna, G. Santos, L. (2014). Identification, heterologous expression and detection of enzymatic activity of an asparaginase from the archaeon Thermoplasma acidophilum. *Biocatalysis and Biotransformation*, 32. pp. 295-301.

3. Merryman R, Stevenson KE, Gostic WJ, Neuberg D, O´Brian J, Sallan SE, et al. Asparaginase associated myelosuppression and effect on dosing of other chemotherapeutic agents in childhood acute lymphoblastic leukemia. Pediatric Blood Cancer 2012;59:925-7.

4. Guex, N.; Peitsch, M.; & Schwede, T. (2009). Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. Electrophoresis, 30, 162-173.

5. Bradford, M.M.1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye biding. Analy. Biochem. 72.p. 248-254.

6. Baneyx F. 1999. Recombinant protein expression in Escherichia coli. Current Opinion in Biotechnology. 10 (5):411-421.

CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS DIFERENTES DOMINIOS DEL SUPRESOR TUMORAL RETINOBLASTOMA

Ana Patricia Santos Valente[1] y Vanessa Olivares Illana[2]

RESUMEN

El retinoblastoma es el tumor intraocular más frecuente en la población mundial en edad pediátrica, que aparece en la retina. Representa el 4.3 % de las neoplasias de la infancia. Este padecimiento es causado por mutaciones en el gen *RB1*, el cual codifica para la proteína supresora de tumores retinoblastoma (RB), esta proteína juega un rol central en el control del ciclo celular en células eucariotas, y su inactivación funcional se encuentra asociada a la progresión del cáncer en humanos. La proteína RB inhibe la expresión de los genes necesarios para la entrada en la fase S por el secuestro de los factores de transcripción de la familia E2F. En el presente trabajo se utilizó la cepa *Escherichia coli* BL21 DE3 para la expresión y posterior purificación de los diferentes dominios de RB con el fin de brindar resultados para estudiar los mecanismos de interacción de la proteína RB con otras proteínas de interés.

ABSTRACT

Retinoblastoma is the most common intraocular tumor in world population in pediatric age, appearing on the retina. Representing 4.3% of all childhood neoplasms. This condition is caused by mutations in the *RB1* gene, which encodes the retinoblastoma tumor suppressor protein (RB), this protein plays a central role in cell cycle regulation in eukaryotic cells, and whose functional inactivation is associated with tumor progression in humans. The Rb protein inhibits the expression of genes necessary for entry into the S phase by the kidnapping of the transcription factors of the E2F family. *Escherichia coli* BL21 DE3 strain was used for expression and purification of the different domains of RB, in order to provide results to study the mechanisms of interaction of RB protein with other proteins of interest.

Palabras Clave: Retinoblastoma, supresor tumoral.

INTRODUCCIÓN

El retinoblastoma es el tumor intraocular maligno más frecuente en pediatría. Representa el 4.3 % de las neoplasias de la infancia. En México, la incidencia anual varía de acuerdo con la zona geográfica estudiada en un rango de 4 a 24 casos por millón en menores de 15 años y el 95 % de los casos se presenta en la etapa de lactante y preescolar. El retinoblastoma es casi siempre fatal y un retraso en su tratamiento suele suponer un pronóstico visual precario, de ahí la transcendencia del diagnóstico precoz. El gen responsable, es *RB1*, está localizado en el cromosoma 13 y actúa de forma dominante; es decir, en células donde las dos copias del gen estén dañadas. RB controla la progresión a través del ciclo celular a través de su interacción con la familia de factores de transcripción E2F.

Esta familia está compuesta por ocho miembros (E2F1-8), algunos de los cuales tienen funciones activadoras y otros de los cuales tienen funciones represoras. RB es capaz de interactuar con E2F1, E2F2, E2F3 y E2F4, quienes funcionan como activadores transcripcionales uniéndose a secuencias regulatorias en el ADN y estimulando la expresión de genes requeridos para la entrada en fase S. La interacción entre RB y E2F bloquea la función transactivadora de E2F, y por lo tanto restringe la entrada de las células a la fase S.

[1]Instituto Tecnológico de Celaya, Ingeniería Bioquímica; Antonio García Cubas Pte #600 esq. Av. Tecnológico, C.P: 38010, Celaya, Guanajuato, anasantosvalente@hotmail.com.
[2]Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Instituto de Física; Av. Dr. M. Nava No.6, C.P: 78260, San Luis Potosí, S.L.P, vanesa@ifisica.uaslp.mx.

MARCO TEÓRICO

El gen *RB1* fue clonado inicialmente en 1986, como uno de los genes cuya mutación predisponía al tumor pediátrico retinoblastoma (Friend et al., 1986). *RB1* fue el primer gen supresor de tumores identificado, y poco tiempo después de su identificación, se descubrió que el producto de este gen era una proteína de 105KDa, la cual era inactivada por varias proteínas de los llamados pequeños virus a ADN tumorigénicos (Howley and Livingston, 2009).

La función de RB fue dilucidada inicialmente a partir del estudio de su interacción con tres proteínas virales: el antígeno T grande de SV40 (SV40LT), la proteína E1A del adenovirus humano (AdE1A) y la proteína E7 del virus de papiloma humano (HPV-E7) (DeCaprio et al., 1988; Dyson et al., 1989; Whyte et al., 1989). Estos estudios revelaron que RB actuaba en el control de la progresión a través del ciclo celular (Weinberg, 1995). Uno de los principales roles de RB es la restricción del pasaje de la fase G1 a la fase S (fase de síntesis de ADN), la cual es indispensable para asegurar la progresión a través del ciclo celular.

Se ha mostrado que RB está formada por 4 dominios. El dominio N-terminal de aproximadamente 370 aminoácidos (RbN), un dominio central denominado RbAB (Small pocket), de 400 aminoácidos, y un dominio C-terminal de aproximadamente 150 aminoácidos (RbC). La combinación de los dominios Small pocket y C-terminal originan el dominio Large pocket. (RbABC). El domino N-terminal y el dominio AB están formados cada uno por un doble motivo de ciclina, un motivo de plegamiento común al factor de transcripción TFIIB y a las ciclinas (Hassler et al., 2007; Lee et al., 1998). El domino C-terminal tiene una estructura desordenada en solución, y contiene 16 sitios de fosforilación por quinasas dependientes de ciclinas (Rubin et al., 2005).

MÉTODOS Y MATERIALES

Vector de clonación pET28a (+).
Cepa de *Escherichia coli* Top 10.
Cepa de *Escherichia coli* BL21 DE3.

Clonación

A partir de la construcción pET28-RB, se amplificaron los diferentes dominios de RB mediante la técnica de PCR utilizando los oligonucleótidos correspondientes a cado dominio. El producto de PCR fue digerido utilizando las enzimas de restricción *Hin*dIII y *Bam*HI. Así mismo el vector pET28a (+) fue digerido con las mismas enzimas de restricción y posteriormente desfosforilado. Todas las digestiones se realizaron a 37ºC durante 2 horas. Tras esto, se llevó a cabo la ligación de cada dominio con pET28a utilizando la enzima T7 ligasa. El producto de la ligación se utilizó para realizar una transformación bacteriana utilizando la cepa *Escherichia coli* top 10 (que previamente se hizo competente), mediante cambios bruscos de temperatura se favorece la entrada de ADN a las bacterias. Las células transformadas se sembraron en cajas con medio LB y antibiótico kanamicina y se incubaron a 37ºC toda la noche para permitir la proliferación celular.

Tras observar el crecimiento celular se seleccionaron 5 colonias de cada caja y se realizó una PCR de colonia con el fin de seleccionar a aquellas colonias que tuvieran la construcción del dominio de interés dentro del ADN plasmídico. Se identificaron la clonas positivas a la transformación mediante la observación en un gel de agarosa. Las colonias seleccionadas se cultivaron en 10 mL de medio LB con kanamicina y se crecieron durante 16 horas en agitación constante. Los cultivos líquidos crecidos se usaron para purificar el ADN plasmídico siguiendo el protocolo del Plasmid MiniPrep Kit. Se corroboró la construcción de los diferentes dominios realizando una digestión al ADN plasmídico con las enzimas de restricción *Hin*dIII y *Bam*HI y se analizó en un gel de agarosa, obteniendo solo la construcción del dominio Small pocket y Large pocket.

Expresión.
Se realizó una transformación bacteriana utilizando la cepa *Escherichia coli* BL21 D3 y los dominios Small pocket y Large pocket, mediante choque térmico. De las células de *E.coli* BL21 D3 transformadas con el plásmido correspondiente a cada dominio, se realizó un precultivo en 10 ml de medio 2xYT + km y se incubo a 37°C por 16 horas. Se realizó un cultivo en 100 ml de 2xYT + km y se tomó 1 ml del precultivo correspondiente hasta llegar a una densidad óptica de 0.1-0.3. Se incubó a 37°C y se midió la absorbancia cada 30 minutos hasta llegar a una D.O de 0.9. Se procedió a la inducción agregando 0.5mM de IPTG y se dejó sobreexpresar durante 3 horas a 37°C. Los cultivos se centrifugaron a 4300 rpm por 15 minutos, se descartó el sobrenadante y se congelo a -80°C hasta su purificación.

Purificación
La purificación de la proteína se hizo mediante cromatografía de afinidad, utilizando una resina de níquel.

Los cultivos bacterianos se resuspendieron en 5 ml de buffer Tris A y 100 mg de PMSF diluido en 200 µl de DMSO con ayuda de vórtex, posteriormente se sonicaron con 15 pulsos de 30 segundos con descansos de 30 segundos y se tomaron alícuota de 80 µl para la fracción total (FT). Se centrifugaron por 15 minutos a 4300 rpm para separar la fracción soluble e insoluble. La fracción soluble se colocó en la columna (previamente equilibrada). Se lavó la columna con buffer Tris A y la proteína se eluyó con buffer Tris B.

La fracción insoluble se resuspendió con buffer de urea y se incubó a 12 rpm durante 1 hora, posteriormente se centrifugó a 10000 rpm por 15 minutos. El sobrenadante obtenido se colocó en la columna (previamente equilibrada). Se lavó con buffer de urea, buffer de urea + tritón 0.2% y buffer Tris A. La proteína se eluyó con buffer Tris B. Las eluciones obtenidas se concentraron utilizando un centricon y se procedió a correr un gel de poliacrilamida así como un western blot

RESULTADOS

Los productos de PCR digeridos se analizaron por su separación en geles de agarosa y se compararon los pesos de los diferentes dominios con el marcador de peso molecular (Figura 1.).

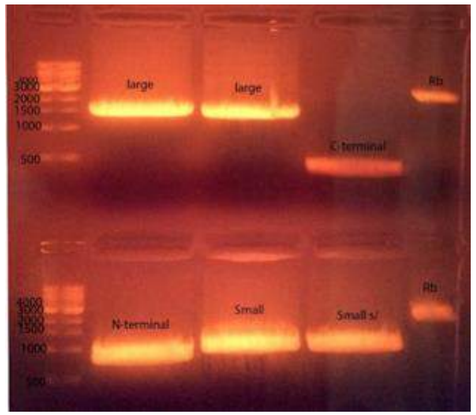


Figura 1. Bandas correspondientes al peso molecular de los diferentes dominios de RB

Para la realización de PCR de colonia se seleccionaron 4 colonias de cada dominio, en 2 de las 4 colonias seleccionadas se utilizaron los oligos Forward del dominio correspondiente (véase la tabla 1) y el oligo T7 terminador correspondiente al vector pET28a, para los otras 2 colonias se utilizaron los oligos T7 promotor y T7 terminador. Los productos de PCR se observaron en geles de agarosa (Figura 2a.).

Se corroboro las diferentes construcciones de los dominios en pET28 haciendo una digestión con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III al ADN plasmídico purificado en la Miniprep, dando positivo solamente para las clonas del dominio Small pocket (carril arriba: 8, 9, 10 y 11) con un tamaño de 1224 pb y Large pocket (carril abajo: 3, 4 y 5) con un tamalo de 1664 pb. El vector pET28a tiene un tamaño de 5369 pb (Figura 2b).

a) b)

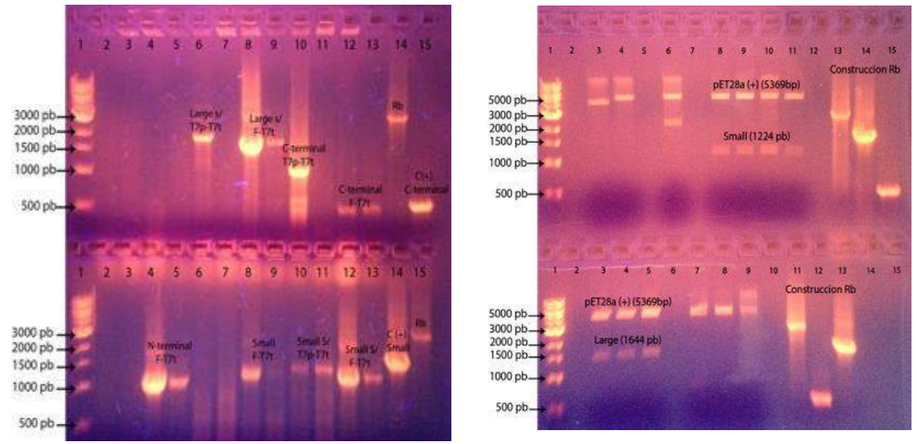


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa de PCR colonia y digestión de ADN plasmídico. a) Resultado de la PCR de distintas colonias. b) Bandas correspondientes a las clonas de los dominios Small pocket, Large pocket y el plásmido pET28. Carril 1: marcador de peso molecular; Carril 13-15 (arriba) y Carril 11-13 (abajo): RB amplificada con diferentes oligos.

Las eluciones solubles e insolubles de los dominios Small pocket y Large pocket fueron analizadas por western blot (Figura 3.).

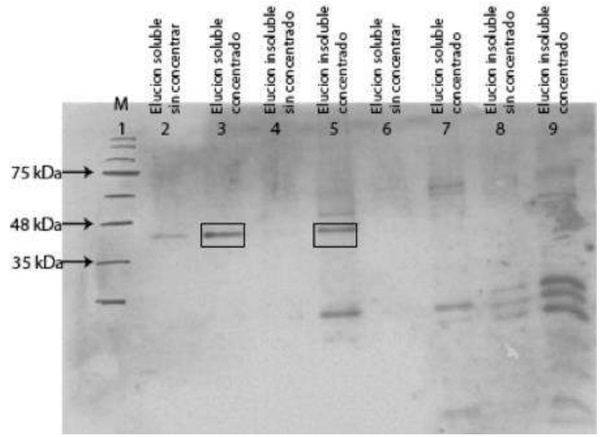


Figura 3. Bandas correspondientes a las eluciones de los dominios Small pocket y Large pocketl. Carril 1: marcador de peso molecular; Carril 2-5: eluciones del dominio Small pocket; Carril 6-9: eluciones del dominio Large pocket

En la figura 3 se aprecia una banda de aproximadamente 45 kDa en la elución soluble e insoluble concentrada correspondiente al dominio Small pocket.

CONCLUSIONES

En este trabajo experimental se logró la clonación, expresión y purificación del dominio Small pocket del supresor tumoral retinoblastoma en *Escherihica coli* BL21 DE3. Cabe recalcar que es necesario repetir los experimentos evaluando distintas condiciones de expresión para saber en cual se obtendría un mayor rendimiento para la producción de cada uno de los diferentes dominios de RB y así lograr una estandarización, esto será de gran ayuda para generar anticuerpos específicos para cada dominio.

Debido a que la proteina RB es uno de los principales controles del ciclo celular y esta alterada en diversos tipos de cáncer, siendo uno de los más importantes el retinoblastoma, la importancia de su estudio radica en la necesidad de comprender mejor el funcionamiento de esta proteína así como sus interacciones con otras proteínas de interés, esto permitirá en un futuro poder realizar un diagnóstico temprano de la enfermedad, por esto necesario obtener la proteína, así como sus dominios en grandes cantidades.

BIBLIOGRAFIA

Artículos de revista
RODRÍGUEZ, M., SALCEDO, M. (2005). "Perspectivas en la genómica del retinoblastoma: Implicaciones del gen supresor de tumor RB1" en *Investigación clinica,* Núm. 4, Vol. LVII, Julio-Agosto, [pp. 572-581].
ESPINOZA, M. (2011). "Retinoblastoma" en *Revista médica de costa rica y centroamérica,* Vol. LXVIII, [pp. 23-27].

LEE, W, BOOKSTEIN, R, HONG, F, YOUNG, L, SHEW, J, LEE, P. (1987). "Human Retinoblastoma Susceptibility Gene: Cloning, Identification, and Sequence" en *Science,* Vol. CCXXXV, [pp. 1394-1399].

WEINBERG, R.A. (1995). "The retinoblastoma protein and cell cycle control" en *Cell,* Vol. LXXXI, [pp. 323-330].

Artículos en línea
FONTELA, J.R, MASSANA, A, PELEGRÍN, A, ARANDA, A, BURÉS, A, FERRAN, M. (2004). "Retinoblastoma" en *La medicina hoy,* No. 1564, pp. 33-42. Consultada en http://apps.elsevier.es/watermark/ctl_servlet?_f=10&pident_articulo=13075068&pident_usuario=0&pcontactid=&pident_revista=1&ty=66&accion=L&origen=zonadelectura&web=www.elsevier.es&lan=es&fichero=1v68n1564a13075068pdf001.pdf (fecha de consulta 27-06-2016).

CERECEDO, F, LÓPEZ, E, RIVERA, H, ARIAS, J, RAMÍREZ, F, RODRÍGUEZ, M. (2003). "Supervivencia y aspectos clínicos del retinoblastoma" en *Anales de Pediatría,* No. 58, pp. 3-9. Consultada en http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1695403303779831 (fecha de consulta 9-07-2016).

Tesis doctoral
CHEMES, L. (2010). "La proteína supresora de tumores Retinoblastoma: caracterización de su dominio AB y mecanismo de interacción con la oncoproteína E7 del papilomavirus humano*"*. Doctorado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires

¿CÓMO REGULA LA EXPRESIÓN DE ALGUNOS FACTORES DE VIRULENCIA EL HONGO PATÓGENO *Candida glabrata*?

Diana Laura Santos Valente[1] e Irene Beatriz Castaño Navarro[2]

RESUMEN

La adherencia a las células epiteliales es una propiedad importante en la patogenicidad del hongo oportunista *Candida glabrata*. Esta propiedad depende en parte de los genes *EPA* que codifican para proteínas de pared celular La mayoría de estos genes están localizados en regiones subteloméricas, donde están regulados negativamente mediante silenciamiento subtelomérico. El silenciamiento en *C. glabrata* depende del complejo Sir, Rap1, Abf1, yKu70 y yKu80. Nosotros estamos interesados en un grupo de genes *EPA* que se encuentra en la región subtelomérica del cromosoma E de *C. glabrata.* En esta región subtelomérica se ha localizado un protosilenciador llamado Sil2126. El elemento Sil2126 contiene dos regiones esenciales para la actividad de silenciamiento y sitios putativos de unión para Abf1 y Rap1. Se sabe que Rap1 está unido a todo el protosilenciador cuando este elemento se encuentra cerca del telómero. Para delimitar el sitio de unión a Rap1, es necesario generar una mutación nula de Sil2126 y evaluarlo a una distancia donde no haya silenciamiento (-32 kb). En este trabajo nos enfocamos en generar la mutación nula.

ABSTRACT

Adherence to host cells is an important property in the pathogenicity of the opportunistic pathogen *Candida glabrata.* This property depends on *EPA* genes, which encode cell wall proteins that mediate this adherence. Most of these genes are localized to subtelomeric regions, where they are negatively regulated by subtelomeric silencing. The silencing in *C. glabrata* depends on Sir complex, Rap1, Abf1, yKu70 and yKu80. We are interested in a cluster of genes localized in the subtelomeric region of E chromosome of *C. glabrata.* In this subtelomeric region we have localized a protosilencer sil2126. This Sil2126 element contains two essential regions for silencing activity and also has putative binding sites for Abf1 and Rap1. It is known that Rap1 is bound to the whole protosilencer when this element is localized near of the telomere. To elucidate the Rap1 binding site within the Sil2126 element, it is necessary to generate a Sil2126 null mutation and evaluate it at a distance where there is no silencing (-32 kb). In this work we focused on generating this null mutation.

Palabras Clave: *Candida Glabrata*, protosilenciador, silenciamiento subtelomérico.

INTRODUCCIÓN

Entre los factores de virulencia que se han identificado en *Candida glabrata* se encuentra la capacidad que presenta para adherirse a las células epiteliales de su hospedero. Esta capacidad es mediada principalmente por proteínas de pared celular (adhesinas), algunas de las cuales son adhesinas funcionales (Epa1, Epa6 y Epa7). La mayoría de los genes *EPA* se encuentran localizados en regiones subteloméricas del genoma de *C. glabrata* y por lo tanto están controlados por una regulación negativa que depende de la estructura de la cromatina llamada silenciamiento subtelomérico. El silenciamiento subtelomérico en *C. glabrata* es una forma de represión de la transcripción que depende de Sir2, Sir3, Sir4, Rap1, yKu70, yKu80 y Rif1. Esta forma de represión se puede propagar largas distancias desde el telómero (hasta 20 kb) silenciando genes nativos, así como genes reporteros insertados en esas regiones. Estas proteínas se unen a secuencias de

[1]Instituto Tecnológico de Celaya, Departamento de Ingeniería Bioquímica; Calle Antonio Garcia Cubas 600 y Avenida Tecnológico, Alfredo V. Bonfil, C.P: 38010 Celaya, Gto., laurasantos_@hotmail.es
[2]Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, División de Biología Molecular; Camino a La Presa de San José 2055, Lomas 4 sección, C.P: 78216, San Luis, S.L.P., icastano@ipicyt.edu.mx

DNA específicas capaces de mediar silenciamiento y extender su influencia. Este tipo de secuencias que actúan en cis se han descrito y caracterizado en *C. glabrata*. En el brazo derecho del cromosoma E se ha encontrado un elemento que actúa en cis, el protosilenciador llamado Sil2126, el cual sólo es activo en su telómero nativo, lo que sugiere que requiere otras secuencias dentro de esa región para su actividad. Sil2126 contiene dos regiones esenciales para la actividad de silenciamiento y se han encontrado dos sitios putativos de unión, uno para Rap1 y otro para Abf1. La presencia de estos sitios putativos de unión sugiere que Sil2126 podría funcionar mediante el reclutamiento de Abf1 y posiblemente de Rap1. Rap1 está unido a todo el protosilenciador Sil2126 cuando este elemento se encuentra en su telómero nativo. Sin embargo, en esta región no es posible saber cuál es el sitio putativo de unión a Rap1, para ello necesitamos evaluar a Sil2126 fuera del contexto de silenciamiento en ausencia de la copia original para poder delimitar el sitio de unión. En este trabajo nosotros generamos una mutación nula del protosilenciador Sil2126 para posteriormente evaluarlo a una distancia donde no haya silenciamiento.

MÉTODOS Y MATERIALES

Cepa 2101 de *Escherichia coli*

Cepa 3111 de *Candida glabrata*

Plásmido pAJ25

Oligonucleótidos

Todos los oligonucleótidos utilizados se describen en la Tabla. 1.

Tabla. 1. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

# oligo	Secuencia 5' a 3'
15	CGATAAGAGGCCACGTGCTTTATG
16	CCTCTATATCGTGTTCGTGCGTATTTCT
342	CAGGTTTTGGGTCCTCAGGTTTTGG
343	CACTAGTACTGGCTATCATTACAC

Medio

Las levaduras se crecieron en medio YPD. Se prepararon medios para levadura como se describe (Sherman et al. 1986), y se añadió 2% de agar para preparar cajas. El medio YPD contiene 10 g/litro de extracto de levadura, 20 g/litro de peptona, suplementado con glucosa al 2%. Cuando fue requerido, las cajas de YPD se complementaron con 500 µg / ml de higromicina. Las bacterias crecieron en medio LB como se describe (Ausubel *et al.* 2001). El medio LB contiene 5 g/litro de extracto de levadura, 10 g/litro de triptona, 5g/litro de NaCl.

Transformación de levaduras

Para la transformación de levaduras utilizamos el plásmido pAJ25 el cual es contiene el marcador de resistencia a higromicina y contiene regiones homólogas adyacentes al Sil2126. Extrajimos ADN plasmídico de la cepa 2101 de *E. coli* utilizando el kit Miniprep QIAgen® y posteriormente se llevó a cabo una digestión con la enzima *Bcg*I para transformar *C. glabrata* par inducir recombinación homóloga de las secuencias transformadas con el locus del cromosoma y así obtener una mutante del protosilenciador Sil2126. Para confirmar que la digestión se llevó a cabo correctamente se realizó una electroforesis para observar el tamaño del fragmento esperado (figura 3).

Selección de las transformantes higromicina resistente

Para la selección de las transformantes higromicina resistentes se plaquearon 100, 200 y 300 µL de la transformación más un control negativo en cajas YPD con higromicina y se incubaron a 30°C por 48 horas. Después de este periodo de incubación se llevaron a cabo dos procesos de purificación con el objetivo de aislar colonias individuales.

Reacciones de PCR

Para verificar que se ha producido la recombinación homóloga, se extrajo DNA genómico de la posibles transformantes y se llevaron a cabo tres reacciones de PCR en cada colonia purificada. Para la primera reacción se utilizó un oligonucleótido dentro del cassete de higromicina y otro oligonucleótido en el genoma de *C. glabrata* fuera del fragmento 5' clonado que se recombina, esperando que se amplificara un fragmento de 1139 pb (oligonucleótidos 16 y 342, véase la Tabla. 1 y la Fig. 2 abajo). La segunda reacción de PCR se realiza utilizando otro oligonulceótido dentro del cassete de higromicina y otro fuera del fragmento 3' que recombinó, esperando que se amplificara un fragmento de 1026 pb (cebadores 15 y 343, ver Fig. 2 abajo). Para la tercera reacción de PCR se utilizan los oligonucleótidos fuera de los fragmentos 5' y 3' que recombinaron, con la amplificación de un fragmento de 4109 pb.

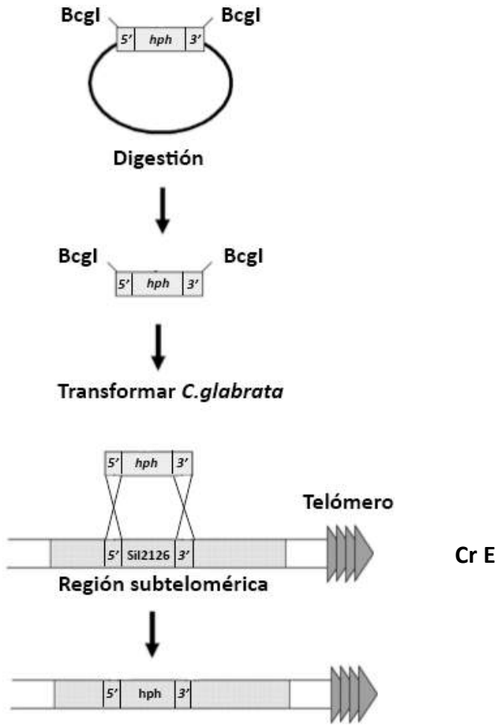


Figura 1. Recombinación homóloga del cassete de higromicina en la región subtelomérica del cromosoma E de C. glabrata. El ADN plasmídico se extrae de las cepas que contienen el cassete de higromicina. El plásmido se digiere con la enzima BcgI que corta 10 nucleótidos después del sitio de reconocimiento en el extremo 5´ y 12 nucleótidos después en el extremo 3' para dirigir la integración del fragmento en el locus correcto por recombinación homóloga. La mezcla de ADN digerido se utiliza para transformar C. glabrata directamente y seleccionar a las transformantes resistentes a higromicina.

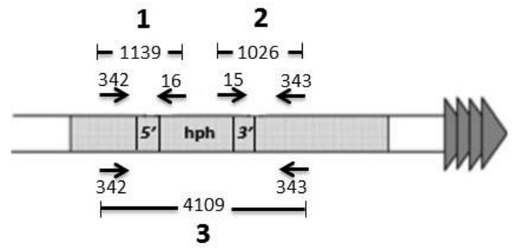


Figura 2. Reacciones de PCR. Para verificar que la integración se produjo en el lugar deseado en el genoma de C. glabrata se llevaron a cabo tres reacciones de PCR en cada colonia purificada, utilizando oligonucleótidos dentro del cassete de higromicina y fuera de los fragmentos 5' y 3' que recombinaron.

RESULTADOS

Se corroboró que la enzima *Bcg*I generó los cortes en los sitios de reconocimiento mediante una electroforesis en gel de agarosa

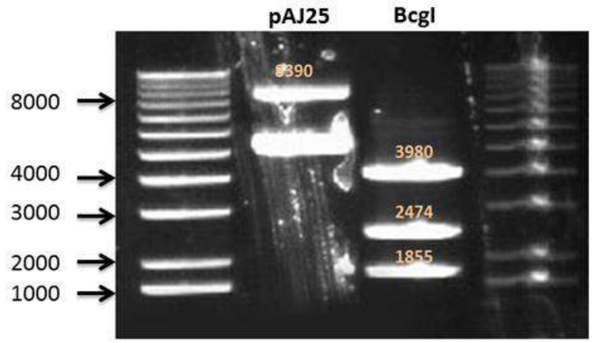


Figura 3. Digestión del plásmido pAJ25 con la enzima Bcg*I*. Carril 1: marcador de peso molecular; Carril 2: plásmido sin digerir; Carril 3: plásmido digerido. A pesar de que el plásmido no se digirió con ninguna enzima de restricción se observa que se forman dos bandas. Esto se debe a las distintas conformaciones que presenta el plásmido de acuerdo al grado de superenrollamiento. En el carril 3 se observa el fragmento correspondiente al cassete de higromicina (3980 pb).

Para confirmar que el cassete de higromicina se integró en el lugar correcto en el genoma de *C. glabrata* se realizaron tres reacciones de PCR.

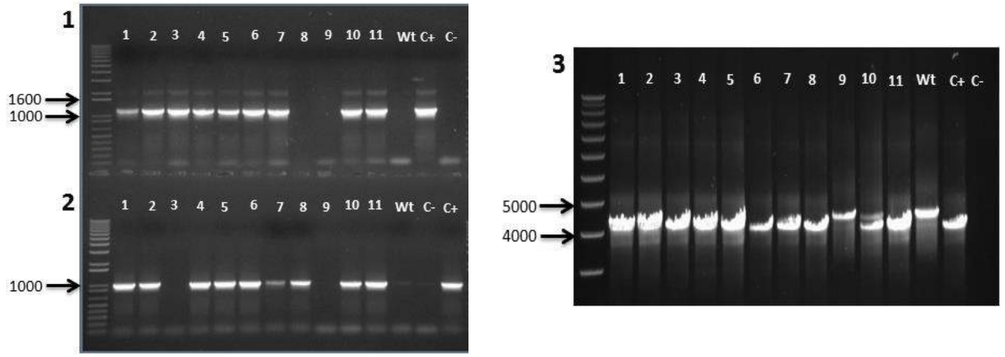


Figura 4. Diagnostico por PCR de las transformantes higromicina resistente. Para la primera reacción, la mayoría de los productos de PCR amplificaron fragmentos del mismo tamaño (1139 pb) con excepción de la muestra 8 y 9 en donde no hubo amplificación lo que indica que alguno de los oligos (o los dos) no encontró la secuencia complementaria a la cual alinearse. En la segunda reacción se puede observar que la mayoría de los productos de PCR amplificaron un fragmento de 1026 pb con excepción de la muestra 3 y 9 en donde no hubo amplificación. En la tercera reacción de PCR se amplificó un fragmento de 4109 pb y se comparó con el tamaño del fragmento que amplificó en la silvestre. En la silvestre el fragmento amplificado es de mayor tamaño (4543 pb) por lo tanto se espera que las colonias que tienen el cassete de higromicina integrado en su genoma amplifiquen fragmentos por debajo de 4543 pb. En total, 8 colonias tenían integrado el cassete de higromicina en su genoma.

CONCLUSIONES

Hemos generado una mutación nula del elemento protosilenciador Sil2126 utilizando un plásmido knock out con el objetivo de eliminar completamente el protosilenciador del genoma de *C. glabrata* e integrar el cassete de higromicina por recombinación homóloga. Después de la mutación nula, en experimentos futuros, queremos integrar el protosilenciador con algunas deleciones a una distancia donde no haya silenciamiento y evaluarlas por medio de un ensayo de Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP) para poder determinar las secuencias de DNA en la cromatina a los que se une Rap1 utilizando oligonucleótidos en el protosilenciador. Esto nos ayudará a entender la actividad de silenciamiento que presenta Sil2126.

BIBLIOGRAFIA

Artículos de revista

JUÁREZ-REYES, A., RAMÍREZ-ZAVALETA, C., MEDINA-SÁNCHEZ, L., DE LAS PEÑAS, A., CASTAÑO, I. (2012). "A Protosilencer of Subtelomeric Gene Expression in *Candida glabrata* with Unique Properties" en *Genetics*, Vol. **190**, Enero 2012, [pp. 101-111].

GALLEGOS-GARCÍA, V., PAN, SJ., JUÁREZ-CEPEDA, J., RAMÍREZ-ZAVALETA, C., MARTIN-DEL-CAMPO, M., MARTÍNEZ-JIMÉNEZ, V., CASTAÑO, I., CORMACK, B., DE LAS PEÑAS, A. (2012). "A Novel Downstream Regulatory Element Cooperates with the Silencing Machinery to Repress *EPA1* Expression in *Candida glabrata*" en *Genetics*, Vol. **190**, Abril 2012, [pp. 1285–1297].

CASTAÑO, I., CORMACK, B., DE LAS PEÑAS, A. (2006). "Virulencia del hongo patógeno oportunista *Candida glabrata*" en *Revista Latinoamericana de Microbiología*, Núm. 2 Vol. XLVIII, Abril–Junio 2006, [pp. 66–69].

CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA A ESTRÉS OXIDANTE EN EL HONGO PATÓGENO OPORTUNISTA CANDIDA GLABRATA

Misael Segura Serrano[1] y Alejandro de las Peñas Nava[2]

RESUMEN

C. glabrata, es una levadura patógena oportunista que causa daños en el organismo bajo ciertas condiciones, muestra alta resistencia a estrés oxidante en especial al H_2O_2, por ello su importancia de estudio la cual nos ayude a entender la manera de combatir este microorganismo, ya que dicha levadura es filogenéticamente más cercana al hongo *S. cerevisiae* que a otras especies del genero candida, se realizó de manera experimental una expresión heteróloga del gen *CgCTA1* en *S. cerevisiae,* y observar si de verdad este gen confiere mayor resistencia a estrés oxidante, dicho gen codifica para la enzima catalasa la cual degrada al peróxido de hidrogeno.

ABSTRACT

C. glabrata is an opportunistic pathogenic yeast that causes damage to the body under certain conditions, shows high resistance to oxidative stress in particular the H2O2, so its important study which helps us understand how to combat this microorganism, and said yeast is phylogenetically nearest the fungus *S. cerevisiae* candida species other genre, was performed experimentally *CgCTA1* a heterologous gene expression in *S. cerevisiae*, and see if this gene confers real greater resistance to oxidative stress, said gene coding for the enzyme catalase which degrades the hydrogen peroxide.

Palabras clave: patógeno; estrés oxidante; filogenia; *S. cerevisiae;* expresión heteróloga

INTRODUCCIÓN

Candida glabrata es un importante patógeno oportunista que se encuentra también como comensal en mucosas del tracto gastrointestinal, genitourinario y orofaringe. Su genoma está completamente secuenciado y está organizado en 13 cromosomas. *C. glabrata* es la segunda especie más común que causa candidiasis después de *C. albicans* (Trick *et al.,* 2002, Almirante *et al.,* 2005). *C. glabrata* es un organismo eucarionte y está clasificado de la siguiente manera: Eukaryota; Fungi/grupo Metazoa; Fungi; Dirkaya; *Ascomycota*; *Saccharomycotina; Saccharomycetes; Saccharomycetales; Saccharomycetales mitosporico; Candida.* La especie-forma *C. glabrata* se clasifico inicialmente como *Cryptococcus glabratus* por Anderson en 1917 y se reclasifico en 1938 como *Torulopsis glabrata* (van der Walt *et al.,* 1978). *C. glabrata* es una levadura que forma colonias lisas de consistencia blanda y de color crema, mide aproximadamente de 1 a 4 µm y es más pequeña que *C. albicans* que mide de 4 a 6 µm y que *S. cerevisiae* que mide de 5 a 10 µm (Fidel *et al.,* 1999). Presentan formas individuales ovoides y en condiciones de limitación de nitrógeno se ha demostrado que es capaz de formar pseudohifas o pseudomicelio (Csank y Haynes, 2000). La gemación es multilateral, no produce capsula ni artrosporas, y tampoco se han descrito esporas sexuales (Csank y Haynes, 2000). Filogenéticamente *C. glabrata* se ubica dentro del clado cercano a *S. cerevisiae,* levadura no patógena.

Una especie reactiva de oxigeno o radical libre, hace referencia a una molécula o átomo, que tienen en su orbital externo un electrón no apareado, es por este electrón no apareado que los radicales libres son muy

[1] Instituto Tecnológico Superior de Purísima del Rincón, Ing. Bioquímica, Blvd. Del valle #2301 Guardarrayas, C.P: 36413, Purísima del Rincón, Guanajuato, m_i_s_a_131@hotmail.com
[2] Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, Biología Molecular, Camino a la presa San José #2055 lomas 4ª. Sección, C.P: 78216, San Luis Potosí, San Luis Potosí, cano@ipicyt.edu.mx

inestables y altamente reactivos. Las Especies Reactivas de Oxigeno (ERO) incluye, el oxígeno singulete, también el anión superoxido (O_2^-), el peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^-) (Balaban *et al.,* 2005). El peróxido de hidrogeno, H_2O_2, además de ser una Especie Reactiva de Oxigeno, puede funcionar como molécula de señalización debido a su estabilidad (ya que no se considera radical libre) y puede inducir modificaciones en las proteínas.

El H_2O_2 en humanos, está directamente implicado en la regulación fisiológica de la transducción de señales mediante la activación de receptores de factores de crecimiento (Valko *et al.,* 2007). Las catalasas o hidroperoxidasas son metaloenzimas capaces de degradar el H_2O_2 a agua y oxigeno molecular.

La localización intracelular de catalasa de *C. glabrata* depende de condiciones de estrés nutricional ya que en fuentes de carbono no fermentables y en presencia de estrés oxidativo la catalasa se acumula en los peroxisomas, sin embargo, a bajas concentraciones de H_2O_2 la catalasa se encuentra en el citoplasma (Roetzer *et al.,* 2009). La catalasa ha sido considerado un factor de virulencia en bacterias patógenas, tales como *Edwardsiella tarda* (Srinivasa Rao *et al.,* 2003). La catalasa de *C. glabrata* (*CgCTA1*) se induce dentro de los macrófagos (Roetzer *et al.,* 2009), sin embargo, la mutante en *CTA1* no mostro efecto en la virulencia en un modelo murino de infección sistémica (Cuellar-Cruz *et al.,* 2008).

En condiciones específicas de estrés oxidativo, *S. cerevisiae* activa un programa de expresión génica controlado principalmente por los factores de transcripcionales Yap1p, Skn7p, Msn2p y Msn4p. además, para reparar el daño celular, se arresta el ciclo celular dependiente del factor Rad9p (Flattery-O'Brien y Dawes, 1998). La respuesta transcripcional al estrés oxidativo de *C. glabrata* está regulada principalmente por los factores transcripcionales: Yap1p, Skn7p, Msn2p y Msn4p (Cuellar-Cruz *et al.,* 2008, Roetzer *et al.,* 2008, Roetzer *et al.,* 2009) tanto en fase exponencial como en fase estacionaria.

Bacterias y hongos en fase estacionaria son más resistentes a estrés oxidativo que las células en fase logarítmica, ya que en fase estacionaria la célula deja de dividirse y la actividad metabólica se reduce. Debido a esto la célula activa vías metabólicas para usar fuentes de carbono no fermentables y genes que codifican para enzimas antioxidantes como catalasas, superoxido dismutasas y síntesis de glutatión en respuesta a estrés oxidativo (Jakubowski *et al*., 2000, Cyme *et al.,* 2003). Por ejemplo, *C. glabrata* es capaz de sobrevivir a altas concentraciones de H_2O_2 *in vitro,* hasta 1000 mM en fase estacionaria y en fase exponencial hasta 100 mM. Esta resistencia es mediada por la única catalasa Cta1p (Cuellar-Cruz *et al.,* 2008).

MATERIALES Y MÉTODOS

Extracción de plásmido

Inoculamos nuestras cepas de *E.coli* que contenían el plásmido pCV27 (*CgCTA1* con regiones reguladoras de *S. cerevisiae* y el marcador de selección *URA3*). Una vez realizado esto extrajimos el plásmido, colectamos pellet después de centrifugar 2 veces 1.5ml de cultivo bacteriano, posteriormente resuspendimos el pellet en 600 µl de agua estéril, después adicionamos 100 µl de buffer de lisis, mezclamos por inversión de 4 – 7 veces delicadamente y dejamos lisar las muestras por 1 – 2 min Una vez hecho esto adicionamos 350 µl de buffer de neutralización frio, mezclamos por inversión por 1 min hasta que se neutralice completamente (la muestra se vuelve amarilla y hay precipitación), centrifugamos a 13000 rpm por 2 min después transferimos el sobrenadante a una columna, decantamos contenido, nuevamente centrifugamos a 13000 rpm por 2 min descartamos liquido de tubo colector y colocamos el tubo colector nuevamente con su columna, posteriormente adicionamos 200 µl de buffer endo-wash a la columna, después centrifugamos a 13000 rpm por 1 min quitamos líquido y colocamos el tubo colector nuevamente, una vez hecho esto adicionamos 400 µl de buffer zyppy wash a la columna, centrifugamos a 13000 rpm de 3 – 3.5 min para así asegurarnos que la muestra ya no contenga etanol, después transferimos la columna a tubo de microcentrifugado, después adicionamos 50 µl de buffer de elución/Tris 10 mM/TE caliente, dejamos 1 min a temperatura ambiente o en termoblock, y finalmente centrifugamos a 13000 rpm por 1 min para eluir el DNA plasmidico.

Para comprobar que si extrajimos el plásmido realizamos una electroforesis en gel de agarosa 0.8%.

Transformación en levadura

Inoculamos en 5 ml de YPD la cepa a transformar (*S. cerevisiae* wt, cta1Δ, ctt1Δ, cta1Δ ctt1Δ), después incubamos a 28°C, con agitación toda la noche (12 h aprox.) a demás incluimos un control sin inoculo, posteriormente inoculamos 30 ml de YPD con 400 µl de cultivo crecido toda la noche, lo dejamos en agitación a 28°C hasta que alcance 0.6-1.0 OD_{600} (tarda 3 h Aprox.), para tomar la densidad óptica diluimos la muestra con 500 µl de inoculo y 500 µl de YPD y ahora si leer a 600 nm, una vez hecho esto transferimos la muestra a tubos falcón y centrifugamos a 3500 rpm por 5 min y desechamos el sobrenadante, posteriormente realizamos un lavado, adicionamos 30 ml de agua estéril, centrifugamos a 3500 rpm por 5 min, desechamos el sobrenadante, una vez hecho el lavado adicionamos 1 ml de LiOAc 0.1M para resuspender la pastilla, agitamos en vortex, después transferimos a tubo ependorf, posteriormente centrifugamos por 30 s y desechamos el sobrenadante, después resuspendemos en 300 µl de LiOAc 0.1M con ayuda de vortex, una vez hecho esto transferimos 50 µl en cada tubo ependorf (1 tubo por cada DNA + 1 control sin DNA), después adicionamos la mezcla de transformación a cada tubo (en orden exacto) al control añadimos TE, en lugar de DNA plasmidico.

Mezcla de transformación:
-240 µl de PEG 50%
-36 µl de LiOAC 1M
-25 µl de ssDNA de esperma de salmón 2mg/ml (precalentado a 100°C por 5 min)
-50 µl de DNA plasmidico

Una vez realizado el paso anterior, agitamos en vortex hasta que se mezcle bien, posteriormente incubamos "in roller" a 28°C por 45 min, después adicionamos 43 µl de DMSO (para una mejor eficiencia de transformación) a cada tubo y agitamos un poco en vortex, consiguientemente sometemos a un choque térmico en un bloque de 42°C por 15 min después centrifugamos por 30 s para quitar el PEG (desechamos el sobrenadante), una vez hecho esto añadimos 600 µl de agua estéril y resuspendemos, después plateamos 300 µl e incubamos a 30°C.

Goteos

Hicimos un preinoculo, en tubos de ensaye con 5 ml de medio CAA preparamos un inoculo con cada una de las cepas y sus respectivos controles negativos y lo incubamos en roller a 33°C (cultivo ON). Posteriormente preparamos una dilución agregando 50 µl del cultivo ON en matraces con 50 ml de medio CAA y lo dejamos en agitación (shaker) a 28°C por 48h. posteriormente apartamos 4 ml del cultivo para ajustar una OD 0.5 y el resto del cultivo lo decantamos a tubos falcon y centrifugamos a 3500rpm por 5 min y conservamos el sobrenadante (realizamos esto dos veces), una vez hecho esto transferimos 5ml del sobrenadante a tubos de vidrio e hicimos una dilución con la cantidad suficiente de células para ajustar la OD 0.5, posteriormente agregamos las diferentes concentraciones de H_2O_2 y medimos la OD, una vez hecho esto, lo dejamos en tratamiento por 3h y medimos la OD y la ajustamos a 1, posteriormente resuspendimos en agua para realizar las diluciones seriadas en placas de 96 pozos, y ahora si con el replicator realizar los goteos.

RESULTADOS

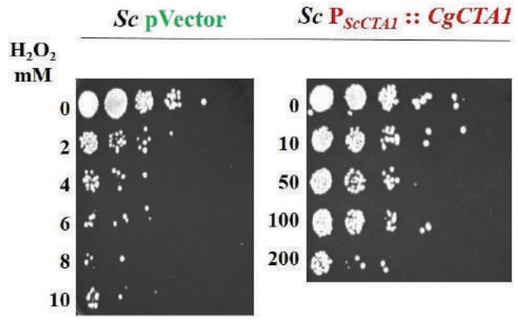


Figura 1. Cepa WT

En la figura 1. vemos la cepa WT de *S. cerevisiae,* del lado izquierdo contiene únicamente sus dos catalasas endógenas mientras que el lado derecho, además de sus dos catalasas endógenas tiene también una exógena perteneciente a *C.glabrata* y observamos como la resistencia al H_2O_2 efectivamente aumenta en la cepa que se transformó con *CgCTA1.*

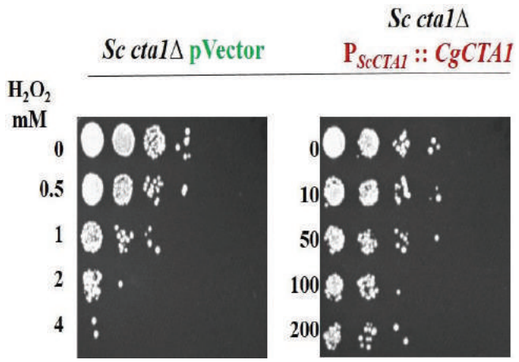


Figura 2. Cepa mutante en cta1

En la figura 2. Vemos la cepa mutante en cta1, del lado izquierdo únicamente se tiene una catalasa endógena y observamos que si hay un decremento en la resistencia a H_2O_2, del lado derecho, se tiene una catalasa endógena y la exógena de *C. glabrata* y podemos ver que la cepa transformada sigue teniendo gran resistencia a H_2O_2.

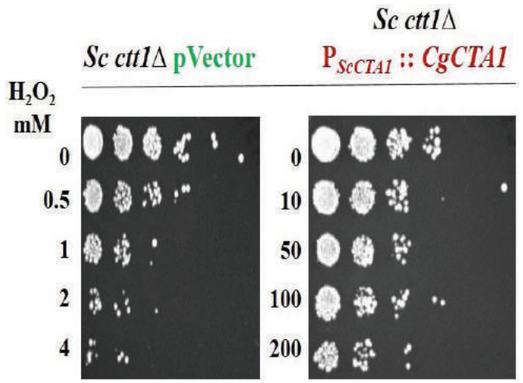


Figura 3. Cepa mutante en ctt1

En la figura 3. Vemos la cepa mutante en ctt1, del lado izquierdo únicamente se tiene una catalasa endógena y observamos que si hay un decremento en la resistencia a H_2O_2, del lado derecho, se tiene una catalasa endógena y la exógena de *C. glabrata* y podemos ver que la cepa transformada sigue teniendo gran resistencia a H_2O_2.

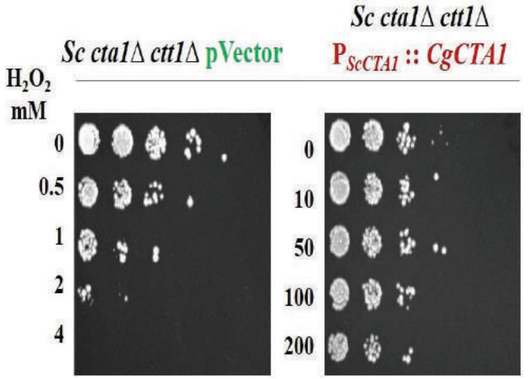


Figura 4. Cepa mutante en cta1 y ctt1

En la figura 4. Vemos la doble mutante, en la cual del lado izquierdo tenemos la cepa sin ninguna catalasa, y en comparación a las mutantes sencillas, si decreció un poco más la resistencia al H_2O_2., mientras que del lado derecho en la cual solo se tiene la catalasa exógena perteneciente a *C. glabrata* observamos que aún sigue teniendo bastante resistencia al H_2O_2. Como si tuviera las tres catalasas.

CONCLUSIONES

Como se puede observar en los resultados vemos que la catalasa es esencial para la resistencia a estrés oxidante, además que el gen *CgCTA1* si confiere más resistencia a peróxido de hidrogeno en *S. cerevisiae.*

BIBLIOGRAFÍA

Almirante B, Rodriguez D, Park BJ, Cuenca-Estrella M, Planes AM, Almela M, Mensa J, Sanchez F, Ayats J, Gimenez M, Saballs P, Fridkin SK, Morgan J, Rodriguez-Tudela JL, Warnock DW, Pahissa A

(Epidemiology and predictors of mortality in cases of Candida bloodstream infection: results from population-based surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. J Clin Microbiol 43:1829-1835.2005).

Balaban RS, Nemoto S, Finkel T (Mitochondria, oxidants, and aging. Cell 120:483-495.2005).

Csank C, Haynes K (Candida glabrata displays pseudohyphal growth. FEMS Microbiol Lett 189:115-120.2000).

Cuellar-Cruz M, Briones-Martin-del-Campo M, Canas-Villamar I, Montalvo-Arredondo J, Riego-Ruiz L, Castano I, De Las Penas A (High resistance to oxidative stress in the fungal pathogen Candida glabrata is mediated by a single catalase, Cta1p, and is controlled by the transcription factors Yap1p, Skn7p, Msn2p, and Msn4p. Eukaryot Cell 7:814-825.2008).

Cyme L, Martins L, Fernandes L, Marinho HS (Regulation of antioxidant enzymes gene expression in the yeast Saccharomyces cerevisiae during stationary phase. Free Radic Biol Med 34:385-393.2003).

Fidel PL, Jr., Vazquez JA, Sobel JD (Candida glabrata: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to C. albicans. Clin Microbiol Rev 12:80-96.1999).

Flattery-O'Brien JA, Dawes IW (Hydrogen peroxide causes RAD9-dependent cell cycle arrest in G2 in Saccharomyces cerevisiae whereas menadione causes G1 arrest independent of RAD9 function. J Biol Chem 273:8564-8571.1998).

Jakubowski W, Bilinski T, Bartosz G (Oxidative stress during aging of stationary cultures of the yeast Saccharomyces cerevisiae. Free Radic Biol Med 28:659-664-2000).

Roetzer A, Gratz N, Kovarik P, Schuller C (Autophagy supports Candida glabrata survival during phagocytosis. Cell Microbiol.2009).

Roetzer A, Gregori C, Jennings AM, Quintin J, Ferrandon D, Butler G, Kuchler K, Ammerer G, Schuller C (Candida glabrata environmental stress response involvers Saccharomyces cerevisiae Msn2/4 orthologous transcription factors. Mol Microbiol 69:603-620.2008).

Srinivasa Rao PS, Yamada Y, Leung KY (A major catalase (KatB) that is required for resistance to H2O2 and phagocyte-mediated killing in Edwardsiella tarda. Microbiology 149:2635-2644.2003).

Trick WE, Fridkin SK, Edwards JR, Hajjeh RA, Gaynes RP (Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989-1999. Clin Infect Dis 35:627-630.2002).

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J (Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol 39:44-84.2007).

Van der Walt JP, Johannsen E, Yarrow D (Torulopsis geochares and Torulopsis azyma, two new, haploid species of ascomycetous affinity. Antonie Van Leeuwenhoek 44:97-104.1978).

ESTANDARIZACIÓN DE UNA qPCR DÚPLEX DEL COCIENTE ADN GENÓMICO-MITOCONDRIAL EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO DEL CEREBRO DE RATÓN

Estefanía Tavares Flores[1] y Anaid Antaramian Salas[2]

RESUMEN

A lo largo del ciclo celular, la cantidad de mitocondrias en el citoplasma cambia de manera dramática de acuerdo a la demanda de energía requerida. Por lo tanto, la relación entre el número de copias disponibles del genoma mitocondrial y nuclear muestra un dinamismo. El objetivo del presente proyecto fue establecer una estandarización para una qPCR Dúplex del cociente mtADN y el gADN por la amplificación de las regiones conservadas F1E2 y PtgS2 de los genomas anteriormente citados, respectivamente, utilizando las sondas fluorescentes FAM y JOEN. Las pruebas se llevaron a cabo en un gradiente de concentraciones de DNA total extraído del telencéfalo de una cría de ratón encontrándose en el estadío 13.5 de la etapa embrionaria.

ABSTRACT

Throughout the cellular cycle, the total number of mitochondria in the cytoplasm is changing in a dramatic way and it depends of the demand of energy in the cellular metabolism. Thus, the proportion between the number of copies of mitochondria genomes and nuclear genomes is in constant change. In this work, we established a standardization of qPCR Duplex for the ratio of mtADN and gADN with the specific amplification of the conserved regions F1E2 and PtgS2 of the last genomes respectively, with fluorescent probes FAM and JOEN. The tests were taking in a gradient of DNA concentrations from cerebrum of mouse in the day 13.5 of embryonic development.

Palabras Clave: qPCR-Dúplex, mitocondria, F1E2, PtgS2, Telencéfalo

INTRODUCCIÓN

Se sabe que existen cientos de mitocondrias por célula animal, y en cada organelo existen varias copias del genoma mitocondria, que comprende casi el 1% de longitud en comparación con el genoma nuclear, en la mayoría de los casos (Lewin, 2004). Cabe mencionar que, a lo largo del ciclo celular el número de mitocondrias presentes en el citoplasma de una célula se encuentra afectado por la demanda interna energética de la célula a través del tiempo. En este proyecto, el objetivo principal se centró en determinar la proporción entre el número de copias de ADN mitocondrial (mtDNA) y ADN genómico (gADN), en el estadío 13.5 de la vida embrionaria en un modelo de ratón, mediante el desarrollo de una curva estándar.

Para medir el nivel de expresión, se utilizaron dos regiones conservadas de ambos genomas. Se utilizó la región F1E2, que es un conjunto de secuencias conservadas a lo largo del genoma mitocondrial (Brandstätter, Niederstätter, Pavlic, Grubwieser, & Parson, 2007), y el gen ortólogo PtgS2, que expresa una enzima clave en la biosíntesis de prostanoides en humanos y ratones (Li, y otros, 2013). La

[1] [1]Universidad Autónoma De Coahuila, Facultad de Ciencias Biológicas; Carretera Torreón-Matamoros Km. 7.5. Ciudad Universitaria. C.P. 27276. Torreón, Coahuila; fannytav@gmail.com
[2] [2]Instituto de Neurobiología, Unidad de Proteogenómica, Boulevard Juriquilla #3001, C.P. 76230, UNAM-Campus Juriquilla, Querétaro Qro. México; antaramian@unam.mx

cuantificación de la expresión se monitoreó por medio de una qPCR-Dúplex utilizando dos primers específicos, las secuencias se muestran en la **Tabla 1**.

Para obtener las muestras adecuadas para la detección molecular se necesitó extraer material genético con un alto grado de pureza. Por lo cual, se utilizó un kit de extracción de ácidos nucleicos PROMEGA™ para procesar el tejido y consecuentemente se purificó con un tratamiento de Fenol-Cloroformo. Para corroborar la integridad del ADN extraído, se pasó a hacer una digestión con la enzima de restricción palindrómica HindIII (Hemophilus influenzae), que tiene una frecuencia de corte moderada y una longitud de 6 nucleótidos (Solari, 2004).

MÉTODOS Y MATERIALES

Obtención de la muestra

Se sacrificó un ratón hembra de 13.5 días de gestación por dislocación cervical, sacrificándose los embriones obtenidos, de los cuales se eligió uno para su consecuente decapitación y extracción del tejido telencéfalo. Almacenándose a 4 °C.

Extracción de DNA total con kit Promega™

En un tubo eppendorf de 1.5 mL se colocó alrededor de 60 mg de telencéfalo con 600 mL de solución de lisis previamente enfriada y se homogenizó por vórtex por 3 minutos. Posteriormente, la muestra se incubó en un baño seco a 65 °C, se añadió 3 mL de la enzima ARNasa, se homogenizó y se incubó una vez más a 37 °C por 15 minutos. Luego se agregaron 200 uL de solución de precipitación de proteínas, incubándose 5 min en hielo y se mezcló por inversión. Se prosiguió con una centrifugación a 13000 rpm por 10 minutos. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo con 600 uL de isopropanol y se mezcló cuidadosamente por inversión. Se centrifugó a 13000 rpm por 1 minuto. Se descartó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 600 uL de etanol al 70% muy frío. Se volvió a centrifugar a 13000 rpm por 1 min. Se tiró el sobrenadante de etanol y se dejó secar la pastilla a 37 °C por 50 minutos. Se resuspendió la pastilla en 50 uL de agua libre de nucleasas y se incubó otros 5 minutos a 65 °C en un baño seco. Se procesaron de esta forma 2 telencéfalos de hembras distintas (2 y 3).

Purificación de DNA total por tratamiento con Fenol-Cloroformo

A las extracciones anteriores se les agregó un mismo volumen de fenol-cloroformo, se mezcló por inversión y se centrifugó a 10000 rpm por 3 min. Luego se agregó 1 volumen más de cloroformo, se mezcló por inversión (alrededor de 4 veces) y se centrifugó a 13000 rpm por 4 min. Cuidadosamente se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo, teniendo precaución se sólo acarrear el volumen de cloroformo. Se añadió 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M pH 5.3 y 3 volúmenes de etanol al 100%. Se mezcló por inversión y se incubó a -80 °C por 30 min. Se centrifugó a 13000 rpm por 10 min y se descartó el sobrenadante. Se lavó la pastilla con etanol al 70%, se centrifugó una vez más a 13000 rpm por 1 min y se descartó el sobrenadante. Se dejó secar la pastilla por 30 min a temperatura ambiente. Se resuspendió la pastilla en agua libre de nucleasas y se incubó por 10 min a 37 °C.

Cuantificación de DNA total en NanoDrop

Se midió la concentración y la pureza de las muestras extraídas a través del sistema NanoDrop de Thermo Scientific™ que mide la absorbancia de los ácidos nucleicos a una longitud de onda de 230 nm, en la cual presentan una mayor absorbancia. Se utilizó como blanco agua libre de nucleasas y se prosiguió a medir con una alícuota de 1.5 uL de muestra. Los resultados se muestran en la **Tabla 2**.

Digestión con enzima Hind III

Para corroborar la integridad de los ácidos nucleicos extraídos, se prosiguió con una digestión casera utilizando la enzima de restricción Hind III. En un tubo eppendorf de 600 uL se preparó el mix para la reacción de dos digestiones, de la siguiente manera: Se agregaron 4 uL de Buffer 5x, 2 uL de enzima de restricción y 30 uL de agua libre de nucleasas. De este stock se repartió en dos alícuotas de 18 uL en dos tubos nuevos, al cual además se le añadió 2 uL de muestra. Se incubaron a 37 °C por 1 h. Y finalmente se corrió un gel de electroforesis de 30 mL de 0.5x de TBE y 1% de Agarosa, a 100 Volts por 1 h. Ambas muestras se cargaron al gel en una proporción de 3:2 con el Buffer de Carga. En el primer carril se cargó una mezcla de 2:2 con el marcador de peso molecular de 1Kb “PROMEGA”. Los resultados se muestran en la Figura 1.

Estandarización de PCR en tiempo real-DÚPLEX

Una vez corroborada la integridad de ambas extracciones se mezclaron para tener un pool con más cantidad de ADN. Entonces se prosiguió a hacer una serie de diluciones 1:3 a partir de un pool de 40 ng/uL de ADN. Las concentraciones virtuales (señaladas por el NanoDrop) totales quedaron distribuidas de la siguiente forma: 40, 13.3, 4.44, 1.48 y 0.49. Se prosiguió a hacer el mix de reacción añadiendo a un tubo eppendorf de 600 uL una alícuota de 60 uL de Master Mix 2x, 12 uL de oligo mitocondrial [1.5 uM] y 12 uL de oligo PtgS2 [10x]. De este stock, se repartieron alícuotas de 7 uL en 12 microtubos ópticos para PCR de 200 uL. Y a cada dos tubos se les añadió 3 uL de muestra (duplicados). Finalmente se pasó al termociclador en tiempo real StepOne de *Applied Biosystems*® con las siguientes condiciones de amplificación: 10 min a 95 °C de desnaturalización, y una segunda etapa de 40 ciclos con los primeros 15 s a 95 °C y 1 min a 60 °C de temperatura de alineación. Sin tiempo para elongación.

RESULTADOS

La concentración y calidad de las extracciones realizadas se muestran en la **Tabla 2**. Siento la extracción de la hembra 2 de la que se obtuvo mayor cantidad de ácidos nucleicos. Ambas extracciones después de la purificación con fenol cloroformo mostraron altos grados de pureza, especialmente en la relación 280/260, que corresponde al contenido de fenoles. En la **Figura 1**, se muestran las digestiones de las hembras 2 y 3, con su respectiva extracción sin digerir. En base a la comparación con el peso molecular, podemos notar que la integridad del ADN se encuentra en buenas condiciones, puesto que muestra una banda nítida en la extracción no digerida con un peso mucho mayor a 1 Kb, y una banda digerida con un patrón de degradación congruente respecto al corte de la enzima sobre la secuencia. En la Figura 2, se muestra la gráfica de amplificación la cual muestra que aproximadamente cada 2 ciclos, esto es llamado Crunch Time (CT), la siguiente dilución tiende a amplificar. Siendo congruente con el comportamiento de la cinética de reacción utilizada, puesto que a mayor cantidad de ADN (mayor templado), la CT se presenta más rápido. Esto se puede ver también en los CT expuestos por las curvas de ADN mitocondrial, que en ciclos menores mostraron amplificación.

Tabla 1. Secuencias utilizadas para los primers.

PRIMER/SONDA	GEN MITOCONDRIAL Secuencia 5’-3’	GEN PtgS2 Secuencia 5’-3’
Oligo fw	AACAACCAACAAACCCACTAA	TACCCATGGCTCACAGAATTG
Oligo rev	TATTTCTACACAGCATTCAACTGC	GTCTGTAGTTATTGGTGAGGGC

Tabla 2. Cuantificación en NanoDrop

Tabla 1.	*[ng/uL]*	*260/280*	*260/230*
Hembra 2	1475.33	1.8	2.15
Hembra 3	861	1.74	2.16

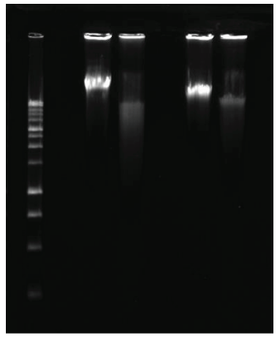


Figura 1. A la izquierda marcador de peso molecular. En el centro, extracción de hembra 2 y digestión. A la derecha, extracción de hembra 3 y digestión.

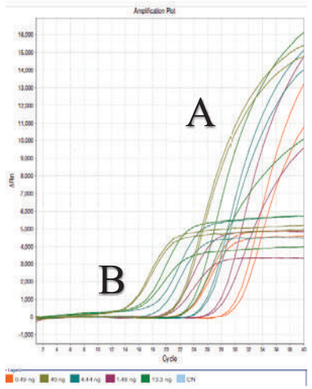


Figura 2. A, expresión del mtADN. B, expresión del gADN.

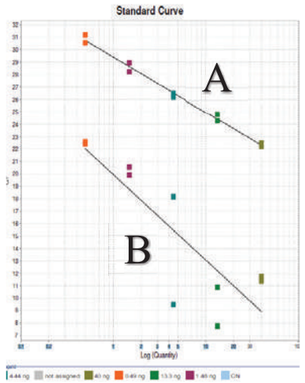


Figura 3. A, curva de gADN; B, curva de mtADN.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados, la expresión de mtADN es mayor en el estadío 13.5, ya que las CT mostradas se situaron a partir de los primeros 15 ciclos, mientras que las CT expuestas por la expresión de las regiones del gADN se localizaron a partir del ciclo 20. Concluyendo que, la cantidad de copias de mtADN presentes en el temprano desarrollo embrionario es mucho mayor que la cantidad de ADN genómico, por la alta demanda de energía requerida por el metabolismo. Se corrobora también, que la utilización de estos cebadores es ideal para medir la actividad del cociente genoma mitocondria-nuclear, y que aún en cantidades muy pequeñas de material genético extraído, se pueden obtener datos estadísticamente aceptables para su cuantificación por PCR tiempo real.

BIBLIOGRAFÍA

Brandstätter, A., Niederstätter, H., Pavlic, M., Grubwieser, P., & Parson, W. (Marzo de 2007). Generating population data for the EMPOP database—An overview of the mtDNA sequencing and data evaluation processes considering 273 Austrian control region sequences as example. *Forensic Science International, 166*(2-3), 164-175.

Lewin, B. (2004). *GENES VIII.* Upper Saddle River: Pearson Prentice Hall.

Li, J., Kong, X., Zhang, J., Luo, Q., Li, X., & Fang, L. (2013). MiRNA-26b inhibits proliferation by targeting PTGS2 in breast cancer. *Cancer Cell International*, 17-23.

Solari, A. J. (2004). Fenóminos básicos y técnicas de genética molecular. En *Genética Humana* (págs. 40-43). Buenos Aires: Médica Manamericana.

SÍNTESIS DE NANOTUBOS DE CARBONO DOPADOS CON NITRÓGENO USANDO ALCOHOL ISOPROPÍLICO COMO PRECURSOR DE CARBONO

Leonardo Andrés Valdez Dimas[1] y Emilio Muñoz Sandoval[2]

RESUMEN

En el presente trabajo se sintetizaron nanotubos de carbono (CNT) dopados con nitrógeno mediante la técnica de deposición química de vapor (CVD) usando bencilamina como fuente de nitrógeno, isopropanol como fuente de carbono y ferroceno como metal catalizador, con el fin de determinar el efecto de la concentración y el tipo de precursores utilizados en la morfología y características de los CNTs obtenidos, caracterizando mediante microscopía SEM y encontrando referencias en la literatura, se observó que el isopropanol podría influir directamente en el grosor de los nanotubos de carbono haciendo estos de un tamaño mucho mayor a los sintetizados comúnmente con otras fuentes de carbono.

ABSTRACT

In this work nitrogen doped carbon nanotubes were synthesised through the chemical vapor deposition (CVD) technique, using benzylamine as a nitrogen source, isopropyl alcohol as a carbon source and ferrocene as metal catalyst. The effect of the precursor and its concentration in the morphology and physical characteristics of the obtained carbon nanotubes was observed by SEM spectroscopy and comparing our results with the ones previously reported. It was determined that isopropyl alcohol could influence directly in the carbon nanotubes thickness, making these much bigger than the ones synthesised with other carbon sources.

INTRODUCCIÓN

Los CNTs representan uno de los principales campos de investigación en los años recientes debido a un aumento en la capacidad para modificar sus propiedades mediante distintos métodos de funcionalización. Una modificación de las propiedades cristalinas de los nanotubos controlando el lugar de dopaje de átomos externos ha traído enormes implicaciones tecnológicas, lo cual justifica por sí mismo el número de experimentos e investigaciones teóricas enfocadas en este tema. Así como en otras estructuras cristalinas, la posición de los heteroátomos en la red de los CNTs no debe ser exclusivamente sustitucional para afectar sus propiedades. De hecho, las de los objetos nanoscópicos dependen en gran medida de la posición de cada átomo. Teniendo en mente que el átomo de nitrógeno contiene un electrón extra comparado al carbono, se pueden esperar novedosas propiedades electrónicas si los átomos de N se sustituyen directamente por los átomos de carbono en la red grafítica, debido a este electrón extra podemos esperar que el material se vuelve tipo n. Debido al tamaño, el nitrógeno también puede generar un defecto en la estructura del tubo manteniendo los heteroátomos en las paredes, obligando a un reordenamiento de los carbonos vecinos. El comportamiento eléctrico depende de la nueva geometría generada la cual incluye diferentes estructuras en las paredes lo cual no excluye que con este tipo de ordenamiento existe un comportamiento del tipo p[1].

En el presente trabajo se toma en cuenta los estudios anteriores a la teoría del dopaje de nanotubos de carbono por átomos de nitrógeno así como la exitosa vía de síntesis reportada por el método de CVD usando ferroceno como metal catalizador para realizar una síntesis con un precursor de carbón distinto. La caracterización posterior por microscopía electrónica de barrido demuestra que los CNTs sintetizados tienen un ancho mayor al comúnmente reportado por otras fuentes de carbono lo que a espera de los análisis posteriores por microscopía electrónica de transmisión podrá confirmarse que es causado por el uso del alcohol isopropílico como precursor de carbono.

[1] Engineering Faculty, Autonomous University of Queretaro, Cerro de las Campanas, Querétaro, Qro., C.P. 76010, México leonardoandre30@gmail.com
[2] Advanced Materials Department, IPICyT, Camino a la Presa San José, 2055, San Luis Potosí 78216, México ems@ipicyt.edu.mx

MÉTODOS Y MATERIALES

La técnica de síntesis por CVD involucra el flujo de uno o varios gases dentro de una cámara que contiene uno o más objetos calientes para ser depositados. Las reacciones químicas ocurren sobre y cerca de las superficies calientes resultando en la deposición de una película delgada sobre la superficie.

Esto va acompañado de productos no deseados que son expulsados de la cámara junto con los precursores que no hayan reaccionado mediante el mismo flujo de gas. Hay muchas variantes de CVD y una de sus principales aplicaciones es para la síntesis de nanomateriales como fullerenos, nanoribbons y nanotubos de carbono.

La técnica utilizada para la síntesis es CVD (Chemical Vapor Deposition). Se preparó una solución precursora de 300 mL de bencilamina (C_7H_9N) como fuente de nitrógeno, 300 mL de isopropanol (C_3H_8O) como fuente de carbono y 2.5% (wt) de ferroceno ($C_{10}H_{10}Fe$) el cual es ampliamente conocido como soporte para el crecimiento de los nanotubos. Se sonicó durante 30 minutos para mezclar los componentes.

Esta solución es depositada en un sprayer el cual es un recipiente que emite vibraciones ultrasónicas para formar partículas de alta pureza y que cuenta con dos boquillas, una de ellas conectada a una entrada de agua que sirve como intercambiador de calor y otra conectada a una entrada de gas inerte de composición (95% Ar y 5% H_2) el cual transporta las partículas precursoras al interior del tubo de cuarzo a un flujo de 2.5 L/min.

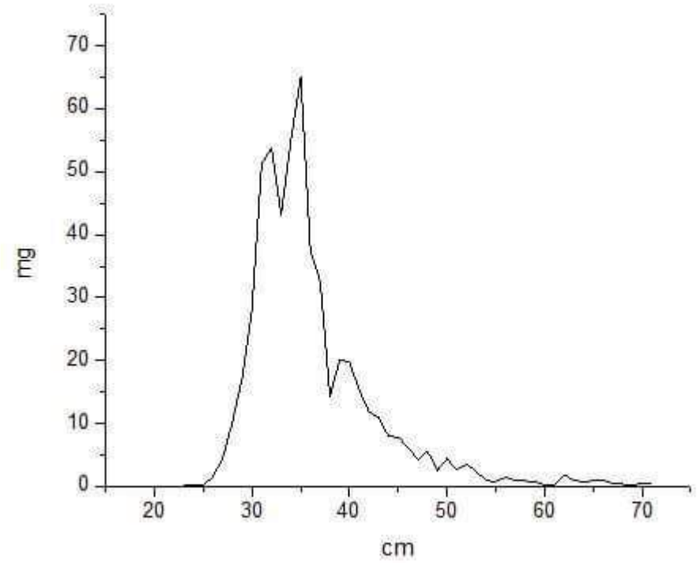
El tubo de cuarzo se encuentra dentro de dos hornos tubulares calentados previamente a 850°C. El tiempo de operación es de 30 minutos una vez que las partículas ingresan del sprayer al tubo de cuarzo. Pasado el tiempo de reacción se apaga el sprayer y se dejan enfriar los hornos tubulares para la posterior retiración del tubo de cuarzo.

Una vez que el tubo es retirado se divide en segmentos de un centímetro para la posterior extracción de los CNTs. Se raspan estos segmentos y se recolecta el producto obtenido con su debida clasificación por longitud. Una vez realizadas todas las recolecciones se pesa el producto obtenido y se realiza una gráfica de rendimiento vs longitud. Se escogen 7 centímetros del tubo para su posterior caracterización dejando un aproximado de 2/3 partes como muestra de referencia, la tercera parte restante es sonicada con etanol durante 30 minutos. Aquellas muestras sonicadas con un rendimiento mayor a 5 mg son filtradas con un papel con tamaño de poro de .2um y aquellas con un rendimiento menor se colocan en una plancha de calentamiento a 100°C hasta que el etanol se evapora. El papel filtrado se colocó en un horno a 60°C para la evaporación del etanol durante 1 día.

Una vez secadas las muestras se preparan para su caracterización por SEM (Scanning Electron Microscope).

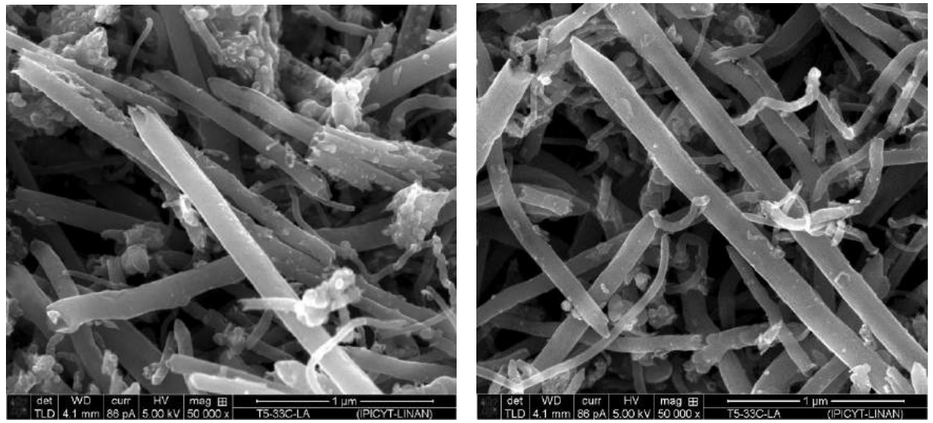
Preparación de muestras para SEM: Se lavan los pines a utilizar con acetona y etanol para remover residuos y se coloca una cinta de carbono de aproximadamente 5mm de lado. Una vez colocada la cinta se agrega una pequeña cantidad de las muestras correspondientes a los centímetros 29, 33, 37 y 50. Estas muestras se fijan correctamente a la cinta de carbono evitando que partículas de ellas contaminen los demás pines.

ANÁLISIS DE RESULTADOS



1 Grafica de rendimiento contra longitud para la síntesis de CNTs en un tubo de cuarzo mediante CVD

En la gráfica de rendimiento podemos ver como la mayor cantidad de material sintetizado fue hecho dentro de los tubos cerca del centímetro 35, esto se debe a la transferencia de calor y el viaje de los precursores desde la entrada por el sprayer hasta la salida hacia la trampa de acetona. Esto concuerda con las síntesis realizadas posteriormente por el equipo de trabajo.



2 Imágenes obtenidas por SEM de los CNTs sintetizados

En las imágenes obtenidas por microscopía SEM puede confirmarse que efectivamente se obtuvieron nanotubos de carbono terminados en punta, lo cual puede deberse a la sustitución por los átomos de nitrógeno que deforman la red de carbono. Todas las imágenes obtenidas por SEM demuestran un

ancho en los CNT mayor a los anteriormente reportados[2]. Esto puede deberse principalmente a el uso del alcohol isopropílico como precursor de carbono. Dato que será confirmado con los próximos análisis por microscopía electrónica de transmisión (TEM) así como el tipo de dopaje que presenta el nitrógeno.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se logró la síntesis de nanotubos de carbono dopados con nitrógeno mediante un precursor no utilizado hasta entonces que es el alcohol isopropílico, esto pudo confirmarse mediante la microscopia electrónica de barrido. Se pudo observar de igual forma que los CNTs sintetizados presentaron características físicas distintas a las previamente reportadas por el grupo de trabajo. A espera de análisis posteriores puede suponerse que se debió al uso de un nuevo precursor.

BIBLIOGRAFIA

1. Ayala, P., Arenal, R., Rümmeli, M., Rubio, A., & Pichler, T. (2010). The doping of carbon nanotubes with nitrogen and their potential applications. Carbon, 48(3), 575-586. http://dx.doi.org/10.1016/j.carbon.2009.10.009
2. Cruz-Silva, E., Cullen, D., Gu, L., Romo-Herrera, J., Muñoz-Sandoval, E., & López-Urías, F. et al. (2008). Heterodoped Nanotubes: Theory, Synthesis, and Characterization of Phosphorus−Nitrogen Doped Multiwalled Carbon Nanotubes. ACS Nano, 2(3), 441-448. http://dx.doi.org/10.1021/nn700330w

RIZOBACTERIAS AOSCIADAS A ESPECIES VEGETALES EN JALE MINERO EN VILLA DE LA PAZ, SAN LUIS POTOSÍ

Arisbet Varela Guardado[1] y Moisés Roberto Vallejo Pérez[2]

RESUMEN

La zona de Villa de la Paz-Matehuala pertenece al distrito minero de Santa María de la Paz, el cual ha sido explotado en forma continua por más de dos siglos. Durante ese tiempo se ha generado una gran contaminación por metales pesados y arsénico en la zona. Se realizó muestreo de 13 plantas (raíz, hojas y suelo), que crecen en los jales con el objetivo de determinar la concentración de metales pesados, especialmente plomo, así como también caracterizar bacterias existentes en la rizósfera de dichas plantas, siendo que la "colonia blanca" fue predominante en las tres zonas de muestreo y el 100% de las colonias resulto ser bacilos Gram negativos, entonces se plantea que dicha bacterias pueda estar asociadas al desarrollo de tolerancia de las plantas a las altas concentraciones de metales pesados.

ABSTRACT

The area of Villa de la Paz-Matehuala belongs to mining district of Santa MarÍa de la Paz, which has been operated continuously for more than two centuries. Period of time that has increased the contamination by heavy metals and arsenic in the area. Sampling of 13 plants (roots, leaves and soil), growing in the tailings in order to determine the concentration of heavy metals, especially lead, and also characterize bacteria in the rhizosphere of these plants was conducted. Bacteria with colonial morphology " white colony "was predominant in the three sampling areas and 100% of the colonies turned out to be Gram negative bacilli, then it arises that the colony may be associated to the adapatatión of plants to high concentrations of heavy metals. Future research are needed.

Palabras Clave: Bacterias, rizósfera, metales pesados, jales

INTRODUCCIÓN

La minería es considerada como una actividad productiva de alto impacto ambiental, debido a que en todas sus etapas (exploración, extracción y procesamiento) genera numerosos efectos adversos, así como una gran cantidad de residuos, los cuales pueden causar contaminación en agua, suelo, aire y sedimento. Algunos impactos ambientales generados por la actividad minera son: destrucción de hábitat y hábitats adyacentes, cambio en el régimen y dinámica de ríos, debido a la modificación del flujo y la sedimentación, cambios en el relieve, alteración en el nivel de los acuíferos, incremento de la erosión, generación de polvos durante los procesos, escorrentías de sedimentos, lixiviación de contaminantes en jales y suelo.

[1] Universidad Autónoma de Zacatecas, Unidad Académica de Ciencias de la Tierra, Calzada de la Universidad No. 108, C.P. 98058, Zacatecas, Zac., arisbet.v.g@gmail.com
[2] UASLP Coordinación para la Innovación y Aplicación de la Ciencia y la Tecnología (CIACyT), LaNGIF-LaDBIO. Av. Sierra Leona #550, Col. Lomas 2a., 78210 San Luis Potosí, SLP, vallejo.pmr@gmail.com

Las actividades mineras que prevalecen en México, se extienden desde el centro al norte del país y propician la contaminación de suelos y mantos acuíferos por la liberación de elementos potencialmente tóxicos (EPT), presentes en los residuos mineros tales como Pb, Cd, y As. (Castro y Kramar, 1997). La disponibilidad de EPT en el suelo es favorecida por los cambios atmosféricos, difusión de oxígeno, porcentaje de humedad, contenido volumétrico de agua, así como el tipo y contenido de materia orgánica presente en el suelo. Los ETP liberados pueden ser incorporados a las plantas a través del suelo rizosférico previo a su disolución/absorción o ser retenidos en la superficie de las raíces vegetales, y eventualmente pueden ser transportado a tallos, hojas y flores. Para que los metales pesados sean tóxicos a los seres vivos, primero deben encontrarse disponibles en la fase acuosa para ser absorbidos y posteriormente atravesar la membrana biológica.

Las interacciones entre microorganismos y metales son fundamentales en los ciclos biogeoquímicos y dependen principalmente de los estados de oxidación en que se presenten. La rizósfera es la parte del suelo inmediata a las raíces en donde se llevan cabo diversas interacciones físicas, químicas y microbiológicas, que modifican la estructura del suelo y la distribución biótica del mismo de manera puntual (Kabata-Pendias y Pendias, 2001). La presencia de bacterias aerobias en la rizósfera propicia condiciones óptimas para mantener metales en solución. Algunos microorganismos movilizan metales mediante la liberación de ácidos carboxílicos, mismo que pueden formar complejos metálicos solubles. Por lo tanto la tolerancia de algunas plantas vegetales en sitios impactados por la actividad minera esta relacionadas estrechamente con la fracción bioaccesible en el suelo rizosférico así como las propiedades bioquímicas que pueda expresar por su exposición a EPT.

En los últimos años se han realizado diversos estudios en Villa de la Paz, para determinar los ambientes más afectados y se ha demostrado la presencia de altas concentraciones de arsénico y otros metales pesados en agua, aire y sedimento así como en plantas. Se han encontrado altas concentraciones de Cd, Cr, Cu, Pb, Zn y metaloides como arsénico, compuestos tóxicos para la flora y fauna de la región, no obstante existe la presencia de algunas especies vegetal que aumentan su proliferación en la región conforme aumenta la concentración de dichos compuestos, por lo que se cree que existen bacterias en la rizósfera que contribuyen a desarrollar mecanismos de adaptación, resistencia o evasión.

Durante el presente trabajo se tuvo por objetivo principal la búsqueda y caracterización de bacterias existentes en la rizósfera de vegetación que crece en el jale minero, así como la determinación de metales pesados en raíz, hoja de plantas colectadas en Villa de la Paz San Luis Potosí.

MÉTODOS Y MATERIALES

MUESTREO

El muestreo fue basado y adaptado en los criterios que dicta la norma mexicana NMX-AA-132-SCFI-2006 Muestreo de suelos para la identificación y la cuantificación de metales y metaloides, y manejo de la muestra, el 15 de junio del 2016 en Villa de la Paz, Matehuala, S.L.P. Colectando en tres zonas principales: Zona afectada o Jale minero "Zona-1" (Figura 1a) caracterizado por un suelo de polvo fino blanco y escasa vegetación, zona en orilla del jale "Zona-2" (Figura 2b) encontrándose poca vegetación, destacando pirul y mezquite con un suelo rojo y Zona de Control Blanco ubicado a 5km del jale minero de Villa de la Paz "Zona-3" (Figura 3c) con una rica vegetación en biznagas, nopales, líquenes y un suelo firme, siendo siete plantas de flor amarilla, cuatro de un arbusto, un diente de león *Taraxacum officinale,* y un pasto (13 muestras).

Figura 1. Sitios de colecta de rizósfera para analisis microbiológico: a) Sobre el Jale minero, Zona 1; b) A orillas del jale minero, Zona 2 y c) a 5 km del jale minero, Zona 3.

Las muestras tomadas en las zonas 1, 2, 3, se dividieron en tres porciones o grupos para realizar los análisis de: concentración de compuestos en raíz, concentración de compuestos en hoja o flor y siembra en agar.

PROCESAMIENTO DE MUESTRAS VEGETALES PARA DETERMINAR CONCENTRACIÓN DE COMPUESTOS EN RAIZ Y HOJAS

Se cortaron en trozos pequeños y pesaron 6 gr de raíz y hoja de cada una de las muestras para su posterior lavado con diversas soluciones, y así eliminar las partículas de suelo adheridas a la superficie de las mismas. El primer lavado de muestras fue con agua corriente con la finalidad de eliminar los residuos de suelo (Figura 2a), posteriormente las muestras se colocaron en vasos de precipitado de 80ml y etiquetados (Figura 2b), posteriormente con un sonicador (Figura 2c) se realizaron lavados seriados con: agua desionizada, solución de extran al 1 %, solución 0.01 N de ácido nítrico, solución 1 mM de cloruro de calcio, solución 0.1 N de hexametafosfato de sodio, con el objetivo de eliminar las partículas de suelo adheridas a la superficie de las raíces durante 3 min cada lavado. Intercalando en cada solución un enjuagado con agua desionizada. En seguida, las muestras se secaran en una estufa a una temperatura de 50° C por una semana. Finalmente, se realizará una pulverización en un molino analítico "Wiley" (Cole-Parmer) con cuchillas de acero inoxidable, el material será recolectado en tubos de polipropileno de 15 mI. (MILLE, 2006).

Figura 2. Procesamiento de muestras vegetales: a) Sobre el Jale minero, Zona 1; b) A orillas del jale minero, Zona 2 y c) a 5 km del jale minero, Zona 3.

Las raíces y/o hojas son sometidas a una digestión ácida, con la finalidad de eliminar la materia orgánica y mineralizar los metales por medio de oxidación. Para ello se pesan 0.2 g de la muestra pulverizada en un vaso de precipitado de 100 ml; se agregaran 5 ml de concentrado y 0.5 mL de ácido perclórico, se cubre el vaso con un vidrio de reloj y se deja reposar toda la noche. Posteriormente se coloca el vaso en una placa de calentamiento a una temperatura aproximada de 80°C. Al cesar los vapores rojos, y la solución pierda la turbidez, se retirará el vidrio de reloj. Se llevan a sequedad, se removerá el vaso y se

dejará enfriar. Se añadirán 5 ml de agua desionizada y se analizaran por espectrofotometría de absorción atómica (concentración del analito en una muestra).

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN BACTERIANA

Para realizar el aislamiento de bacterias se utilizaron las raíces y considerando una réplica para cada una (Figura 3). Se pesaron 0.5 g de muestra principalmente la tierra adherida a las raíces y la raíz más delgada, se suspendió en solución saturada de sacarosa agitando por 10 minutos, se centrifugo a 700 rpm (6 min, 8°C), se descartó la fase sólida y la fase acuosa se sometió a 6,000 rpm (3 min, 8°C), nuevamente se rescató el sobrenadante y se sometió a 14,000 rpm (3 min, 8°C), se decantó y la pastilla acumulada se re-disolvió en 50µl de agua estéril. A partir de la solución preparada y con ayuda de un asa bacteriologica se sembró en PDA y se incubo a 27°C por 24 horas. Para la identificación bacteriana se practicó una tinción GRAM, una descripción de colonias de bacterias y un kit de pruebas bioquímicas.

Determinación de niveles de tolerancia

Para determinar los niveles de tolerancia a los metales pesado se utiliza agar Luria adicionado con concentraciones ascendentes de arsenito de sodio o arseniato de sodio (8, 6, 4, 2, 1, 0.5, 0.1 mM). Cada una de las placas se inocula con diluciones apropiadas de cultivos bacterianos de 24 h de incubación. Como control, se inocularon placas con agar Luria, sin arsénico. Las placas se incuban a 25ºC durante 24 a 48 h y se observó la presencia de desarrollo bacteriano (Campos, 2007).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se observaron aproximadamente 12 morfologías diferentes en colonias de bacterias, incluyendo bacterias y actinomicetos, en la Tabla 1 se muestra la clave principal de cada colonia, la identificación se basó principalmente en el color para una fácil diferenciación, también se muestra las características de cada una. En las ilustraciones 3, 4 y 5 muestra por zona, la presencia bacteriana, siendo la “colonia blanca” predominante en las tres zonas, con un aprox. de 92.3% de las muestras, exceptuando la muestra A-R-1.

Tabla 1 Morfología general de las colonias bacterianas

CLAVE	FORMA	TEXTURA	COLOR	MARGEN	ELEVACION	SUPERFICE
AMARILLA	circular	butirosa	amarilla	ondulado	convexa	lisa
BLANCA	circular	húmeda	blanca	entero	convexa	lisa
VERDE	irregular	butirosa	verde	ondulado	elevado	brillante
ROJO	circular	seca	rojo	entero	elevado	brillante
AZUL	irregular	seca	azul	ondulado	plano	áspero
CURLED	irregular	butirosa	blanco	curvado	elevado	arrugado
GRIS	irregular	mucoide	gris	ondulado	plano	brillante
CORAL	circular	seca	coral	entero	elevado	brillante
OPACA	irregular	mucoide	opaca	ondulado	plano	áspero
PERLA	filamentoso	húmeda	perla	filiforme	crateriforme	arrugado
BLANCA 2	circular	húmeda	blanca	ondulado	convexa	arrugado
ÁSPERA	irregular	seca	áspera	ondulado	plano	áspero

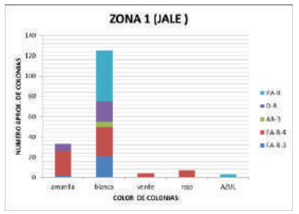


Ilustración 3 Incidencia de bacterias por muestra

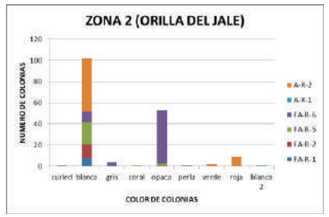


Ilustración 4 Incidencia de bacterias por muestra Zona 2

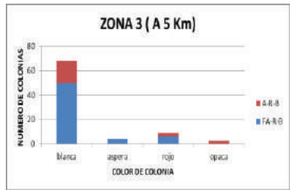


Ilustración 5 Incidencia de bacterias por muestra Zona 3

De las colonias bacterianas el 100% resulto ser bacilos Gram negativos.

Respecto al análisis de concentraciones de metales pesados en raíz y hojas, la falta de tiempo truncó el proceso, quedando las muestras guardadas para una segunda parte del proyecto respectivamente.

CONCLUSIONES

Las colonias bacterianas de color blanco se asilaron con mayor frecuencia y es probable que tenga un efecto en la tolerancia de las plantas a las altas concentraciones de los contaminantes; sin embargo, es necesario relaizar pruebas adicionales e identificar las bacterias aisladas mismas que fueron sonservadas en glicerol al 30% a -80ºC.

BIBLIOGRAFÍA

R.A.I. ABOU-SHANAB, P. VAN BERKUM, J.S. ANGLE, (5 de febrero 2007). *"Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of Alyssum murale"*. ScienceDirect, chemosphere 68 (360-367)

González, D. (2006). Riesgo Ecológico en la Zona minera de Villa de la Paz, S.L.P. Tesis, 1, 104,105.

Vázquez, G. (2007). Movilización de Elementos Potencialmente Tóxicos en la rizósfera de *Vilguiera dentata*, una especie vegetal tolerante de suelos de Villa de la Paz, Matehuala, SLP. Tesis, 1.

GONZÁLEZ CHÁVEZ M, *Recuperación de Suelos Contaminados por metales pesados utilizando plantas y microrganismos rizosféricos,* 2008.

Kabata-Pendias, A. and Pendias, H. (2001) Trance elements in soils and plants. 3d. ed. CRC Press, Florida.

Castro-Larragoitia, J. and Kramar, J. (1997) 200 years of mining activities at La Paz, San Luis Potosí, México-Consequences for environment and geochemical exploration, *Journal Geochemmistry.*

Mille, D. J. (julio de 2006). RIESGO ECOLÓGICO EN LA ZONA MINERA DE VILLA DE LA PAZ, SAN. Tesis. San Luis Potosí, SLP, México.

Campos, V. (2007). AISLAMIENTO DE BACTERIAS RESISTENTES A ARSENICO DESDE MUESTRAS DE ROCAS VOLCANICAS DE LA QUEBRADA CAMARONES, REGION PARINACOTA. CHILE. Gayana 71(2), 150-155.

PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE PLANTAS ADAPTADAS A LAS ZONAS ÁRIDAS Y SEMIÁRIDAS DE MÉXICO

Mariana Vázquez Narváez[1] y Eugenio Pérez Molphe Balch[2]

RESUMEN

Se desarrollaron sistemas de propagación *in vitro* para cactáceas y agaváceas. Primeramente se germinaron *in vitro* semillas de dichas familias, en donde el mayor porcentaje de germinación lo obtuvo *Agave angustifolia*. Posteriormente se realizó la propagación mediante yemas tanto en cactáceas como en agaváceas, en donde se evaluaron distintos tratamientos siendo la benciladenina la hormona con mayor efectividad. Finalmente se llevó a cabo el enraizamiento, aclimatación y transferencia a suelo de distintas especies. Si bien se requeriría más tiempo para evaluar los resultados finales, hasta los 24 días de incubación la especie con mayor porcentaje de enraizamiento fue *Agave obscura*, aunque la especie con raíces más maduras fue *Agave funkiana*, cual se transfirió a suelo junto con *Pilosocereus chrysacanthus*.

ABSTRACT

In vitro propagation systems for cacti and agaves were developed. Firstly, seeds from both families were germinated *in vitro* where the species with higher percentage of germination was *Agave angustifolia*. Later the propagation by meristematic cell activation was performed both in cacti and agave, where different treatments were evaluated, being benzyladenine the hormone with highest success rate. Finally rooting, acclimation and soil transference was performed in different species. Although more time would be required to evaluate the final results, after 24 days of incubation the species with the highest rooting rate was *Agave obscura*, albeit the species with more mature roots was *Agave funkiana* which was transferred to soil along with *Pilosocereus chrysacanthus*.

Palabras Clave: Propagación *In Vitro*, Cactáceas, Agaváceas,

INTRODUCCIÓN

Las zonas áridas ocupan en México una superficie de 95 millones de hectáreas, lo que equivale al 48.29% del territorio nacional. De este total se estima que, alrededor de 39 millones de hectáreas (20% aprox.) se clasifican como zonas semiáridas y el resto, 20% corresponde a zonas áridas. Las comunidades vegetales que se desarrollan bajo estos climas varían desde pastizales, matorrales y plantas espinosas como lo son cactáceas y agaváceas (Gonzáles Medrano, 2004).

México cuenta con alrededor de 660 especies de cactáceas distribuidas a lo largo de todo su territorio, 78% de las cuales 517 son endémicas. Estas plantas son de especial interés, ya que han sido usadas tradicionalmente como fuente de alimentos, forrajes, materiales para la construcción y medicamentos, y cada vez cobran más importancia como ornamentales. Los cactus poseen características ecológicas como sus distribuciones geográficas restringidas, ciclos de vida largos y tasas de crecimiento reducidas, que los

[1]Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Química; Cerro de las Campanas s/n, Col. Las Campanas, C.P: 76010, Querétaro, Qro., marianavaz_94@hotmail.com
[2]Universidad Autónoma de Aguascalientes, Dpto. de Química, Centro de Ciencias Básicas, Unidad de Biotecnología Vegetal; Av. Universidad 940, Ciudad Universitaria, C.P: 20131 Aguascalientes, Ags., eperezmb@correo.uaa.mx

hacen especialmente sensibles a las perturbaciones ambientales. (Santos-Díaz *et al*., 2010). Por otra parte, el género *Agave* se distribuye en el continente americano, en el que se encuentran aproximadamente 197 especies. De éstas, 136 habitan en México, por lo que nuestro país se considera el centro de origen de éste género. Estas plantas han sido utilizadas para múltiples fines desde la época prehispánica, y actualmente son fuente de materias primas para industrias importantes como las de bebidas alcohólicas y de fibras naturales. Sin embargo, el crecimiento muy lento de estas plantas, así como sus bajas tasas de reproducción sexual limitada por problemas de polinización y viabilidad de las semillas, son factores que hacen a los agaves difíciles de multiplicar masivamente por métodos convencionales (Domínguez Rosales *et al*., 2008).

La aplicación de métodos biotecnológicos, como la multiplicación *in vitro*, puede contribuir a aliviar esta situación al hacer posible la propagación rápida y masiva de las cactáceas y agaváceas. Se sabe además que estas condiciones de cultivo en medios artificiales aceleran significativamente el crecimiento de estas plantas, confiriendo así una ventaja adicional a esta metodología (Malda *et al.*, 1999). La propagación *in vitro* está caracterizada por el uso de partes aisladas de la planta, llamadas explantes, obtenidos de una planta intacta y mantenido en un medio con los nutrientes adecuados. Este medio de cultivo funciona como un reemplazo para las células o tejido. Dichos sistemas usualmente son mantenidos bajo condiciones asépticas (Neumann, 2009).

MÉTODOS Y MATERIALES

Preparación de medios de cultivo
Se empleó el medio de cultivo Murashige–Skoog (MS; Murashige & Skoog 1962, Phytotechnology®), el cual se enriqueció con 30 g/L de sacarosa. El pH se ajustó a 5.7con NAOH 1N con el uso de un potenciómetro. Como gelificante se utilizó agar a 10g/L y 8g/L para cactáceas y agaváceas respectivamente. Se utilizaron distintos tratamientos con reguladores de crecimiento: BA (0.5mg/L, 1mg/L y 2mg/L), 2iP (1mg/L, y 2mg/L), IBA (0.5mg/L), carbón activado (2g/L). Todos los medios de cultivo se transfirieron a frascos de vidrio y se esterilizaron en autoclave a 121°C/ por 20 min a 15 libras de presión atmosférica.

Desinfección y germinación *in vitro* de semillas de cactáceas y agaváceas
Las semillas se lavaron 5 veces durante 3 a 5 minutos con agua corriente con unas gotas de jabón líquido (Dermocleen) con agitación constante. Posteriormente se lavaron por 30 segundos con etanol al 70% y se enjuagaron 2 veces con agua corriente. Se desinfectaron con Cloralex al 15% por 20 minutos bajo agitación suave.
En campana de flujo laminar se enjuagaron las semillas 3 veces con agua destilada estéril. Se distribuyeron las semillas en los recipientes con medio MS y se sellaron.

Propagación de cactáceas por medio de activación de areolas
Se tomaron los brotes eliminando la parte basal y el ápice. El tejido restante se cortó en rebanadas transversales teniendo cuidado de que la rebanada tuviese al menos dos hileras de areolas. Se inocularon los explantes en los frascos con medio de cultivo con 5 tratamientos distintos: testigo, 0.5mg/L de BA, 1mg/L de BA, 1mg/L de 2iP y 2mg/L de 2iP. Los explantes se inocularon manteniendo su polaridad. Finalmente se incubaron los frascos a 25ºC bajo luz continua.

Propagación de agaváceas por medio de activación de yemas
Se tomaron las plántulas y se eliminó la parte apical de todas las hojas, además de que se eliminaron las raíces. Se inocularon los explantes en los frascos con medio de cultivo con 5 tratamientos distintos: testigo, 1mg/L de BA, 2mg/L de BA, 1mg/L de 2iP y 2mg/L de 2iP. Los frascos se incubaron a 25ºC bajo luz continua.

Enraizamiento *in vitro* de brotes de cactáceas y agaváceas
Se separaron los brotes de los explantes originales cortando lo más cerca posible de su base. Se inocularon los brotes en posición vertical en los medios para el enraizamiento, los cuales constaron de tres tratamientos distintos: testigo, IBA a 0.5mg/L, y carbón activado a 2g/L. Los frascos se sellaron y se incubaron a 25ºC.

Aclimatación y transferencia a suelo
Cuatro días antes de la transferencia los explantes se aclimataron quitando el sello y abriendo sus frascos. Posteriormente se separaron los explantes y se lavaron las raíces con agua corriente. Finalmente las especies se plantaron en una maceta con una mezcla de tierra comercial y arena como sustrato

RESULTADOS

Germinación *in vitro*
Se seleccionaron semillas de dos especies de agaves y dos especies de cactácea para germinarlas *in vitro*. Se calcularon los porcentajes de germinación de cada especie como se muestra en la Tabla 1.

Especie	Semillas totales	Semillas sin germinar	Semillas Germinadas	Porcentaje Germinación
Agave angustifolia	84	4	80	95%
Agave guiengola	75	8	67	89%
Echinocactus grusonii	141	86	55	39%
Neobuxbaumia polylopha	97	16	81	84%

Tabla 1. Semillas germinadas in vitro

Las semillas de cactus tomaron dos semanas más en germinar que las semillas de agave, además el porcentaje de germinación es considerablemente menor en las especies de cactácea comparadas con las especies de agave, esto puede ocurrir gracias a que la familia de las cactáceas presenta usualmente capacidades reproductivas limitadas y tasas de crecimiento muy lentas (Malda, 1999), por lo que es de esperarse observar estos resultados.

Propagación mediante activación de areolas
Se utilizaron cuatro especies de cactáceas para este experimento, en donde se utilizaron distintos tratamientos para cada especie.

De acuerdo a los resultados observados en la Figura 1, los medios enriquecidos con benciladenina fueron en donde se obtuvieron mayor cantidad de brotes, de acuerdo a Escobar (1986) la benciladenina es de los reguladores de crecimiento con mayor efectividad para la multiplicación de material vegetal, por lo que se confirman sus observaciones con este experimento.

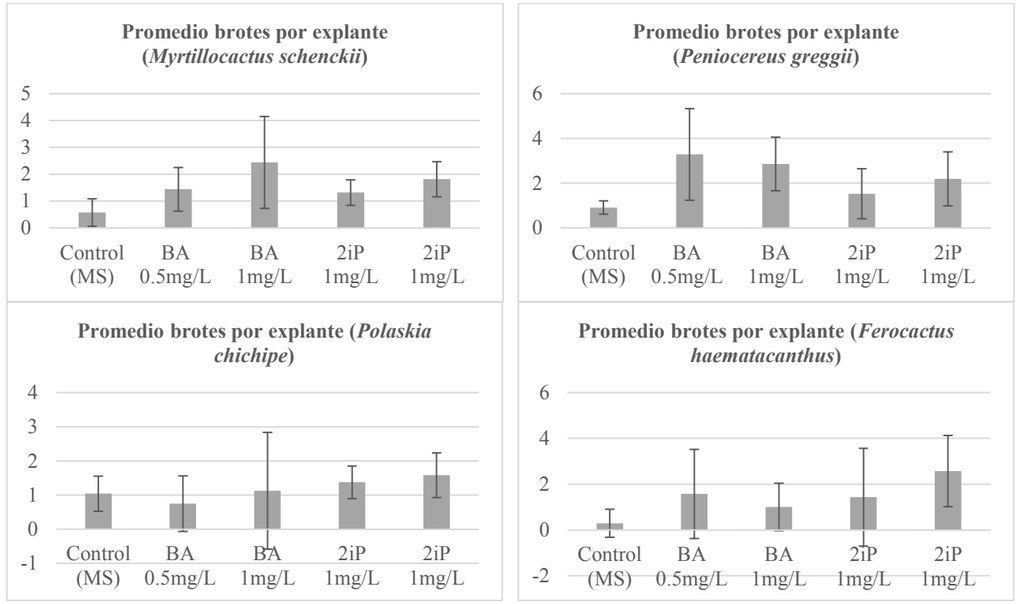


Figura 1. Gráficas de promedios de brotes por explante de distintas especies de cactáceas

Propagación mediante activación de yemas
Para estos experimentos se utilizaron cuatro especies de Agave distintas: *Agave titanota, Agave nizadensis, Agave funkiana* y *Agave peacockii.* Tras cuatro semanas de cultivo, los brotes apenas comenzaban a aparecer en los explantes, por lo que no se pudo realizar un estudio estadístico de ellos. Sin embargo, los pequeños brotes fueron fotografiados al microscopio como se puede apreciar en la Figura 3.

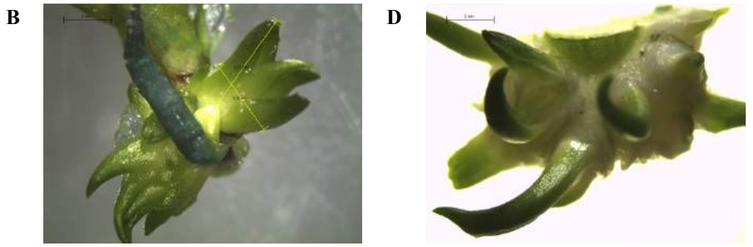


Figura 2. Generación de brotes de Agave. A) *A. titanota*; B) *A. nizadensis*; C) *A. funkiana*; D) A. peacockii.

Enraizamiento, aclimatación y transferencia a suelo

Se seleccionaron dos especies de cactácea y dos de agavácea para el experimento de generación de raíces, en donde se calcularon los porcentajes de enraizamiento tanto del control como del tratamiento con IBA como se muestra en la Tabla 2, los resultados de los tratamientos con carbón activado se omitieron debido a que por el color del medio de cultivo no se podía apreciar el número de explantes con raíz. Aunque es sabido que el IBA en cultivo de tejido vegetal es utilizado para iniciar la formación de raíces (Bridgen, 1992), en estos experimentos no se denotó diferencia en la formación de raíces a comparación con el control, excepto en *Agave obscura*.

		Explantes con raíz	
Especie	**Explantes totales**	Control (MS)	IBA 0.5mg/L
Mamillaria dioica	21	12	10
	Porcentaje enraizamiento	57.14%	47.62%

		Explantes con raíz	
Especie	**Explantes totales**	Control (MS)	IBA 0.5mg/L
Astrophytum ornatum	21	14	14
	Porcentaje enraizamiento	66.67%	66.67%

		Explantes con raíz	
Especie	**Explantes totales**	Control (MS)	IBA 0.5mg/L
Agave obscura	20	9	20
	Porcentaje enraizamiento	45.00%	100.00%

		Explantes con raíz	
Especie	**Explantes totales**	Control (MS)	IBA 0.5mg/L
Agave funkiana	20	15	12
	Porcentaje enraizamiento	75.00%	60.00%

Tabla 2. Explantes enraizados de distintas especies de cactáceas y agaváceas

De las especies anteriores, tras dos semanas de enraizamiento la especie con raíces más largas y aptas para trasferir a suelo fue *Agave funkiana*, por lo tanto se comenzó el proceso de aclimatación, de la misma manera se seleccionaron frascos de *Pilosocereus chrysacanthus* previamente enraizados *in vitro* y se sometieron al mismo tratamiento.

Figura 3. Especies de cactus y agave trasferidas a suelo

Tras la trasferencia a suelo se calculó el porcentaje de supervivencia de las dos especies el cual fue del 89.47% para agave, mientras que para cactus fue del 80%

CONCLUSIONES

Se desarrolló con éxito la propagación in vitro de distintas especies de cactáceas y agaváceas, en donde las especies fueron germinadas, propagadas, enraizadas y trasferidas a suelo. En cuanto a la germinación los agaves respondieron de manera más rápida y con mejores porcentajes de germinación (hasta 95%), mientras que en la propagación por activación de tejido meristemático los cactus respondieron de mejor manera observándose brotes completamente definidos, hecho que no se apreció en las especies de agave. Empero, las agaváceas resultaron tener una respuesta al enraizamiento mejor que en las cactáceas, teniendo porcentajes de hasta 100% de raíces por explante, además de generar raíces maduras que permitieron la transferencia a suelo. Estos métodos desarrollados pueden aplicarse para la propagación masiva de cactáceas y agaváceas para su aprovechamiento, además de disminuir así la presión que la sobreexplotación ejerce sobre poblaciones silvestres de esta clase de plantas.

BIBLIOGRAFIA

GONZÁLEZ MEDRANO, F. (2004). *Las comunidades vegetales en México*, México: INE-SEMARNAT.

SANTOS-DÍAZ, M.S., Pérez-Molphe, E., Ramírez-Malagón, R., Núñez-Palenius, H.G. & Ochoa-Alejo, N. (2010). ¨Mexican threatened cacti: current status and strategies for their conservation¨ en Tepper. G. (ed). *Species Diversity and Extinction*. Nova Science Publishers, Inc. [pp. 1-60]

DOMÍNGUEZ ROSALES, M.S., Gonzáles Jiménez, M., Rosales Gómez, C., Quiñones Valles, C., Delgadillo Díaz de León, S., Mireles Ordaz, S. J. & Pérez Molphe Balch, E. (2008) ¨El cultivo *in vitro* como herramienta para el aprovechamiento, mejoramiento y conservación de especies del género *Agave*¨ en *Investigación y Ciencia*, Núm. 41, Vol. XVI, Mayo- Agosto, [pp. 53-62].

MALDA G., Suzán H. & Backhaus R. (1999). ¨*In vitro* culture as a potential method for the conservation of endangered plants possessing crassulacean acid metabolism¨ en *Scientia Horticulturae*, Vol LXXXI, [pp- 71-87].

NEUMANN, K.H., Kumar, A. & Imani, J. (2009). *Principles and Practice. Plant Cell and Tissue Culture- a Tool in Biotechnology*. Berlin: Springer

ESCOBAR H.A., Villalobos V.M. & Villegas A. (1986) ¨*Opuntia* micropropagation by axillary proliferation¨ en *Plant Cell Tissue Org. Cult*., Vol. VII, [pp. 269–277].

BRIDGEN, M.P., Masood, Z.H. & Spencer-Barreto, M. (1992). "A laboratory exercise to demonstrate direct and indirect shoot organogenesis from leaves of *Torenia fournieri*" en *HortTechnology*. [pp. 320–322].

FABRICACIÓN DE NANOESTRUCTURAS DE CARBONO DOPADAS CON NITRÓGENO: NANOTUBOS

Guillermo Vázquez Tovar[1] y Emilio Muñoz Sandoval[2]

RESUMEN

Los nanotubos de carbono dopados con nitrógeno (NCNTs) se han vuelto un tema de alta importancia en el estudio de los materiales de carbono. Esto es debido al cambio sustancial de propiedades físicas y químicas que tienen con respecto a los nanotubos de carbono puro (CNT). En este trabajo se estudia el método convencional para la síntesis NCNTs usando precursores tales como isopropanol, bencilamina y ferroceno. Se sintetizaron NCNTs de varias capas con un diámetro externo promedio de 100nm. Este producto fue sometido a dos pruebas de caracterización; Scanning Electron Microscopy (SEM) para reportar la geometría y la morfología de la muestra y Thermogravimetric Analysis (TGA) que fue usado para obtener la temperatura de oxidación.

ABSTRACT

Nitrogen doped carbon nanotubes (NCNTs) have become a topic of high importance in the study of carbon nanomaterials. This is because of the considerable change of physical and chemical properties in comparison to pure carbon nanotubes (CNT). In this approach we study the NCNTs conventional synthesis method using precursors such as isopropyl alcohol, benzylamine and ferrocene. We have synthesized multi-walled NCNTs with an outer diameter of 100nm. This product had been characterized by two methods; Scanning Electron Microscopy (SEM) which has been used to report the geometry and morphology, and Thermogravimetric Analysis results have been analyzed to obtain the oxidation temperature.

Palabras Clave: nanotubos de carbono (CNT), complejo organometálico, deposición química de vapor (CVD)

INTRODUCCION

La amplia gama de posibles aplicaciones de materiales de propiedades tan únicas y sorprendentes como las de un nanotubo de carbono han impulsado el enfoque de la investigación nanotecnológica hacia la estandarización de procesos de producción de nanotubos que destaquen por su simplicidad y por su accesibilidad. La síntesis llevada a cabo con precursores de alta pureza y en forma de aerosol provee grandes ventajas en el gasto neto de un proceso de síntesis. Sin embargo, el desafío constante en la producción de nanotubos de calidad industrial sigue siendo la capacidad de lograr nanotubos de dimensiones consistentes.

Muchos autores se han interesado en sintetizar nanotubos de carbono, y es bien sabido que el medio más común es por la técnica de deposición química de vapor (CVD), además de ser el método predilecto para la tarea de producir nanotubos en gran escala. Hay distintas variaciones del método CVD, sin embargo, todas éstas son similares en el uso de un catalizador y una fuente de carbono para producir distintas estructuras nanométricas de carbono. Estos tipos de procesos son llevados a cabo en tubos de cuarzo que son introducidos en hornos tubulares, lo que conlleva al flujo de precursores a través del cuarzo a altas temperaturas, que resulta en la descomposición de los reactantes (pirolisis) y la formación autoensamblada

[1] Facultad de Ingeniería Campus Aeropuerto, Universidad Autónoma de Querétaro, Carr. a Chichimequillas S/N Terrenos Ejidales Bolaños, C.P. 76140, Querétaro, Qro. MÉXICO; guillermovazqueztovar@gmail.com
[2] Advanced Materials Department, IPICYT, Camino a la Presa San José 2055, Col. Lomas 4a Sección, San Luis Potosı´ 78216, MÉXICO; ems@ipicyt.edu.mx

de estructuras carbonosas. Los nanotubos de carbono dopados con nitrógeno (NCNTs) son un tipo de nanoestructuras a las que se les presta un especial interés en esta investigación debido a su gran conductividad y su posible aplicación en áreas donde se requiera la acción de efecto de campo o la capacidad catalítica de éstas. En lo que se refiere a los átomos que pueden fungir como sustituciones en la red del carbón, el nitrógeno tiene varias ventajas, debido a su excelente rendimiento electrolítico, bajo costo, excelente estabilidad, y el ser respetuoso con el medio ambiente.

MARCO TEORICO

Nanotubos de carbono dopados con nitrógeno (NCNTs); La inserción de nitrógeno cambia la estructura del nanotubo de carbono (CNT) y, por lo tanto, afecta las propiedades físicas y químicas de éstos. Átomos de nitrógeno pueden ser añadidos a la matriz de carbón por medio de diferentes maneras resultando en diferentes configuraciones de enlaces.

Las configuraciones que puede tomar el nitrógeno en la red de carbono son tres diferentes, diferencias que recaen en la aportación de electrones pi y en la estructura de los anillos de los cuales forma parte, son: (i) tipo piridínico: el cual aporta 2 electrones pi a la matriz de carbono y el átomo N está enlazado con dos carbonos vecino, esto resulta en la localización de dos electrones libres en las proximidades del átomo N (ii) tipo pirrólico: el átomo N aporta dos electrones p al orbital pi de la matriz. (iii) tipo cuaternario: el átomo N reemplaza a un átomo nativo de la red. Sin importar como sea introducido cuando el nitrógeno de mayor valencia en comparación con la red es introducido, más electrones pi pueden ser obtenidos. Es decir, le confiere una mejor conducción tipo n a la matriz carbonosa.

Síntesis de nanotubos a partir de compuestos organometálicos: La síntesis de interés en el procedimiento experimental se denomina *in situ* y consiste en la inserción de átomos N en la matriz de carbón desde el proceso de síntesis. Para lograr alcanzar un método de síntesis menos complejo se han usado complejos organometálicos como precursores de nanopartículas metálicas, además nos da la oportunidad de controlar el tamaño de ésta por medio de variaciones de condiciones de temperatura y presión.

El control de tamaño de tal nanopartícula teóricamente permitiría la homogenización de la geometría de los CNTs. El uso de precursores organometálicos que pueden solubilizar en demás precursores de forma sencilla es conveniente en un proceso de producción por lotes. Por último, se ha demostrado que el complejo ferroceno funge como precursor tanto para la partícula metálica como para la formación del nanotubo por lo que presenta una ventaja sustancial a tomar en cuenta.

METODOLOGIA

(i) Síntesis de nanotubos
Primero, se prepara la solución de precursores, añadiendo 300ml de Isopropanol, 300ml de bencilamina y 13.58gr de ferroceno sólido (2.5%wt.), éste soluto es solubilizado con ayuda de un sonicador de baño. Después, la misma solución es sometida a frecuencias ultrasónicas en un nebulizador piezoeléctrico para la formación de aerosol que es carreado en un flujo de gas de *2.5l/min* (Ar/H_2, 95%) que dirige el precursor a la zona de pirólisis constituida por dos hornos tubulares alineados que se mantienen a 850°C por un periodo de 30min. Después de este tiempo la generación del aerosol y el flujo de gas es suspendido, y los hornos son enfriados gradualmente hasta alcanzar la temperatura ambiente.

Una vez alcanzada una temperatura a la cual la manipulación sea sencilla, se retira el tubo de cuarzo de los hornos y es limpiado mediante la sonicación del residuo (parte del tubo en la que no se alcanza la temperatura crítica de síntesis; <90cm). Al finalizar, el producto de interés es extraído del tubo y es etiquetado según su localización en éste.

Figura 1. Sistema CVD usado para la síntesis de izquierda a derecha a)trampa aceptora de residuos orgánicos que no sufrieron reacción b) hornos tubulares c)sprayer utilizado para la evaporación de los precursores.

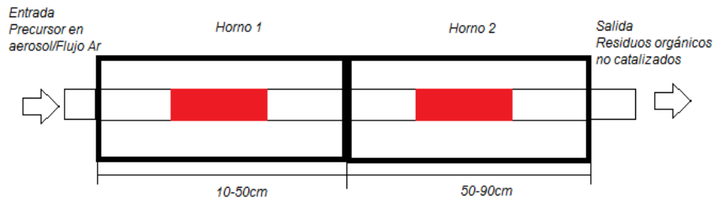


Figura 2. Secciones transversales y centímetros que abarcan en el tubo en el que se realiza la síntesis.

(ii) Extracción y caracterización de las muestras
Se procedió a realizar la extracción de muestras, ésto mediante el raspado del tubo en el cual se llevó a cabo la síntesis. Se raspó en intervalos de un centímetro, de 10 a 90 cm en términos de distancia a la boquilla, de manera que se analizó la obtención de un panorama general de nanotubos sintetizados a lo largo del tubo de cuarzo, y por lo mismo, en un rango variado de temperaturas.

Donde las temperaturas mayores, se presenta en las regiones centrales de cada horno (Figura 2). Debido a la poca concentración de los primeros y últimos centímetros, la extracción en esta zona se realizó en intervalos más grandes. Enseguida, se realiza la preparación de muestras para las técnicas de caracterización que correspondan, se preparan soluciones del producto obtenido usando etanol como solvente, que después se filtra y se deja secar.

Con el producto secado se procede a realizar soluciones de poca concentración, de ésta se añaden cantidades sustanciales de muestra a distintos pines correspondientes a cuatro muestras de importancia que fueron sometidas a microscopía electrónica de barrido. También se sometieron 5mg de producto provenientes del centímetro 33 a un proceso termogravimétrico en un TGA.

RESULTADOS Y DISCUSION

En la figura 3, se observa la curva que representa la variación de producto obtenido a lo largo del tubo. Se registró un máximo en el centímetro 35 con un peso de 79.37mg. Además, a lo largo del tubo, se obtuvo un total de 466.74mg. También se anotó un gasto volumétrico de 32ml en la solución precursora restante.

La curva presenta un comportamiento típico que se ha observado en trabajos anteriores y simultáneos a éste, es decir, la curva marca un máximo aparente en los centímetros localizados al centro del primer horno tubular. Sin embargo, no hay un segundo máximo como suele ocurrir en estas clases de síntesis, esto puede deberse a la condición del tubo, pues a pesar de que después de usarse fue tratado térmicamente aún contenía algunas imperfecciones en su interior.

En la figura 4, se muestran las imágenes obtenidas por microscopía SEM, en ellas es clara la presencia de formas tubulares rectilíneas en el orden nanométrico y micrométrico. También se aprecian algunas estructuras planas y no rectas que a primera vista parecieran nanolistones de carbono o estructuras grafíticas que no tienen una estructura ordenada, sin embargo, son necesarias más caracterizaciones para asegurar esto último.

Realizando un mejor análisis a las imágenes encontramos ciertas extremidades de nanotubos en las cuales es posible reconocer estructuras tubulares o cónicas que sobresalen de la boquilla del tubo externo, esto nos lleva a concluir, que lo más acertado es atribuir estos fenómenos a la predominancia del crecimiento en multi-capa al de una sola capa. Es decir, reconocemos de manera analítica que los nanotubos sintetizados son mayormente (sino es que todos) nanotubos de múltiple capa.

Por último, es importante mencionar que no se realizó ninguna caracterización que nos permitiera conocer estrictamente la composición de los nanotubos. Sin embargo, basándonos en los resultados arrojados por el análisis termgravimétrico (Figura 5) podemos asociar tal cambio en la temperatura de oxidación en comparación a CNTs puros a la presencia de nitrógenos en la red carbonosa que aportan centros susceptibles a la oxidación. De este modo, en comparación con los rangos de temperaturas de oxidación de algunos nanotubos de carbono de naturaleza pura (<600°C), la variación de respecto al sintetizado en este trabajo puede ser atribuido a la presencia de nitrógeno en la red. Sin embargo, esto no es concluyente debido a que las propiedades químicas dependen también de la estructura del nanotubo y no solo de su composición.

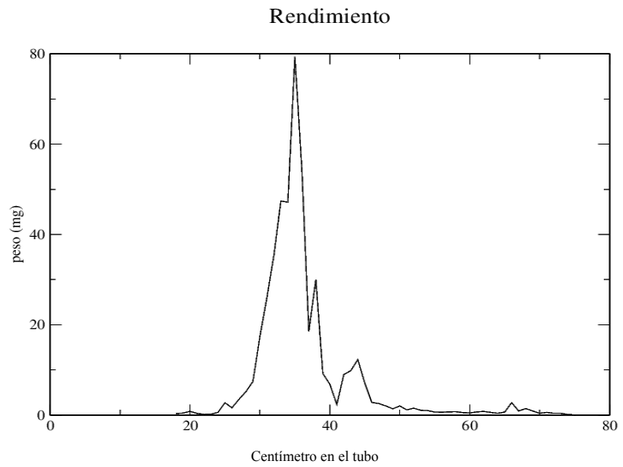


Figura 3. Curva correspondiente a la cantidad de muestra obtenida en un centímetro específico del tubo.

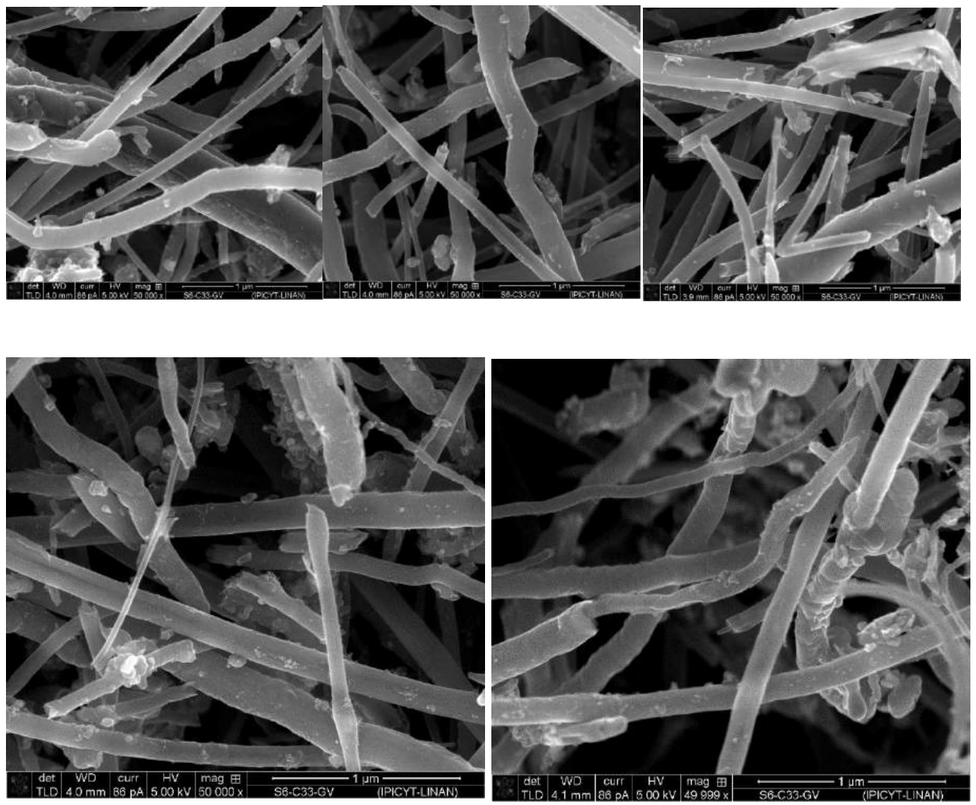


Figura 4. Microscopía SEM de la muestra obtenida en el centímetro 33

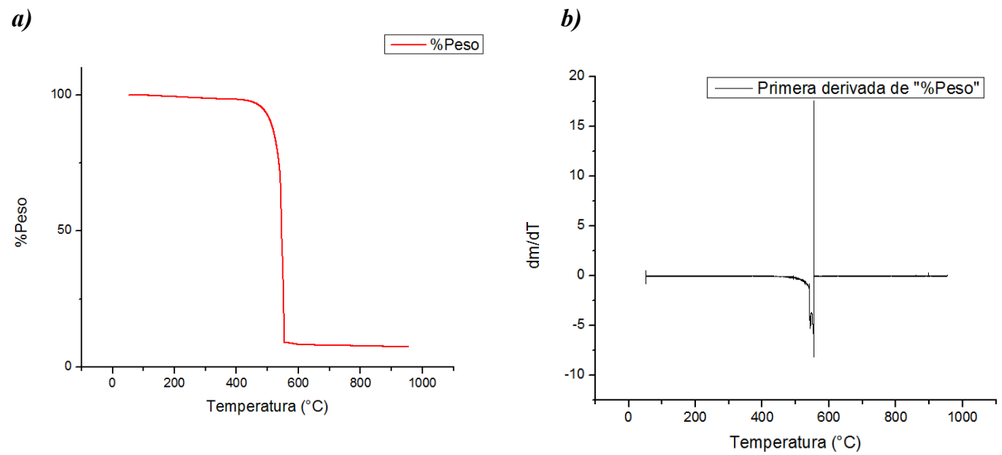


Figura 5. a) Resultados TGA % en peso vs temperatura. Se aprecia una súbita pérdida de masa alrededor de los 550°C. b) Primera derivada de la curva anterior, en la cual se observa el punto de mayor cambio en la pendiente, el cual representa la temperatura de oxidación 555°C.

CONCLUSIONES

Como las caracterizaciones han demostrado, se obtuvieron nanotubos de carbono en el centímetro 33 de la muestra, Los cuales presentan un promedio de 106 nm de diámetro, tienen una temperatura de oxidación de 555°C. Se atribuye el cambio drástico con respecto a CNTs puros a la presencia de nitrógeno en la matriz de carbono. Debido a la morfología observada en las imágenes SEM podemos inferior que los NCNTs obtenidos son de múltiple capa y no de una sola. Sin embargo, son necesarias más caracterizaciones para concluir con mayor seguridad.
A pesar de la presencia de nanotubos, se reconoce que no existe una buena homogenización de nanotubos, por lo tanto, es necesario trabajar con más detalle las condiciones necesarias para la estandarización de un proceso de buen rendimiento de NCNTs.

BIBLIOGRAFIA

- Cruz-Silva, E., Cullen, D. A., Gu, L., Romo-Herrera, J. M., Muñoz-Sandoval, E., López-Urías, F., ... & Terrones, H. (2008). Heterodoped nanotubes: theory, synthesis, and characterization of phosphorus− nitrogen doped multiwalled carbon nanotubes. ACS nano, 2(3), 441-448.
- Ayala, P., Arenal, R., Rümmeli, M., Rubio, A., & Pichler, T. (2010). The doping of carbon nanotubes with nitrogen and their potential applications. Carbon,48(3), 575-586.
- Wei, Q., Tong, X., Zhang, G., Qiao, J., Gong, Q., & Sun, S. (2015). Nitrogen-doped carbon nanotube and graphene materials for oxygen reduction reactions.Catalysts, 5(3), 1574-1602.
- Nxumalo, E. N., & Coville, N. J. (2010). Nitrogen doped carbon nanotubes from organometallic compounds: a review. Materials, 3(3), 2141-2171.
- Gracia-Espino, E., López-Urías, F., Kim, Y. A., Hayashi, T., Muramatsu, H., Endo, M., ... & Dresselhaus, M. S. (2013). Novel carbon-based nanomaterials: graphene and graphitic nanoribbons.

- Reyes-Reyes, M., Grobert, N., Kamalakaran, R., Seeger, T., Golberg, D., Rühle, M., ... & Terrones, M. (2004). Efficient encapsulation of gaseous nitrogen inside carbon nanotubes with bamboo-like structure using aerosol thermolysis. Chemical physics letters, 396(1), 167-173.
- Kong, H., Gao, C., & Yan, D. (2004). Controlled functionalization of multiwalled carbon nanotubes by in situ atom transfer radical polymerization. Journal of the American Chemical Society, 126(2), 412-413.
- Bom, D., Andrews, R., Jacques, D., Anthony, J., Chen, B., Meier, M. S., & Selegue, J. P. (2002). Thermogravimetric analysis of the oxidation of multiwalled carbon nanotubes: evidence for the role of defect sites in carbon nanotube chemistry. Nano Letters, 2(6), 615-619.
- Couteau, E., Hernadi, K., Seo, J. W., Thien-Nga, L., Mikó, C., Gaal, R., & Forro, L. (2003). CVD synthesis of high-purity multiwalled carbon nanotubes using CaCO 3 catalyst support for large-scale production. Chemical Physics Letters, 378(1), 9-17.

AGRADECIMIENTOS

Gracias al Dr. Emilio Muñoz Sandoval por la oportunidad que me brindo, el tiempo dedicado y experiencia compartida. También agradezco al equipo de trabajo del laboratorio de Polímeros del IPICYT por brindar un ambiente respetuoso y cómodo para trabajar. Le agradezco al Comité Organizador del 18° Verano de la Ciencia y la Universidad Autónoma de Querétaro por el interés en la formación científica. La realización de esta estancia no se habría podido llevar a cabo sin el proyecto Clave CB-2013-220744-CONACYT del Dr. Emilio Muñoz Sandoval y 3971 Bilateral 246023-CONACYT del Dr. Florentino López Urías. Además, agradezco a las instituciones que nos brindaron el apoyo y las facilidades en este Verano de la Ciencia; IPICYT, División de Materiales Avanzados, LINAN, Verano de la Ciencia de la Academia Mexicana de Ciencias y CONACYT.

CARACTERIZACIÓN DE METABOLITOS EN MICOBIONTES DE LÍQUENES

Miguel Ángel Vega Rivera[1] y Varinia López Ramirez[2]

RESUMEN

Los líquenes son organismos formados por la asociación simbiótica entre un hongo (micobionte) y un alga o cianobacterias (fotobionte), los líquenes tienen una tasa de crecimiento baja y con ello una escasa producción de metabolitos secundarios. El objetivo del presente proyecto fue evaluar la capacidad de producción de metabolitos secundarios en diferentes condiciones de crecimiento de 10 micobiontes aislados a partir de líquenes colectados en el estado de Guanajuato. Se realizaron ensayos de inhibición antimicrobiana usando extractos orgánicos de micelio desarrollado en caldo Dextrosa Sabouraud desarrollado en presencia y ausencia del fotobionte. Se observó una actividad biológica para los micobiontes de *Usnea florida, Hypotrachyna sp. y Caloplaca* sp. mostrando actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas sp*. y *Yarrowia lipolytica*, el evaluar sí la actividad de los extractos que presentaron inhibición en conjunto e individual será objeto de posteriores investigaciones.

ABSTRACT

Lichens are organisms formed by symbiotic association between a fungus (mycobiont) and an alga or cyanobacteria (photobiont), lichens have a low growth rate and thus low production of secondary metabolites. The objective of this project was to evaluate the production of secondary metabolites from 10 different mycobionts isolated from lichens collected in the state of Guanajuato. Antimicrobial inhibition assays were performed using organic extracts from mycelium developed in liquid medium Sabouraud Dextrose grown in presence and absence of photobiont. A biological activity for mycobionts *Usnea florida*, *Hypotrachyna sp.* and *Caloplaca sp.* was observed showing antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas sp*. and *Yarrowia lipolytica*, to evaluate if the metabolites activity presented into the extracts is due to their presence together or individually will be the subject of further investigations.

Palabras Clave: Líquenes, micobiontes, sustancias liquénicas, antimicrobiano, antifúngico

INTRODUCCIÓN

Los líquenes son organismos que están conformados por una asociación entre un hongo, denominado micobionte y un alga o cianobacteria conocida como fotobionte, los cuales comparten una estrecha relación simbiótica de mutualismo, en esta relación el micobionte, brinda principalmente soporte, protección y humedad al fotobionte, mientras que el fotobionte, tiene como función la producción de carbohidratos mediante la fotosíntesis (Montañez & Countiño, 2000). Los micobiontes son principalmente del grupo de los ascomicetos, basidiomicetos y unos pocos deuteromicetos. Los líquenes han sido aprovechados por los humanos como fuente de alimento, en la fijación de aromas en los perfumes y en la medicina tradicional debido a las sustancias liquénicas que son producidas principalmente por los micobiontes a partir de los glúcidos que le brinda el fotobionte (Vaillant-Flores & Romeu-Carballo, 2015). Muchas especies de líquenes se han reportado con actividad antibacterial, antitumoral, antipirética, citotóxica, así como su uso como bioindicadores de contaminación (Zelada & Abram, 2012). Los líquenes tienen una baja tasa de crecimiento la cual es de unos pocos milímetros o centímetros por año, además la producción de compuestos químicos se ve influenciada por las condiciones climatológicas, al sustrato sobre el que están

[1] Instituto Tecnológico Superior de Irapuato, Ingeniería Bioquímica; Carretera Irapuato – Silao Km. 12.5, Col. El Copal, 36821 Irapuato
[2] Instituto Tecnológico Superior de Irapuato, Ingeniería Bioquímica; Carretera Irapuato – Silao Km. 12.5, Col. El Copal, 36821 Irapuato, Gto, valopez@itesi.edu.mx

adheridos y a la intensidad de iluminación recibida (Robles C, Morales B, & Pastor de Abram, 1992), por lo cual, es muy importante el estudio de la producción de dichos compuestos químicos por parte del micobionte el cual tiene una mayor tasa de crecimiento con respecto al liquen en asociación y por lo que se podría obtener una mayor cantidad de compuestos químicos.

MÉTODOS Y MATERIALES

Activación de micobiontes

Las cepas de micobiontes que fueron previamente aisladas a partir de diferentes líquenes colectados en el estado de Guanajuato los cuales están etiquetados como: ORM-18, ORM-20, BEG #2, LPDS 003, Varal #2, SHN08, SL #1, VLR-2, JAVR XI y Arandas #9, y forman parte del cepario del Laboratorio de Diversidad e Interacción Microbiana del Instituto Tecnológico Superior de Irapuato. La activación de dichos micobiontes se llevó a cabo en cajas Petri con agar Dextrosa Sabouraud, las cuáles fueron incubadas a temperatura ambiente (25-30ºC) durante una semana.

Inoculación de micobiontes en caldo Dextrosa Sabouraud

Se inocularon 10 mL de caldo dextrosa Sabouraud con micelio de cada uno de los aislados de micobionte por duplicado, con la ayuda de un sacabocados con diámetro de 5 mm. Los tubos se colocaron de costado con un ángulo aproximado de 5° para obtener un mayor área de crecimiento e incubados a temperatura ambiente (26-30°C) durante cinco días.

Inoculación de suspensión algal al cultivo de micobiontes

En un tubo Falcón se tomaron 5 mL de agua estéril, se resuspendieron colonias de cultivo algal. Con un mililitro de ésta suspensión se inocularon tubos con micelios de micobiontes, este procedimiento se llevó a cabo con algas aisladas: *Bracteacoccus minor* y alga aislada del liquen *Melanelixia sp.* aún sin identificar.

Los cultivos de micobiontes con la suspensión algal se incubaron con un fotoperiodo de 16 hrs. luz y 8 hrs. de obscuridad durante 5 días, mientras que los cultivos de micobiontes sin suspensión algal se incubaron a temperatura ambiente.

Extracción orgánica de metabolitos

Para la extracción de metabolitos producidos por los micobiontes, el micelio de cada micobionte se depositó en tres tubos eppendorf, así mismo se tomaron 250 µL de sobrenadante en un cuarto tubo. El micelio se centrifugo a 13,000 rpm durante 10 min y se descartó el sobrenadante, posteriormente se añadieron 100 µL de acetona, acetato de etilo y éter de petróleo a cada tubo con micelio y sobrenadante, y se incubaron 24 horas a 4ºC antes de su uso.

Antibiogramas

Se inocularon individualmente cepas de *Staphylococcus aureus, Pseudomonas sp*. y *Yarrowia lipolytica* en 5 mL de caldo nutritivo y caldo YPD respectivamente, se incubaron toda la noche a temperatura ambiente y 120 rpm.

Para la realización de los antibiogramas se prepararon cajas de agar infusión cerebro corazón y YPD, las cuales fueron inoculadas con 100 µL del cultivo microbiano (con incubación no mayor a 24 horas), por extensión con ayuda de una varilla acodada.

Posteriormente, se depositaron en círculos de papel filtro de 5 mm de diámetro, 20 µL de cada extracto orgánico con el micelio del micobionte con suspensión algal, como del micobionte sin suspensión algal así como del sobrenadante. Se utilizaron como controles los solventes empleados (acetona, acetato de etilo, éter de petróleo), el caldo Dextrosa Sabouraud, el extracto orgánico de alga aislada con acetona y los extractos orgánicos de los líquenes correspondientes a los micobiontes con acetona, acetato de etilo y éter de petróleo.

Las cajas del ensayo inoculadas con *Pseudomonas sp*. y *Yarrowia lipolytica* se incubaron a temperatura ambiente, mientras que las cajas inoculadas con *Staphylococcus aureus* se incubaron a 37 °C, todos los cultivos se incubaron durante 24 horas.

Identificación de metabolitos secundarios

Los extractos orgánicos de los micelios de micobiontes que presentaron actividad antimicrobiana fueron evaluados por cromatografía de capa fina (CCF) para determinar los compuestos orgánicos presentes en el extracto. Para lo cual, se tomó una placa de sílica gel (60762 SIGMA-ALDRICH® Silica gel on TLC plates) y se agregaron los extractos orgánicos de cada muestra (10 µL), la placa se introdujo en la cámara de elución con la mezcla tolueno-ácido acético (170:30). Una vez concluida la corrida, la placa se revelo con yodo metálico y se determinaron las distancias correspondientes de cada banda para determinar los coeficientes de retención o Rf´s.

RESULTADOS

Los líquenes han sido reportados previamente por su capacidad de producir metabolitos secundarios con actividad antibiótica y antifúngica (Robles *et al*., 1992). Evaluar si los micobiontes obtenidos a partir de líquenes pueden producir dichos metabolitos fue el objetivo de este trabajo de investigación.

De los 10 micobiontes evaluados, encontramos que sólo los extractos obtenidos por los micobiontes etiquetados como LPDS 003, SL #1 y VLR-2 lograron inhibir el crecimiento bacteriano, mientras que solo el micobionte LPDS 003 logró inhibir el crecimiento de *Yarrowia lipolytica* (Tabla 1). La inhibición microbiana en todos los casos sólo se presenta cuando el micelio crece en presencia del alga y no cuando crece de manera independiente, esto sugiere una regulación metabólica del fotobionte sobre el micobionte.

Por otro lado, observamos que sólo en dos casos el extracto orgánico del sobrenadante del cultivo de micobionte donde los micobiontes LPDS 003 y SL #1 en presencia de alga, inhibieron el crecimiento de *Yarrowia lipolytica* y *Pseudomonas sp*., respectivamente; esto sugiere que el metabolito se sintetiza en presencia del alga y es exportado al medio extracelular.

Tabla 1. Condiciones de los ensayos en donde hubo inhibición del crecimiento microbiano.

Micobionte	Acetona			Acetato de etilo			Éter de petróleo		
	Sta	*Psp*	*Ylip*	*Sta*	*Psp*	*Ylip*	*Sta*	*Psp*	*Ylip*
LPDS 003	Ma		Ma, Sa	Ma					
SL #1	Ma, L	Ma, Sa, L		Ma, L	Ma, L		Ma, L	L	
VLR-2	Ma	Ma		Ma	Ma		Ma, L	Ma, L	

Sta: Staphylococcus aureus; Psp: Pseudomonas sp.; Ylip: Yarrowia lipolytica; Ma: Micelio con alga; L: extracto del liquen correspondiente; Sa: Sobrenadante del cultivo del micobionte en presencia del alga.

En la Figura 1, se muestra un ejemplo de los ensayos de inhibición con el micobionte SL #1 en el césped microbiano *Staphylococcus aureus*. Se puede observar que la inhibición de los extractos orgánicos de los micobiontes no es de la misma intensidad que la que obtiene con los extractos orgánicos del liquen.

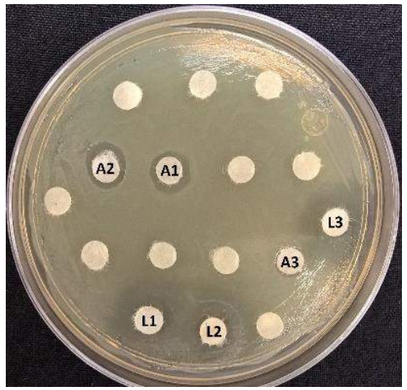


Figura 1. Halos de inhibición en el césped microbiano de *Staphylococcus aureus* con el micobionte y liquen de *Usnea florida*. A1: micelio con alga utilizando acetona, A2: micelio con alga utilizando acetato de etilo, A3: micelio con alga utilizando éter de petróleo, L1: liquen *Usnea florida* utilizando acetona, L2: liquen *Usnea florida* utilizando acetato de etilo y L3: liquen *Usnea florida* utilizando éter de petróleo.

Identificación de compuestos químicos presentes en los extractos orgánicos

Se realizó cromatografía de capa fina (CCF) para la identificación de compuestos presentes en los extractos que mostraron inhibición de crecimiento microbiano, en la Figura 2 se muestra el resultado de CCF donde se pueden observar las bandas de compuestos químicos presentes en los extractos orgánicos que lograron inhibir el crecimiento microbiano.

Los resultados obtenidos muestran diferentes compuestos, en el micobionte LPDS 003 presenta 3 bandas, en la banda 1 se identificó al ácido homosequíkaico (reportado para *Cladonia sp.* en Huneck & Isao, 1996), la banda 2 corresponde al ácido planaíco (reportado para *Lecidea sp.* por Huneck & Isao, 1996); ambas bandas se observaron en las cuatro muestras analizadas. Por otra parte, la banda 3 muestra al ácido isomurínico presente en los extractos orgánicos de acetona y acetato de etilo correspondientes al micelio desarrollado en presencia de alga (reportado para *Pertusuaria sp.* en Huneck & Isao, 1996).

En el caso del liquen SL #1 se observan 2 bandas, en la banda 1 se identifica un compuesto similar en todas las muestras que corresponde al ácido planaíco, mientras que en la banda 2 se observa un compuesto compartido entre micelio con presencia del alga con los solventes acetato de etilo y éter de petróleo y los líquenes con los 3 solventes, este compuesto es 2,4,5-tricloroliquexantona (reportado para *Pertusuaria sp*. en Huneck & Isao, 1996).

Por otro lado, en el liquen VLR-2 se obtuvieron 2 bandas con similares coeficientes de retención, en la primera se identifica un compuesto compartido por las 5 muestras correspondiente al ácido planaíco, mientras que en la segunda banda se observa un compuesto producido por el micobionte en presencia de alga con los solventes acetato de etilo y éter de petróleo así como por el liquen con acetona y acetato de etilo, identificado por Huneck & Isao, 1996 como el ácido placodiolico (reportado para *Rizhoplaca sp*.).

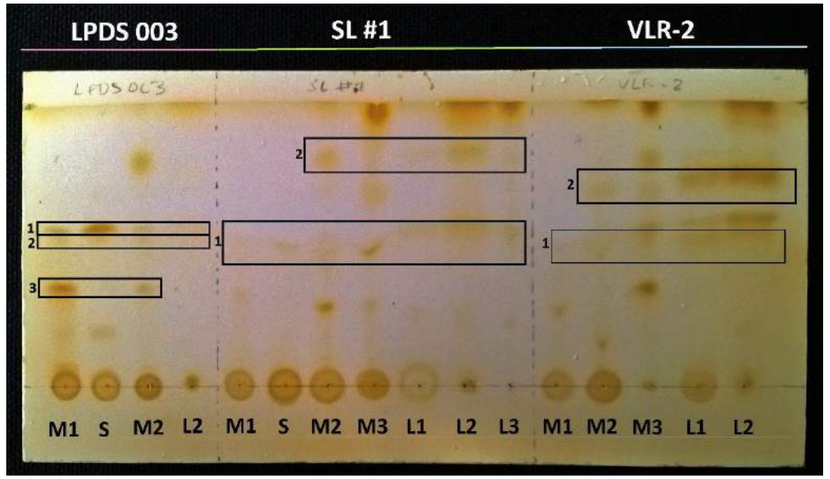


Figura 2. Cromatografía en capa fina de extractos orgánicos de micelios y líquenes. Se observan bandas que muestran compuestos similares en los micobiontes y sus respectivos líquenes. M1: corresponde al extracto de acetona del micelio del micobionte desarrollado en presencia del alga; S: el extracto de acetona del sobrenadante con alga, M2: corresponde al extracto de acetato de etilo del micelio del micobionte desarrollado en presencia del alga; M3: corresponde al extracto de éter de petróleo del micelio del micobionte desarrollado en presencia del alga, L1: extracto del liquen con acetona, L2: extracto del liquen con acetato de etilo, L3: extracto del liquen con éter de petróleo.

En la Tabla 2, se muestran los compuestos químicos de acuerdo a los coeficientes de retención o Rf´s obtenidos, estos compuestos están reportados en Huneck & Isao (1996), en cada micobionte se resolvieron diferentes bandas las cuales están indicadas en la Figura 2.

Tabla 2. Identificación de compuestos químicos de acuerdo a los Rf´s obtenidos por CCF.

Micobionte	No. de banda:Rf*	Compuesto
Caloplaca sp. (LPDS 003)	1: 0.56	Ác. Homosekikaico
	2: 0.50	Ác. Planaíco
	3: 0.35	Ác. Isomuronico
Usnea florida (SL #1)	1: 0.50	Ác. Planaíco
	2: 0.84	2,4,5-tricloroliquexantona
Hypotrachyna sp. (VLR-2)	1: 0.50	Ác. Planaíco
	2: 0.67	Ác. Placodiolico

*Factores de retención reportados en Huneck & Isao, 1996.

CONCLUSIONES

Los resultados descritos en este trabajo muestran la identificación de compuestos con actividad biológica producidos por micobiontes, algunos de los cuáles son compartidos entre micobiontes y sus respectivos líquenes. Nuestros resultados sugieren que la producción de dichos metabolitos secundarios por parte del micobionte requieren de la presencia del alga.

BIBLIOGRAFIA

Huneck, S., & Isao, Y. (1996). *Identification of Lichen Substances* (1st ed.). Springer. http://doi.org/10.1007/978-3-642-85243-5

Montañez, A. L., & Countiño, B. (2000). Los líquenes. *Laboratorio de Etnobotánica*, 64–65.

Robles C, J., Morales B, P., & Pastor de Abram, A. (1992). Liquenes y Sustancias Liquenicas. *Revista de Química.*, *VI*, 65–76.

Vaillant-Flores, D. I., & Romeu-carballo, C. R. (2015). Actividad antifúngica de extractos de tres especies de líquenes en cuba 1. *Agronomia Mesoamericana*, *26*(2), 345–350.

Zelada, B. R., & Abram, A. P. De. (2012). Estudio fitoquímico de Usnea durietzii. *Sociedad Química de Perú*, *78*(4), 264–276.

SÍNTESIS DE MATERIALES DE TITANIA Y ZIRCONIA UTILIZANDO MOLÉCULAS ORGÁNICAS COMO MODIFICADORES DE LA RED

Cecilia Vela Rea[1] y Gustavo Rangel Porras[2]

RESUMEN

La titania es un material ampliamente usado como catalizador heterogéneo, especialmente en reacciones fotocatalizadas para la degradación de moléculas orgánicas en sistemas acuosos. Por otra parte, la circonia es aplicada principalmente como soporte de catalizadores heterogéneos o materiales cerámicos de excelentes propiedades mecánicas. La modificación de los métodos de síntesis de ambos sólidos permite mejorar las propiedades químicas de su superficie. En el presente trabajo, se sintetizó TiO_2 por medio de precipitación de sales, mientras que ZrO_2 fue obtenida por el método sol-gel. La síntesis fue modificada mediante la inclusión de moléculas orgánicas desde las primeras etapas. Los sólidos obtenidos fueron caracterizados mediante espectroscopía Infrarroja y Raman, así como se determinó su posible capacidad para actuar como catalizador en la reducción de nitro-compuestos.

ABSTRACT

Titania is a material widely used as heterogeneous catalyst, especially in photocatalyzed reactions for the reduction of organic molecules in aqueous systems. On the other hand, zirconia is mainly applied as catalyst support or ceramic material with excellent mechanic properties. The modification of synthesis methods of both solids allows enhanced the surface chemistry properties. In this work, TiO_2 was synthesized by precipitation from their salts; meanwhile ZrO_2 was obtained by means of sol-gel process. The synthesis procedures were modified with the inclusion or organic molecules in the first steps. The obtained solids were characterized by Infrared and Raman spectroscopy; in addition, the possible capacity as heterogeneous catalysts was tested in the nitro compounds reductions.

Palabras clave: Titania, circonia, catálisis.

INTRODUCCIÓN

En una catálisis heterogénea el catalizador se encuentra en diferente fase a la de la mezcla de la reacción. Los beneficios de este tipo de catálisis es que se puede lograr su recuperación fácilmente de los productos de reacción. La catálisis heterogénea pasa por una serie de pasos: difusión, adsorción, reacción, desorción y difusión.

La aplicación de los óxidos de titanio en proceso de adsorción y catálisis es muy conocida, existiendo una gran cantidad de reportes referentes a su uso. La mayor parte de dichos estudios están enfocados a explorar las propiedades fotocatalíticas del material; sin embargo, se ha probado su eficiencia como fase

[1] División de Ciencias Naturales y Exactas. Departamento de Química. Colonia Noria Alta s/n. C.P. 36050. Guanajuato, Gto. cvr.17@hotmail.com
[2] División de Ciencias Naturales y Exactas. Departamento de Química. Cuerpo Académico Preparación, Procesamiento y Caracterización de Materiales Catalíticos y Cerámicos. Colonia Noria Alta s/n. C.P. 36050. Guanajuato, Gto. gporras@ugto.mx

activa o soporte de catalizador para diversas reacciones que no involucran procesos fotoquímicos. Se ha comentado, por ejemplo, que determinada fase cristalina de la titania puede contribuir a que un metal soportado presente preferentemente un plano expuesto en la superficie, logrando una mayor conversión y selectividad en la reacción. Una de las principales características que influyen directamente sobre la eficiencia de un catalizador heterogéneo es la química de la superficie de dichos sólidos; por ejemplo, se ha descrito la importancia de la presencia de superficies hidroxiladas del TiO_2 para llevar a cabo un proceso de adsorción de moléculas de agua, en donde la molécula de agua reacciona con un puente de oxígeno de la titania para dar lugar a dos grupos hidroxilos (OH). Sin embargo, la titania puede ser usada como soporte de catalizador para otro tipo de reacciones, en donde la naturaleza de sus grupos superficiales es un factor determinante en la actividad de dicho material.

En este trabajo se quiere obtener un catalizador eficiente el cual tenga una mayor cantidad de sitios activos. Para demostrar la funcionalidad de este catalizador se puede llevar a cabo una reacción modelo como es la reducción de nitrofenol, la cual si se lleva en menor tiempo la reducción completa del grupo nitro al grupo amino, nos indicará cuál es el catalizador con mayor eficiencia.

METODOLOGÍA

Síntesis de TiO_2 por precipitación a partir de $TiCl_4$

Se preparó una solución de $TiCl_4$ en medio ácido. A dicha solución se le adicionó guanina como director de la síntesis. Posteriormente se adicionó gota a gota una solución de NaOH hasta la obtención del precipitado. Finalmente el sólido fue calcinado a 500 °C a condiciones atmosféricas.

Síntesis de ZrO_2 por sol-gel

A una solución de alcóxido de circonia en isopropanol en un sistema a reflujo se le adicionó guanina como director de síntesis del material. En el sistema con agitación constante se adicionó agua gota a gota con HNO_3 como catalizador de las etapas de hidrólisis de la reacción, hasta la formación de un gel. Posteriormente, el solvente se evaporó en una estufa a 80°C por 24 horas. Finalmente el sólido se calcinó a 500 °C a condiciones atmosféricas.

Las etapas de la reacción de la síntesis de ZrO_2 son: 1) formación del enlace de metal con el grupo hidroxilo; 2) reacciones de condensación para la formación de la red de circonia.

$$(RO)_3\text{-}Zr\text{-}O\text{-}R + H_2O \rightarrow (RO)_3\text{-}Zr\text{-}OH + R\text{-}OH \quad (1)$$

$$(RO)_3\text{-}Zr\text{-}OH + (RO)_3\text{-}Zr\text{-}OH \rightarrow (RO)_3\text{-}Zr\text{-}O\text{-}Zr\text{-}(OR)_3 + H_2O \quad (2)$$

Preparación de los materiales de cobre soportados

Los materiales se impregnaron con cobre de acuerdo al siguiente procedimiento: se suspendió el sólido sintetizado de titania o circonia en una solución acuosa de $Cu(NO_3)_2$ en agitación constante, y se le adicionó lentamente una solución de NaOH hasta alcanzar un pH de 8. La solución se continuó en agitación a 80 °C hasta la evaporación completa del agua. Finalmente el sólido se secó y posteriormente calcinó a 500 °C.

Reacción de reducción de nitrofenol

Los materiales fueron utilizados para la reacción de reducción de 4-Nitrofenol con $NaBH_4$ en solución acuosa. El avance de la reacción se monitoreó usando un espectrofotómetro de Ultravioleta-Visible lamda 40 Perkin elmer. A partir de la adición del $NaBH_4$ se obtuvieron espectros a 5, 10, 20 y 30 minutos.

Caracterización de TiO_2 y ZrO_2

Los materiales sintetizados se caracterizaron con espectroscopía infrarroja, utilizando el equipo espectrofotómetro Spectrum 100, para determinar los grupos funcionales presentes en ellos y observar cómo evolucionaban con las diferentes condiciones. También se caracterizaron a través de espectroscopía Raman para observar las diferentes fases cristalinas que tengan los catalizadores sintetizados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1 se presenta un esquema de la posible conformación de los materiales de titania y circonia sintetizados. Se debe considerar que esta imagen es una representación teórica que no considera distorsiones en la estructura, sólo ejemplifica la formación de una superficie hidroxilada del material.

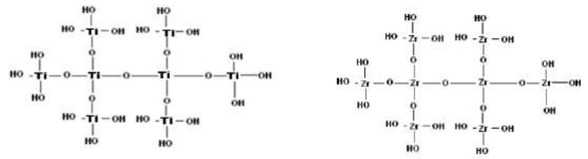


Figura 1. Posibles estructuras de TiO_2 y ZrO_2 respectivamente.

En la tabla 1 se muestran los 16 catalizadores que se sintetizaron con las distintas impregnaciones y temperaturas. Los cuales van a ser probados y comparados en la reacción de reducción de nitrofenol para identificar cuál es el catalizador que reduce en menor tiempo al grupo nitro del grupo amino.

Tabla 1. Catalizadores sintetizados con diferentes condiciones del tratamiento térmico.

Catalizador	Temperatura	Catalizador	Temperatura
TiO_2 (Blanco)	80°C	ZrO_2 + (Blanco)	80°C
TiO_2 + Guanina	80 °C	ZrO_2 + Guanina	80 °C
TiO_2 + Cobre	80 °C	ZrO_2 + Cobre	80 °C
TiO_2 + Cobre + Guanina	80 °C	ZrO_2 + Cobre + Guanina	80 °C
TiO_2 + Blanco	500 °C	ZrO_2 + Blanco	500 °C
TiO_2 + Guanina	500 °C	ZrO_2 + Guanina	500 °C
TiO_2 + Cobre	500 °C	ZrO_2 + Cobre	500 °C
TiO_2 + Cobre + Guanina	500 °C	ZrO_2 + Cobre + Guanina	500 °C

En la Figura 2 se observan los espectros infrarrojos de los cuatro catalizadores de TiO2 calcinados a 500 ° C. Para los catalizadores que no tienen guanina se observan picos característicos en 3400 y 3422 que corresponden a la vibración de estiramiento de OH. Los catalizadores que contienen guanina presentan bandas en 2920, 2923 y 2853 los cuales corresponden a la presencia del enlace C-H el cual se debe por la presencia de materia orgánica. Los catalizadores que tienen cobre impregnado tienen picos característicos en 1384. Los cuatro catalizadores contienen bandas entre 800-400 que corresponden a la vibración de estiramiento de Ti-O-Ti.

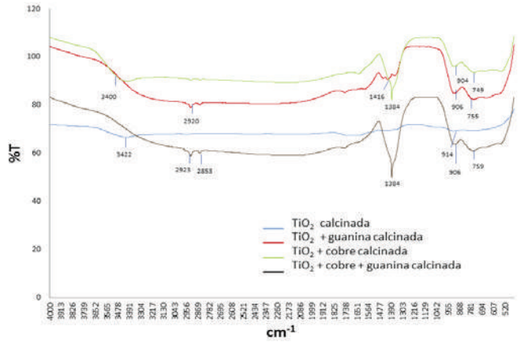


Figura 2. Espectros de IR de los catalizadores de TiO_2.

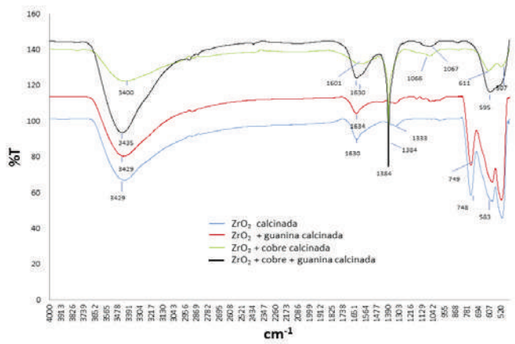
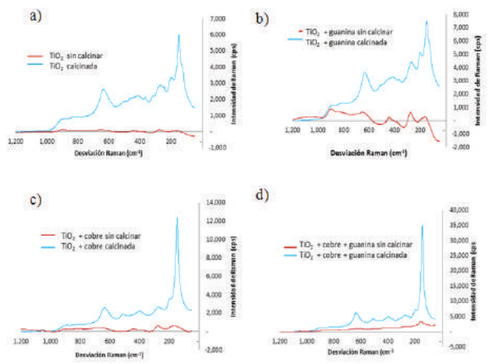


Figura 3. Espectros de IR de los catalizadores de ZrO_2.

En la figura 3 se observan los espectros IR de los catalizadores de ZrO_2, los picos de 1630, 1634 y 1601corresponden a vibraciones de estiramiento de C-O-C. También se observa el pico en 1384 que al igual con los IR de TiO_2 corresponde a la presencia de cobre. Los picos obtenidos en la región de 800-400 corresponden a las vibraciones de estiramiento de Zr-OZr.



En las figuras 4 y 5 se muestran los espectros en Raman de los catalizadores. En cada espectro se compara el catalizador a 60°C y calcinado a 500°C para observar las formaciones de las fases cristalinas. En biografías se encuentra que los espectros de TiO_2 y ZrO_2 en Raman al sintetizarse a temperaturas bajas no hay presencia de fases cristalinas y se muestran a intensidades bajas. Tal y como se observan en todos los espectros obtenidos, los espectros de línea roja se muestran a intensidades bajas de Raman en (cps).

Figura 4. Espectros Raman sin calcinar y calcinados de: a) TiO_2 b) TiO_2 + guanina c) TiO_2 + cobre d) TiO_2 + cobre + guanina

Es evidente que el tratamiento a altas temperaturas, espectros de línea azul, estabiliza la estructura cristalina en todos los espectros obtenidos tanto de TiO_2 como de ZrO_2.

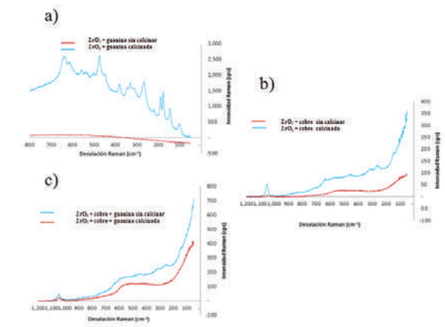


Figura 5. Espectros Raman sin calcinar y calcinados de: a) ZrO_2 + guanina b) TiO_2 + cobre d) TiO_2 + cobre + guanina

Tabla 2. Comparación de las señales de TiO_2.

Señales de fase cristalina anatasa (cm^{-1})	Señales de TiO_2 (cm^{-1})	Señales de TiO_2 + guanina (cm^{-1})	Señales de TiO_2 + cobre (cm^{-1})	Señales de TiO_2 + cobre + guanina (cm^{-1})
143	145	146	144	145
192	199	200	199	199
398	-	-	400	400
515	-	-	515	515
637	638	638	638	638

En la tabla 2 se muestran las señales presentes en los catalizadores sintetizados que corresponden a la fase anatasa, una de las fases principales de la TiO_2 que corresponde a una fase metaestable. Se puede observar en los espectros que no hay presencia de las otras fases principales de la TiO_2 como rutilo y broquita con fases estables y metaestables respectivamente. La fase rutilo tiene picos característicos en 235, 441 y 607.

El ZrO_2 tiene fases como la fase monoclínica con picos característicos en 181, 192 y 253, y fases tetragonales con picos característicos en 148 y 264. En los espectros de los catalizadores sintetizados no se observan muy bien los picos, sólo se observa tenuemente en 260 tanto en el catalizador con cobre y el de cobre + guanina. Se observa también un pico característico en 1050 a los catalizadores que tienen cobre impregnado.

En la figura 6 se presenta la reducción completa del nitrofenol con el catalizador de TiO_2 impregnado de cobre y guanina calcinada. A 415 nm se asigna al ión nitrofenolato, el cual al momento de adicionar el $NaBH_4$ a la reacción se forma de inmediato, y el primer espectro obtenido es el de ese momento. Posteriormente se obtuvieron espectros luego de 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35 minutos. En 300 nm es la

región asignada al aminofenol, y se observa que al inicio de la reacción no hay presencia de ese grupo, pero luego de haber pasado los 35 minutos está la señal

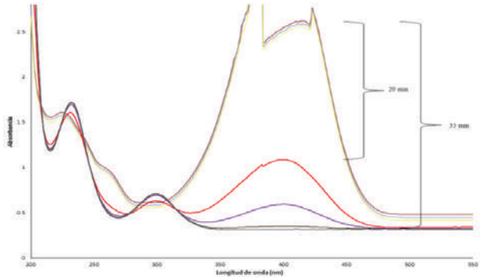
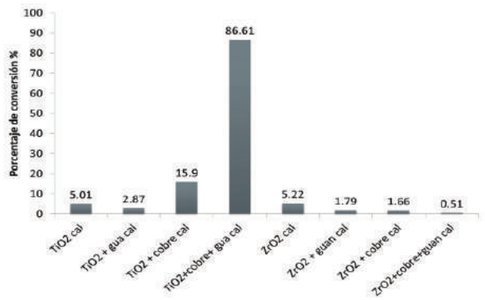


Figura 6. Reducción completa del nitrofenol con el catalizador de TiO_2 + cobre + guanina calcinada

Figura 7. Porcentaje de conversión de los catalizadores calcinados



..

completa, y se observa que ya no hay presencia del ión nitrofenolato, puesto que se ha reducido por completo el grupo nitro para dar lugar al grupo amino.

Para poder cuantificar las reducciones de los catalizadores y determinar el mejor catalizador se realizó una curva de nitrofenol, posteriormente se realizaron los porcentajes de conversión de cada catalizador con sus diferentes concentraciones a través de la ecuación de Lambert-Beer. Los resultados se muestran en la figura 7.

CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos podemos suponer que el material sintetizado que reduce el nitrofenol en menor tiempo es el la TiO_2 adicionada de guanina e impregnada de cobre calcinada ya que su porcentaje de conversión fue de 86.61%. Se demostró a través de los espectros en Raman de TiO_2 que al calcinar a los catalizadores se facilita la formación de la fase cristalina “anatasa”. También se encuentran señales representativas de la fase tetragonal de ZrO_2 al observarse en Raman. En IR se observan las señales características de Ti-O-Ti y de Zr-O-Zr.

BIBLIOGRAFÍA

1. G. Gusmano, G. Montesperelli, P. Nunziante, E. Traversa, A. Montenero, M. Braghini, G. Mattogno, A. Bearzotti; J. Ceram. Soc. Jpn.; 101 (1993) 1095.
2. A. Bahtat, M. Bouazaoui, M.M. Bahtat, C. Garapon, B. Jacquier, J. Mugnier; J. Non-Cryst. Solids; 202 (1996) 16.
3. C. Cristiani, M. Bellotto, P. Forzatti, F. Bregani; *J. Mater. Res.;* 8 (1993) 2019.
4. Structure and Composition of the Nanocrystalline Phases in a MgO-TiO2 System Prepared via Sol-Gel Technique
5. T. Matsumoto, Y. Murakami, Y. Takasu; *J. Phys. Chem. B;* 104 (2000) 1916.
6. J.K. Burdett; *Inorg. Chem.;* 24 (1985) 2244.

NUEVOS MATERIALES MAGNÉTICOS NANOCRISTALINOS Y CRISTALINOS PARA LA REFRIGERACIÓN MAGNÉTICA E IMANES PERMANENTES

Juan José Velázquez Reyes[1] y José Luis Sánchez Llamazares[2]

RESUMEN

La búsqueda de fuentes de energía alterna que sean amigables con el medio ambiente, se ha intensificado en los últimos años en las instituciones y centros de investigación a nivel mundial. La refrigeración magnética es una tecnología que pretende reemplazar los sistemas de enfriamiento convencionales al sustituir los procesos de compresión y expansión de gases, por la magnetización y desmagnetización de un sólido con elevado efecto magnetcalórico (EMC), efecto que presentan algunos materiales magnéticos en torno a su transición de fase. Las aleaciones $Fe_{1-x}Rh_x$ (x=51) presentan un EMC muy elevado; en el presente reporte se estudia el efecto del tratamiento térmico en la composición de fases y la transición del estado antiferromagnético (AFM) al ferromagnético (FM) en muestras de esta aleación obtenidas en forma de cinta por solidificación rápida mediante la técnica de temple rotatorio.

ABSTRACT

The search for alternative energy eco-friendly sources has intensified the last years in institutions and research centers worldwide. Magnetic refrigeration is a new technology that is intending to replace the conventional cooling systems, substituting the compression and expansion processes of gases by the magnetization and demagnetization of a solid with high magnetocaloric effect (MCE), effect that some magnetic materials have shown around their phase transition. The $Fe_{1-x}Rh_x$ (x=51) alloys exhibit a very high MCE; in this report the effect of the heat treatment is studied in phase composition and the transition from the antiferromagnetic (AFM) to the ferromagnetic (FM) state. The samples made of this alloy were obtained in ribbon form by means of rapid solidification by the rotating temple technique.

Palabras Clave: Refrigeración magnética, Efecto magnetocalórico, Transición de fase, Tratamiento Térmico

INTRODUCCIÓN

Aleaciones basadas en distintos compuestos que presentan elevado EMC se han obtenido y estudiado con anterioridad en el Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, IPICyT. Sin embargo, debido al interés de estudiar el EMC en torno a la temperatura ambiente, se han sintetizado recientemente aleaciones $Fe_{49}Rh_{51}$. Este sistema presenta el mayor EMC para una variación de campo magnético de 2 T asociado a una transición de fase de primer orden del estado antiferromagnético (AFM) al ferromagnético (FM). En el presente reporte se recoge la contribución del autor durante su estancia de 5 semanas en relación al efecto del tratamiento térmico en la transición AFM-FM y la composición de fases a temperatura ambiente para muestras de la aleación $Fe_{49}h_{51}$ obtenidas en forma de cinta por solidificación rápida mediante la técnica de temple rotatorio. Con este fin se hicieron mediciones de magnetización en función de la temperatura M(T) y se determinaron los patrones de difracción de rayos X a temperatura ambiente.

MARCO TEORICO

[1]Universidad de Guanajuato, División de Ciencias e Ingenierías, Lomas del Bosque 103, Lomas del Campestre, C.P: 37150, León, Guanajuato, velazquezrj2012@licifug.ugto.mx
[2]Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, División de Materiales Avanzados, Camino a la Presa San José 2055, Lomas 4ta sección, C.P: 78216, San Luis Potosí, San Luis Potosí jose.sanchez@ipicyt.edu.mx

La refrigeración magnética se basa en el EMC, que fue descubierto por Warburg en 1881 (Warburg, 1881), y que no es más que la emisión o absorción de calor de un material magnético cuando se le aplica/retira un campo magnético. Giauque y MacDougal utilizaron este efecto para alcanzar temperaturas ultra-bajas (0.25 K) haciendo uso de la sal paramagnética $Gd_2(SO_4)_38H_2O$ (Giauque y MacDougal, 1993). Por ello fueron galardonados con el premio Nobel en 1949 (Balli, Mahmed, Sari, Rahali y Hadorn, 2015).

En 1976 Brown utiliza gadolinio metálico para desarrollar el primer refrigerador magnético que operaba a temperatura ambiente (Brown, 1976). Con este fin utilizó placas de Gd como refrigerante y aplicó un campo magnético de 7 T producido por un electroimán superconductor.

Aún cuando el EMC gigante alrededor de la temperatura ambiente fue descubierto en 1990 en la aleación $Fe_{51}Rh_{49}$ (Annaorazov, Asatryan, Myalikgulyev, Nikitin, Tishin y Tyurin, 1992), el interés por el desarrollo de materiales magnetocalóricos y esta nueva tecnología de refrigeración llegó en 1997 cuando Pecharsky y Gschneidner, descubren el EMCG en el compuesto $Gd_5Ge_2Si_2$ (Pecharsky y Gschneidner, 1997). El mismo se debe a una transformación magnético-estructural de primer orden de un estado ferromagnético a un estado paramagnético.

El EMC en los sólidos ferromagnéticos resulta de la influencia del campo magnético aplicado a la estructura magnética del material. La entropía total de un sistema de este tipo es la suma de la entropía de la red, más la entropía de la estructura magnética, más la entropía de los electrones. Esta última es despreciable, por lo tanto:

$$S_{total} = S_{red} + S_{electrones} + S_{mag} \quad (1)$$

$$S_{total} = S_{red} + S_{mag} \quad (2)$$

Como es conocido, la entropía es una medida del desorden de un sistema físico, a mayor sea el desorden, mayor es la entropía (y viceversa). La entropía magnética S_{mag} es propia de un sistema de átomos con momento magnético propio y por tanto está asociada a la orientación o desorientación de los momentos magnéticos. Por esto, cuando un campo magnético externo es aplicado, los momentos se orientan y S_{mag} disminuye. De acuerdo a la Termodinámica, el cambio infinitesimal de entropía dS de un sistema magnético a presión constante, es función de la temperatura T y el campo magnético H, y viene dado por (Sears y Salinger, 1978):

$$dS(T,H) = \frac{C_H}{T}dT + \mu_o\left(\frac{\partial M}{\partial T}\right)_H dH \quad (3)$$

Donde C_H es la capacidad calorífica a $\mu_o H$ constante, μ_o es la permeabilidad magnética del vacío y $M(T,H)$ es la magnetización de la muestra. Estas magnitudes están expresadas en su valor por unidad de volumen.

En los materiales magnéticos se distinguen transiciones de fase de primer orden, en las que el material pasa de una estructura cristalina a otra o sufre una modificación estructural cambiando el volumen de la celda elemental y este cambio viene acompañado de un salto en la magnetización, o de segundo orden, en la que la estructura cristalina permanece inalterada y la estructura magnética pasa de forma continua del que coexisten las dos fases en equilibrio (fase magnética y fase estructural) y presentan una discontinuidad en la magnetización. También es posible distinguir fases continuas o de segundo orden, en la que la estructura cristalina permanece inalterada y la estructura magnética pasa de una forma continua de un estado a otro.

Los materiales magnéticos que presentan una transición de fase de primer orden, se caracterizan por su respuesta magnetocalórica aguda centrada a la temperatura de transición, y es en estos materiales en los que se encuentran los mayores valores de ΔS_{mag}. Por otra parte, en los materiales con transiciones de fase de segundo orden, ΔS_{mag} es máxima a la temperatura de Curie del material.

MÉTODOS Y MATERIALES

Como se mencionó anteriormente, las aleaciones estudiadas por nosotros tuvieron la composición $Fe_{49}Rh_{51}$. Para los tratamientos térmicos, se usó un horno *Thermolyne* modelo *48000*. Las aleaciones en forma de cinta fueron tratadas térmicamente: (a) a 1273 K (1000°C) y 1323 K (1050°C) durante 12h y 24h y enfriadas en agua helada; (b) a 973 K (700°C), en el horno de la opción de magnetometría del sistema PPMS modelo *Dynacool*. En este caso se programó una rama de 64 K/min.

Los difractogramas de las muestras en forma de cinta se determinaron en un difractómetro *SmartLab* de la firma *Rigaku*. Para determinar las curvas de magnetización en función de la temperatura M(T) (o curvas termomagnéticas), se utilizó la técnica de magnetometría vibracional (VSM). La muestra se coloca sobre un porta-muestra de cuarzo; las mediciones se hicieron en la plataforma *PPMS* modelo *DYNACOOL* de la firma *Quantum Design*. La magnetización puede ser calculada conociendo el momento magnético y la masa de la muestra. La representación gráfica de todos los datos medidos, se hizo con el software Microcal *Origin 8*.

RESULTADOS

Las Figuras 1, 3 y 5 presentan las curvas M(T) a 5 mT, 1 T y 2 T respectivamente, para las cintas. Como ya se mencionó, estas fueron tratadas a 700°C (973 K) entre 1 y 12 horas seguido de un enfriamiento en agua helada.

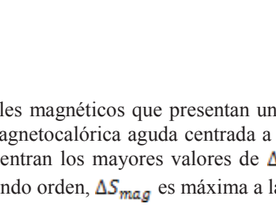


Figura 1. Curvas M(T) a 5 mT para cintas tratadas a 700°C y 1000°C a diferentes tiempos.

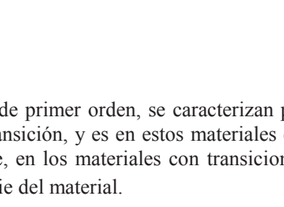


Figura 2. Curvas dM/dT de diferentes cintas a 5 mT.

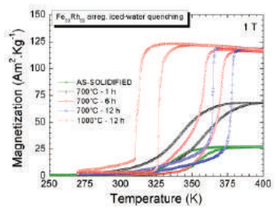


Figura 3. Curvas M(T) a 1 T para cintas tratadas a 700°C y 1000°C a diferentes tiempos.

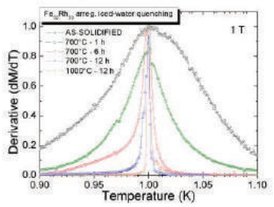


Figura 4. Curvas dM/dT de diferentes cintas a 1 T.

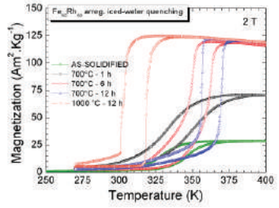


Figura 5. Curvas M(T) a 2 T para cintas tratadas a 700°C y 1000°C a diferentes tiempos.

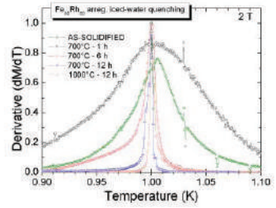


Figura 6. Curvas dM/dT de diferentes cintas a 2 T.

Las Figuras 2, 4 y 6 muestran la derivada de la magnetización respecto de la temperatura de estas muestras medidas para campos de 5 mT, 1 T y 2 T, respectivamente; para que las curvas sean comparables ambos ejes se normalizan al valor máximo de dM/dT y a la temperatura en que la derivada posee su punto de inflexión. Físicamente, este resultado nos da información de cuan abrupta es la transición en el material. Nótese que las curvas más anchas se obtienen para la muestra recién solidificada (as-solidified) y la muestra tratada a 700°C (973 K) por 1 h.

Las muestras tratadas 6 h y 12 h a 700°C (973 K) presentan una transición de fase AFM-FM más definida, aunque no todo lo abrupto que se desea, y una mayor magnetización. En estas figuras también se compara con la muestra tratada a 1000°C (1273 K) por 12 h. El efecto que tuvo aumentar la temperatura de tratamiento fue considerable pues como se puede apreciar, la transición de fase se reduce a alrededor de 325 K; compárese con las otras muestras que presentaban la transición a una temperatura por arriba de los 350 K.

En la Figura 7 se presenta un difractograma de la muestra recién solidificada (as-solidified) y de las muestras tratadas a 700°C (973 K) durante diferentes tiempos. Esto permite obtener información de la estructura cristalina de las fases que se forman en el material. La muestra recién solidificada presenta dos fases cristalinas; una cúbica centrada en las caras (fcc), y cúbica de tipo CsCl o fase B2 (Zwartzendruber, 1984). Las mismas se identificaron a partir de la bibliografía consultada. Nótese que al aumentar el tiempo de tratamiento térmico, la fase fcc se transforma en la fase B2.

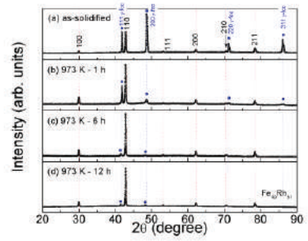


Figura 7. Difractogramas para las cintas recién solidificadas y tratadas a 700°C.

Las curvas termomagnéticas para un campo de 5 mT, 1 T y 2 T, de las cintas tratadas a 1000°C (1273 K) por 12 h y 24 h, y la cinta tratada a 1050°C por 12 h, son presentadas en las Figuras 8, 10 y 12, respectivamente. El enfriamiento de las tres muestras fue en agua helada. Las muestras tratadas a 1000°C (1273 K) tuvieron un valor de magnetización ligeramente mayor a la de la muestra tratada a 1050°C (1323 K). Sin embargo, la temperatura de transición de fase de esta última muestra se redujo hasta alrededor de 300 K.

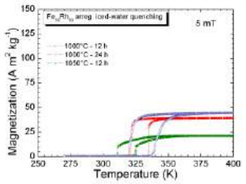


Figura 8. Curvas M(T) a 5 mT para cintas tratadas a 1000°C y 1050°C a diferentes tiempos.

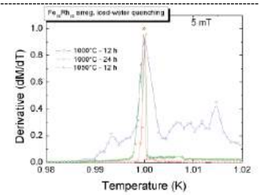


Figura 9. Curvas dM/dT de diferentes cintas a 5 mT.

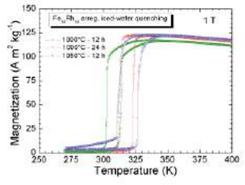


Figura 10. Curvas M(T) a 1 T para cintas tratadas a 1000°C y 1050°C a diferentes tiempos.

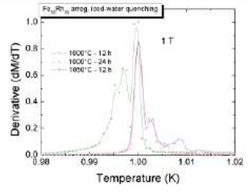


Figura 11. Curvas dM/dT de diferentes cintas a 1 T.

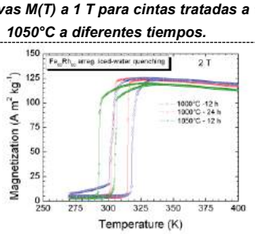


Figura 12. Curvas M(T) a 2 T para cintas tratadas a 1000°C y 1050°C a diferentes tiempos.

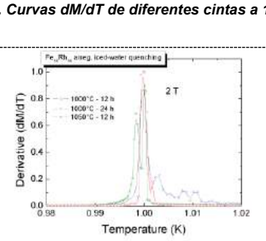


Figura 13. Curvas dM/dT de diferentes cintas a 2 T.

Las curvas de la derivada de la magnetización respecto de la temperatura (normalizadas en ambos ejes), se muestran en las Figuras 9, 11 y 13. La cinta tratada a 1050°C (1323 K) por 12 h no presenta una transición tan abrupta como la cinta tratada a 1000°C (1273 K) por 24 h. No obstante como tendencia tenemos que a mayor tiempo de tratamiento térmico, la transición de fase es más brusca.

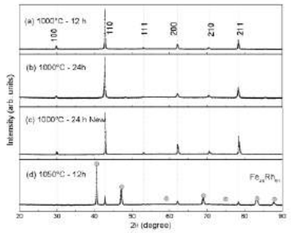


Figura 14. Difractogramas para las cintas tratadas a 1000°C y 1050°C.

La información de la estructura cristalina de las fases que presenta el material a temperatura ambiente se presenta en la Figura 14. Nótese que las cintas tratadas a 1000°C (1273 K) presentan cambios muy ligeros en la estructura cristalina que se identifica como una fase B2 (Zwartzendruber, 1984). Sin

embargo la cinta tratada a 1050°C (1323 K), parece presentar la formación de una fase distinta que no pudo ser identificada.

CONCLUSIONES

En el presente reporte se muestra que para la aleación magnetocalórica $Fe_{49}Rh_{51}$ el tratamiento térmico juega un papel muy importante en la transición magneto-estructural AFM-FM que este presenta. Si bien el presente tratamiento permite conseguir un valor de magnetización elevado, la temperatura y tiempo de tratamiento, así como enfriamiento juegan un papel importante en la temperatura y lo abrupto de la transición. El aumento de la temperatura de tratamiento térmico reduce la temperatura de la transición mientras que un tiempo de tratamiento prolongado y enfriamiento brusco la hace más abrupta lo cual es determinante para la utilización de este material en la refrigeración magnética a temperatura ambiente. Por su parte la caracterización por difracción de rayos X mostró que el aumento del tiempo de tratamiento térmico puede resultar en la aparición de fases distintas a la deseada (CsCl).

BIBLIOGRAFIA

SEARS, F.W. and SALINGER, G. L. (1978). *Termodinámica, Teoría Cinética y Termodinámica Estadística,* Barcelona: Editorial Reverte, S. A.

ZHUKOV, A. (2016). *Novel functional magnetic materials. Fundamentals and applications,* San Sebastián: Springer Editorial

WARBURG, E. (1881). "Magnetische untersuchungen" en *Annals of Physics*, Núm. 13, [pp.141-164].

GIAUQUE, W. F. and MACDOUGALL, D.P. (1993). "Attainment of temperature below 1° absolute by demagnetization of $Gd_2(SO_4)_3\,8H_2O$" en *Physical Review,* Núm. 9, Vol. 43, Mayo, [pp. 768-768].

BROWN, G. V. (1976). "Magnetic heat pumping near room temperature" en *Journal of Applied Physics,* Núm. 8, Vol. 47, Agosto, [pp. 3673-3680].

ANNAORAZOV, M. P., ASATRYAN, K. A., MYALIKGULYEV, G., NIKITIN, S. A., TISHIN, A. M. and TYURIN, A. L. (1992). "Alloys of the Fe-Rh system as a new class of working material for magnetic refrigerators" en *Cryogenics,* Núm 10, Vol. 32, Febrero, [pp. 867-872].

PECHARSKY, V. K. and GSCHNEIDNER, K. A. (1997). "Giant magnetocaloric effect in $Gd_5(Si_2Ge_2)$" en *Physical Review Letters,* Núm. 23, Vol.78, Junio, [pp. 4494-4497].

ZWARTZENDRUBER, L. J. (1984). "The Fe-Rh (iron-rhodium) system" en *Bulletim of alloy phase diagram,* Núm. 5, Vol.5, October, [pp. 456-462].

M. BALLI, C. MAHMED, O. SARI, F. RAHALI, J. C. HADORN. (2011). "Engineering Of The Magnetic Cooling Systems: A Promising Research Axis For Environment And Energy Saving" en *World Engineers' Convention,* No., pp.. Consultada en https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01185990 (fecha de consulta 05-07-2016).

DISEÑO DE UN NANOSOPORTE PARA LA INMOVILIZACIÓN DE PROTEÍNA BSA

Mayra Liliana Vera Pérez[1] y Aldo Amaro Reyes[2]

RESUMEN

En este trabajo se llevaron a cabo la síntesis de nanosoportes magnéticos, magnetita, con una relación molar 2:1 de Fe^{3+} y Fe^{2+} respectivamente a partir de diferentes sales de hierro con el objetivo de inmovilizar enzimas para lograr una mayor estabilidad térmica y pH, una mejor eficiencia catalítica por lo que la inmovilización de enzimas puede tener aplicaciones a nivel comercial como industrial debido a su facilidad de separación de las enzimas de la mezcla de reacción y su bajo coste; en este trabajo se utilizó lo que es la proteína BSA por lo que se analizó la capacidad de retención del nanosoporte, se calculó la cantidad de grupos aminos libres por medio del ensayo de reticulación.

ABSTRACT

In this work we were carried out synthesis of magnetic nanosoportes, magnetite, with a molar ratio 2: 1 of Fe3 + and Fe2+ respectively from different iron salts in order to immobilize enzymes for a better thermal stability and pH, better catalytic efficiency so the immobilization of enzymes may have applications in commercial and industry due to their ease of separation of the enzymes the reaction mixture and low cost; was used in this work the BSA protein so that the binding capacity was analyzed of the nanosoporte, the amount of free amino groups was calculated by assaying cross-linking.

Palabras Clave: nanosoporte, magnetita, enzima, BSA, grado reticulante, quitosano

INTRODUCCIÓN

La nanotecnología ha tenido grandes avances proporcionando diferentes nanoestructuras que sirven como soporte para la inmovilización de enzimas debido a sus potenciales aplicaciones ya sea en la biotecnología y áreas biomédicas. La inmovilización de enzimas sobre diferentes tipos de soportes tiene como objetivo mejorar la estabilidad, hacer más fácil la separación, su posible reutilización en operaciones continuas, mejorar la eficiencia catalítica para la inmovilización, tiene ventajas para aplicaciones comercial e industrial debido a la comodidad en el manejo, facilidad de separación de las enzimas de la mezcla de reacción, bajo coste de producto y un posible aumento de la estabilidad térmica y pH entre otras. La magnetita (Fe_3O_4) es un material ferromagnético donde el campo magnético de origen atómico es producido por un dipolo o un momento magnético y cada uno está ordenado con los otros, es decir está unido por fuerzas cohesivas, es un material de uso común por sus fuertes propiedades magnéticas y su baja toxicidad.

La BSA (albúmina sérica bovina) es una proteína ampliamente utilizada en la industria biomédica, es un componente importante en la producción de muchas drogas terapéuticas y pruebas diagnósticas, es soluble en agua y es una cadena polipéptica simple.

Debido a que la magnetita es sintetizada con una matriz de quitosano se puede medir el grao reticulante entre el soporte y las enzimas, el ensayo del grado reticulante determina el porcentaje de grupos aminos

[1]Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Ingeniería; Cerro de Las Campanas S/N, Las CampanasC.P: 76010, Santiago de Querétaro , Querétaro, rb19.vera@gmail.com
[2]Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Química; Cerro de Las Campanas S/N, Las CampanasC.P: 76010, Santiago de Querétaro , Querétaro, aldo.amaro@uaq.mx

libres en la muestra de nanopartículas soporte iniciales y las nanopartículas soporte funcionalizado después de la reticulación; la cantidad de grupos amino libres en la muestra de ensayo es proporcional a la absorbancia óptica de la solución. (Y. Yuan et al., 2007).

MÉTODOS Y MATERIALES

Síntesis de soporte
Se realizó la síntesis de magnetita que cuenta con una matriz polimérica de quitosano que sirva de soporte en la inmovilización de proteínas y enzimas para esto se utilizaron los reactivos sulfato de hierro (II) hepta-hidratado, nitrato de hierro (III) nona-hidratado, cloruro de hierro (III), quitosano (de bajo peso molecular), dimetilsulfóxido, genipino y ninhydrin reagent solución al 2% proporcionados por Sigma Aldrich; nitrato férrico proporcionado de Golden Bell reactivos. La síntesis de magnetita se realizó con una proporción 2:1 de hierro-quitosano (donde se pesaron 300mg de quitosano y 600mg de hierro); se preparó una relación molar de 2:1 de Fe^{3+} y Fe^{2+} respectivamente, lo que corresponde a 7.16mmol de Fe^{3+} y 3.58mmol de Fe^{2+}.

Calentar 30 ml de ácido acético al 1% añadir el quitosano y mantener en calentamiento con agitación regular hasta que se disuelva completamente el quitosano, se lleva a sonicar por 10minutos (con amplitud al 70% y potencia aproximada de 21000J). Calentar 30 ml de agua destilada al vacío (figura 1) después agregarle 0.7174g de cloruro de hierro(II) y 1.1618g de cloruro de hierro(III), añadir la mezcla a la solución de quitosano y llevar a sonicar por 10 minutos. Para mayor comodidad se separa la mezcla en 2 tubos falcón de 50 ml y agregarle a cada tubo 2.5ml de una solución de hidróxido de amonio en etanol 4:1 y llevar a agitación constante por 24horas. Las muestras se centrifugan (en la centrifuge 5804R eppendorf) a 5000rpm por 5 minutos a 20°C, se retira el sobrenadante y se hace un lavado con una solución buffer pH7 con etanol 1:1 (figura 2) y se vuelve a centrifugar repitiéndose el proceso tres veces; después las muestras son llevadas a la mufla por 24horas a 80°C. Se repite el proceso de síntesis con las diferentes sales de hierro manteniendo la relación molar 2:1 Fe^{3+} y Fe^{2+}.

Figura 1. Sistema de calentamiento al vacío usado en la síntesis de magnetita

Figura 2. Soporte magnetita/quitosano

La prueba de retención fue realizado para los diferentes tipos de magnetita sintetizada donde se pesó en un tubo eppendorf una cantidad de mínima de cada muestra por lo que la cantidad de magnetita que pude retener un imán de neodimio de medio centímetro de largo muestra la magnetita con un mejor propiedad magnética.

Cinética de adsorción
Preparar una solución de genipino al 1% en 1.5ml de dimetilsulfóxido y dejarlo reaccionar por una hora; preparar una solución amortiguadora con 4.475ml de 0.1M de ácido cítrico y 8.025 ml de 0.2M de fosfato de sodio dibásico y aforar a 25ml para un pH6; preparar una solución de BSA 1mg/ml en NaCl al 0.15M de la cual se harán diluciones a 10, 20, 30 µl/ml; en un tubo eppendorf pesar 50mg de magnetita y

agregarle 700 µl de la solución amortiguadora, 200 µl de la solución de BSA y 100 µl de solución de genipino; cada 10 minutos se colocan 100 µl de la muestra en las placas de microceldas junto con 100 µl de reactivo de Bradford y analizar con λ=595nm en el lector de microplacas (Bio-Rad iMark microplate reader) durante una hora.

Determinación de grado de reticulación
La medición del grado de reticulación se hizo en base al procedimiento seguido por (Y. Yuan et al., 2007) se utilizó para el ensayo ninhydrin reagent solución al 2%; se tomaron 10mg de la muestra se agregaron 200 µl de ninhydrin reagent y se colocó en baño seco por 10 minutos a 100°C, se deja enfriar a temperatura ambiente y se toman 75 µl de la muestra colocando la en las microplacas y se le agrega 150 µl de etanol (analizar con λ=570nm) ; para la cuantificación se realiza una curva estándar de glicina 1mM/ml.

RESULTADOS

Para la síntesis de magnetita se utilizaron diferentes sales manteniendo una relación molar de 2:1 de Fe^{3+} y Fe^{2+} para obtener diferentes soportes y comprobar su propiedad magnética; como se puede observar en la Tabla1 la síntesis con mayor rendimiento fue a través de sales de cloruro de hierro con un rendimiento de 51.21%. Al colocar la misma cantidad de muestra de cada una de las síntesis para la capacidad de retención magnética se puede observar que la síntesis de magnetita a partir de sales de Nitrato Fe^{3+} y Sulfato Fe^{2+} muestra la más baja retención y por ende menor capacidad magnética mientras que la magnetita a partir de sales de Cloruros Fe^{3+} y Fe^{2+} presentó mayor retención es decir una mejor capacidad magnética.

Tabla1. Síntesis de magnetita a partir de diferentes sales así como su rendimiento y capacidad de retención.

Magnetita	Rendimiento (%)	Retención (g)
Cloruros Fe^{3+} y Fe^{2+}	51.21%	0.3747g
Nitrato Fe^{3+} y Sulfato Fe^{2+}	31.36%	0.0172g
Nitrato Fe^{3+} y Cloruro Fe^{2+}	27.27%	0.3576g
Cloruro Fe^{3+} y Sulfato fe^{2+}	46.81%	0.3478g

Para las pruebas de cinética de adsorción se utilizó el soporte de magnetita a partir de sales Cloruros Fe^{3+} y Fe^{2+} que presento la mayor retención, como se muestra en la figura 3 se realizaron diferentes pruebas a diferente concentración de proteína de BSA manteniendo la cantidad de 50mg de soporte, la muestra con 30 µg/ml de BSA fue la única que mostro una condición descendente es decir que el soporte retuvo cierta cantidad de proteína debido a la reticulación ocurrida entre la BSA y el quitosano del soporte gracias a la acción de genipino como agente reticulante mientras que con concentraciones bajas la retención fue escaza.

En la figura 4 se observa la cantidad de BSA que es retenida por el soporte en un periodo de dos horas donde en el minuto 80 muestra la máxima cantidad que retuvo el soporte y después de este tiempo la acción reticulante del genipino va decayendo por lo que se muestra una gran absorbancia de la proteína.

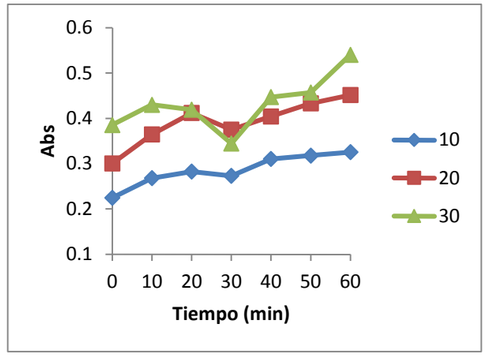


Figura3. Absorbancias de 50 mg de soporte de magnetita de cloruros con concentraciones de 10, 20 y 30 µg/ml BSA

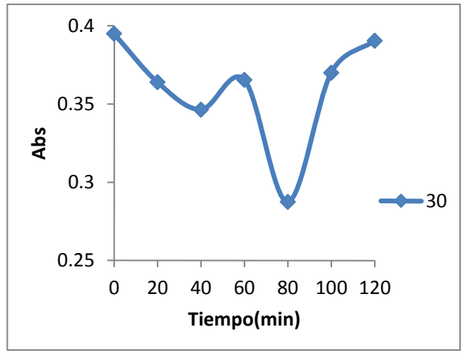


Figura 4. Absorbancias de 50mg del soporte magnetita de cloruros en pH6 con una concentración de 30 µg/ml BSA

En la figura 5 se muestran las absorbancias de BSA que es retenida por el soporte en un periodo de una hora donde se trabajó con un pH 5.5 con una cantidad de 300mg de soporte, el rango de las muestras no varía demasiado antes de los 50 minutos debido a que el aumento de cantidad del soporte mantuvo una estabilidad en la retención de BSA en vez de mostrar un comportamiento descendente que indica el incremento de retención del soporte con respecto al tiempo. La figura 6 muestra las absorbancias donde se realizó la combinación de soportes [Nitrato Fe^{3+} y Cloruro Fe^{2+}] y [Cloruro Fe^{3+} y Sulfato fe^{2+}], se observa un mejor comportamiento descendente que la cinética de absorción del soporte a base de cloruros de hierro (fig.5) por lo que obtuvo una mejor absorción de proteína con respecto al tiempo.

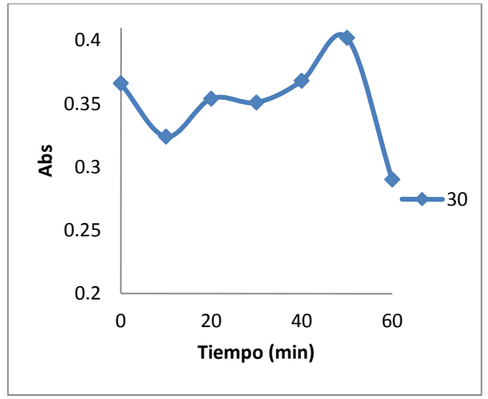


Figura 5. Absorbancias de 300mg del soporte magnetita de cloruros en pH5.5 con una concentración de 30 µg/ml BSA

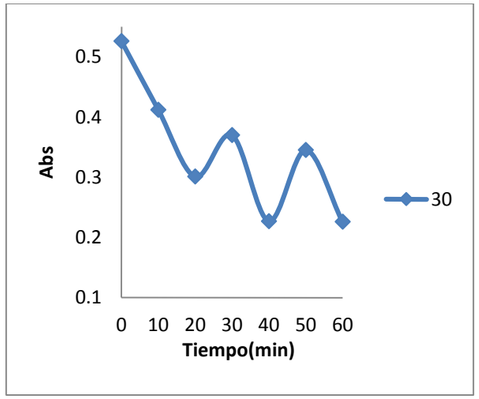


Figura 6. Absorbancias 300mg del soporte combinado en pH5.5 con una concentración de 30 µg/ml BSA

La tabla 2 se observan los parámetros para calcular el grado reticulante como las concentraciones de los grupos aminos libres antes de la reticulacion ($NHN_{inicial}$) y después de la reticulación (NHNfinal) con la proteína BSA en los dos soportes obtenido el de cloruros de hierros y el soporte combinado; así como el

número de moles aproximaos de la muestra, el cálculo del grado de reticulación se llevó a cabo por el método de (Y. Yuan et al., 2007) ; entre menor sea el porcentaje del grado de reticulación menor cantidad de grupos aminos libres habrá en la muestra, es decir, existe un mayor grado de retención entre el soporte y la proteína. El soporte de cloruros muestra un menor grado de reticulalación en comparación con el soporte combinado, a pesar de que éste muestre una mejor cinética de absorción que el soporte de cloruros en un medio de pH5.5.

Tabla2. Grado reticulante

Magnetita	Concentración(*μg*)	Moles NH_2	Grado reticulante%
Cloruros NHN_{final}	143,08	0,23	33,09
Cloruros $NHN_{inicial}$	213,83	0,34	
Combinación NHN_{final}	139,81	0,23	61,62
Combinación $NHN_{inicial}$	364,25	0,59	

CONCLUSIONES

La síntesis de los soportes magnéticos fue exitosa debido a que presentaba una característica magnética sin embargo no fue posible realizar una caracterización a las muestras para determinar el tamaño de partícula, algunos autores reportan un tamaño de 20-500 nm (Dussán Medina, 2008); el mejor resultado de la inmovilización enzimática se dio a través de la retención de la muestra soporte de combinado/BSA sin embargo la muestra con menor grado de reticulacion fue el de cloruros/BSA, es decir, presentaba una menor cantidad de grupos aminos libres ya que la mayoría fue retenida por el soporte después un periodo prolongado (24horas) que ayudo en las interacciones del soporte-BSA. Lograr la mayor retención de enzimas en el soporte magnético y que se mantenga constante con el paso de tiempo puede llegar a tener aplicaciones en la industria en la separación de las enzimas de la mezcla de reacción, entre otras aplicaciones.

BIBLIOGRAFIA

Y. Yuan, B.M. Chesnutt, G. Utturkar y W.O. Haggard (2007) “The effect of cross-linking of chitosan microspheres with genipin on protein release” Carbohydrate Polymers 68, 561–567

Shakeel Ahmed Ansari a, Qayyum Husain (2012) “Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review” Volume 30, Issue 3, Pages 512–523

Dussán Medina, Kelly Johana (2008) “Inmovilización de enzimas en nanoestructuras magnéticas para aplicaciones industriales (tesis de maestría)” Universidad Nacional de Colombia sede Manizales

ELECTROADSORCIÓN DE CROMO EN CARBÓN ACTIVADO

Karla Gissela Zavala Arias[1] y Lucía G. Alvarado Montalvo[2]

RESUMEN

El siguiente trabajo presenta los resultados obtenidos al estudiar la adsorción y electroadsorción de Cr(III) sobre carbón activado. Las concentraciones empleadas fueron desde 80 a 200 ppm, observándose una remoción de hasta 99% del cromo. La máxima capacidad de adsorción reportada fue de 59.52 mg Cr/g carbón. Por otro lado se observó que dicha capacidad se incrementa tanto por la presencia de grupos OH^- en su superficie así como por la aplicación de un campo eléctrico.

ABSTRACT

The present study demonstrates results obtained from experiments of trivalent chromium adsorption and electroadsorption in activated carbon. The concentrations used were from 80 to 200 ppm, observing a removal of Cr (III) of 99%. The maximum capacity of adsorption reported was of 59.52 mg Cr/ g carbon. On the other hand it was observed that the maximum capacity of adsorption is incremented by the presence of OH^- groups on carbon surface such as in the application of an electric field.

Palabras Clave: Cromo trivalente, Carbón Activado, Adsorción, Electro-adsorción.

INTRODUCCIÓN

A partir de la Revolución Industrial la mayoría de los procesos industriales se han acelerado drásticamente; actividades minero-metalúrgicas, militares, textiles, automovilísticas entre otras, han mostrado cambios significativos desde entonces, su demanda incrementa al ritmo del desarrollo de nuevas tecnologías, desencadenando terribles consecuencias ambientales (Departamento de Geografía e Historia, 2016). En este sentido, la contaminación por metales pesados es una problemática actual que concierne a la población mundial, donde la principal causa es su liberación descontrolada mediante efluentes de desecho de diversas industrias(Valdés Perezgasga, 1999). Uno de los metales pesados que se encuentra en este caso y representa una amenaza de impacto ambiental, es el cromo, ya que han sido reportadas toneladas de cromo hexavalente como consecuencia de actividades industriales en Edo. de México y León, Gto. (Instituto Nacional de Ecología, 2007; García, 2014); como es sabido, dicho metal en estado hexavalente es causante de mutaciones y daño en material genético (Celso de Mello Farías et al., 2011). Por anterior, se han empleado diversos métodos de remoción, aun y cuando se encuentre en estado trivalente, ya que por interacción del medio puede cambiar su estado de oxidación. Entre los métodos utilizados para su remoción, podemos destacar el empleo de técnicas de intercambio iónico sobre resinas poliméricas,

[1] Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Facultad de Ciencias Químicas; Av. Dr. Manuel Nava #6, Zona Universitaria, C.P:78210, San Luis Potosí, SLP. karlazavala93@hotmail.com
[2] Universidad de Guanajuato, Departamento de Ingeniería en Minas, Metalurgia y Geología; Ex Hda. San Matías s/n, Col. San Javier; C.P:36025, Guanajuato, Gto. lucia.alvarado@ugto.mx

coagulación-floculación, precipitación química, sedimentado y adsorción sobre varios materiales adsorbentes; sobre éste último, el empleo de carbón activado es uno de los métodos más utilizados gracias a su estabilidad físico-química, capacidad de regeneración y costos de operación relativamente bajos, y es en este sentido, que se ha estudiado el uso del carbón activado en la remoción de Cr(VI) de soluciones acuosas (Leyva et al., 2008). Con el mismo propósito, se ha sintetizado carbón activado a partir de precursores naturales (planta *Zizaniaca duciflora*) empleando soluciones de H_3PO_4 y ácido tartárico que generan un tamaño de microporo ideal así como un acondicionamiento adecuado, donde los resultados obtenidos han sido favorables, indicando que el éxito de la técnica depende en parte a un adecuado pre tratamiento del carbón (Liu et al., 2014). Por otro lado, la Universidad de Jinan en China, ha empleado el cromo remanente del carbón como colorante de cristales, con objeto de eliminar por completo la acumulación de dichos metales tóxicos (Wang et al., 2016).

A pesar de que el uso de carbón activado en adsorción muestra eficacia, se ha intentado aumentar su rendimiento al aplicar un potencial eléctrico, siendo prometedor puesto que las condiciones de reacción son reproducidas de forma precisa y los procesos de oxidación y reducción son más selectivos y controlados fácilmente mediante la medición del potencial del electrodo (Zakaria, 2014). En 1960 se realizaron estudios empleando electrodos porosos de carbón activado para la desalinización de agua de mar, en 1980 se investigó la eliminación de especies como Cr(VI), Mo(VI), W(VI), V(IV) y V(V) procedentes de aguas residuales utilizando telas de carbón activado, resultando que la adsorción de todos los iones se incrementaba al aplicar un campo eléctrico a excepción del V(IV) (Afkhami et al., 2002); lo mismo sucedió con la remoción de Diacetato de mercurio de solución acuosa (A. Wahby et al., 2011) y la adsorción sobre materiales carbonosos de arsénico disuelto en agua (Morallón et al., 2009).

Como se puede ver, existen antecedentes que demuestran que el uso de carbón activado puede ayudar a eliminar metales pesados de soluciones acuosas y que el aplicar un potencial eléctrico ofrece ventajas, por lo que el objetivo del presente trabajo es estudiar la adsorción de Cr(III) sobre carbón activado acondicionado con KOH y posteriormente incorporar procesos de electro-adsorción con la finalidad de estudiar los cambios en la capacidad de adsorción y remoción del cromo trivalente.

MÉTODOS Y MATERIALES

Las soluciones de Cr (III) se prepararon a partir de $CrCl_3$ $6H_2O$, el carbón activado utilizado fue marca Hycel acondicionado con solución de KOH, grado reactivo (85 %, Monterrey), las mediciones de masa de carbón se realizaron en balanza analítica Precisa 205 A SCS, fue utilizada una placa de agitación multiposición Velp, la agitación se llevó a cabo en todos los experimentos a 600 rpm; el pH y la conductividad de los filtrados fueron medidos con equipos Oakton; después de cada etapa de adsorción las muestras fueron filtradas y analizada su concentración mediante un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer 3100.

Acondicionamiento del carbón. 50 g de carbón activado fueron puestos en contacto con 500 mL de una solución 1 N de KOH en agitación durante 30 minutos, posteriormente dicho carbón fue filtrado y secado a 100 °C.
Dosificación. Con objeto de determinar la cantidad mínima necesaria de carbón activado acondicionado para efectuar los experimentos posteriores, se realizaron pruebas con distintas cantidades de carbón activado: 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.35, 0.4. 0.5, 1.0, 2.0 y 3.0 g; éstas se añadieron a 95 mL de una solución de 100 ppm de Cr(III) y se mantuvieron en agitación durante 2 horas.
Cinética. 0.5 g de carbón activado acondicionado se puso en contacto con 95 mL de una solución de Cr(III) con una concentración inicial de 100 ppm a distintos tiempos: 1, 2, 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90, 120, 150, 180 y 240 minutos.

Isotermas. La capacidad de adsorción del carbón activado con la solución de Cr(III) fue evaluada mediante 2 experimentos, con 0.5 y 1.0 g respectivamente, para determinar las isotermas de adsorción tipo Langmuir y Freundlich, en cada experimento. Las concentraciones de Cr(III) empleadas para ambos casos fueron: 80, 100, 120, 140, 160, 180 y 200 ppm, en un volumen de 100 mL con un periodo de agitación de 15 minutos.
Electroadsorción. La experimentación de electroadsorción se llevó a cabo en una celda de microelectrólisis, se emplearon electrodos de grafito. Sobre la superficie de contacto del electrodo de trabajo se colocaron 3.3 mg de carbón activado previamente acondicionado con ayuda de una solución de Nafión marca Aldrich, posteriormente se introdujo en una estufa a 100 °C por 45 minutos. Se realizaron corridas con la superficie de grafito (blanco) y con la capa de carbón activado. La solución problema fue de igual manera Cr(III) 100 ppm; el potencial fue medido respecto a un electrodo de referencia de Hg/Hg_2SO_4. Se utilizó una ventana de potencial de -2.5 a 2.5 V.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Dosificación. La finalidad de este experimento fue encontrar la cantidad mínima de carbón activado acondicionado necesaria para efectuar correctamente el fenómeno de adsorción en los experimentos posteriores. En la **Figura 1a** se aprecia que a partir de los 0.3 g de carbón la concentración de Cromo es removida significativamente del medio, sin embargo la máxima capacidad de remoción, del 98.25%, se logra al emplear 0.5 g, por lo que se destina esta cantidad para las siguientes pruebas. Por otro lado, en la **Figura 1b** se muestra la variación del pH respecto a la cantidad de masa de carbón utilizada, donde se aprecia que el pH del medio inicialmente es ácido, éste varía con el incremento de carbón empleado, a partir de los 0.5 g comienza a estabilizarse con valores entre 8 y 9. Lo anterior, se presenta como una respuesta del medio, ya que el carbón fue acondicionado con hidróxido de potasio, por lo que al adsorber cromo trivalente, grupos oxhidrilos se liberan al medio provocando basicidad del medio.

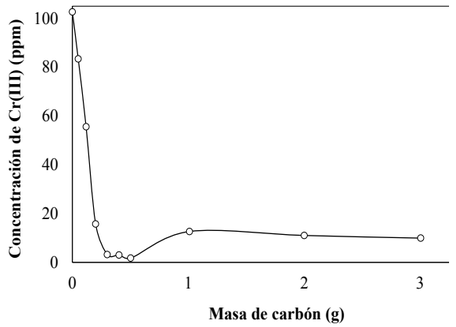


Figura 1a. Dosificación: Cambios de [Cr] vs la masa de carbón utilizada

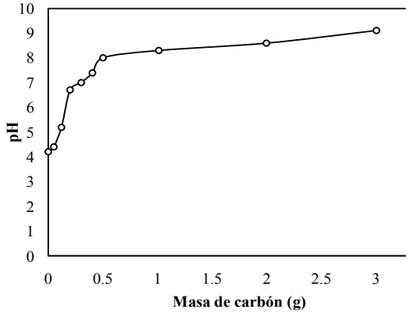


Figura 1b. Cambios de pH durante prueba de dosificación.

Cinética. El objetivo de esta prueba fue conocer el tiempo requerido para que el cromo fuese adsorbido por el carbón activado. Como se aprecia en la **Figura 2a** se observa cómo la remoción sucede casi de forma instantánea, pues desde el primer minuto se logra una remoción que llega al equilibrio. La máxima remoción se reporta al obtener 0.98 ppm en el medio, es decir, se alcanzó una remoción del 99.02%; por otro lado, los cambios en el pH, mostrados en la **Figura 2b** muestran el pH con menor acidez al minuto 15, debido a la presencia de grupos OH^- en el medio que fueron desplazados de la superficie del carbón cuando el cromo fue adsorbido, punto coincidente el máximo de remoción de cromo del medio. Sin

embargo los cambios de pH a través del tiempo son mínimos, variando de 8.3 a 8.7; sin embargo, después de las variaciones, se mantuvo constante con un valor de 8.6.

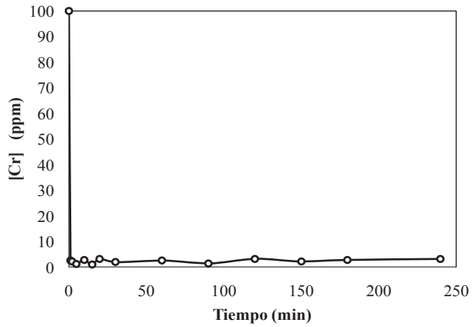


Figura 2a. Cinética: variación de la [Cr] vs tiempo

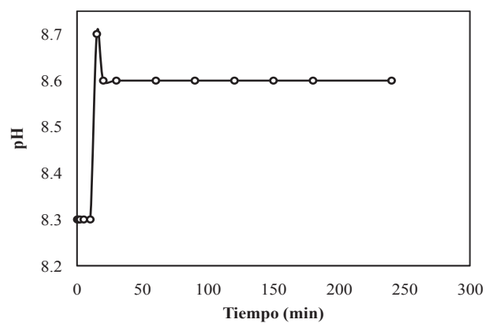


Figura 2b. Variación del pH del medio vs tiempo

Isotermas. La capacidad de adsorción fue analizada mediante los modelos de Langmuir y Freundlich. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Experimento 1. Al emplear 0.5 g de carbón el modelo de Freundlich arroja un coeficiente de correlación lineal más cercano a 1 que el modelo de Langmuir, **Figura 3b,** donde R^2=0.99, es decir que los datos experimentales obtenidos se adaptan de mejor manera a éste modelo matemático representado por la siguiente expresión: $q_e = KC_e^n$.

Experimento 2. Al emplear 1 g de carbón a diferencia del Experimento 1, el modelo de mayor ajuste fue el de Langmuir, obteniendo una R^2=0.9837 como se observa en la **Figura 4a,** donde su modelo matemático está representado por la siguiente expresión: $1/q_e = 1/q_{máx} + 1/(q_{máx} K C_e)$. Como resultado final, la máxima capacidad de adsorción se obtuvo en el **Experimento 2,** ésta está representada por el parámetro $q_{máx}$ obtenido al graficar $1/q_e$ vs $1/C_e$, siendo este valor de **59.52 mg** de Cr por g de carbón activado. El mejor ajuste en el modelo de Langmuir representa un mayor ajuste, el cual supone que la superficie del carbón activado es homogénea, es decir que las posiciones disponibles para que el cromo sea adsorbido es equivalente y que las moléculas adsorbidas no interaccionan entre sí.

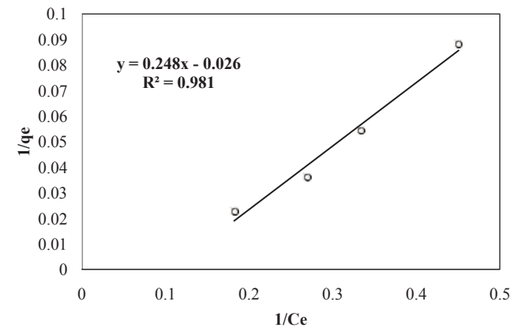


Figura 3a. Experimento 1: Modelo de Langmuir

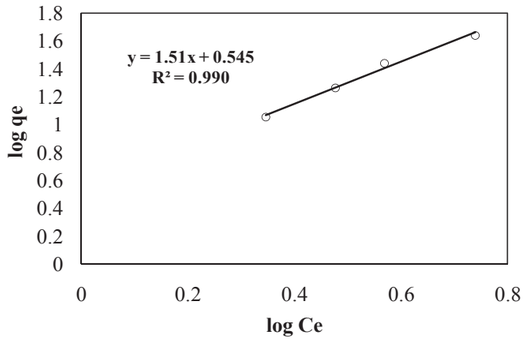


Figura 3b. Experimento 2: Modelo de Freundlich

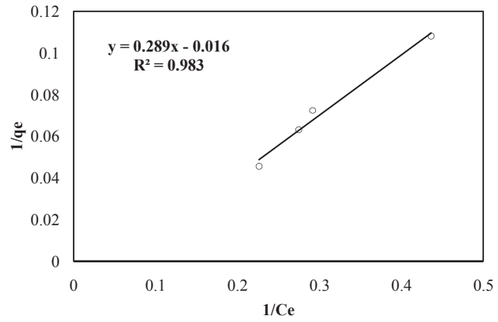


Figura 4a. Experimento 2: Modelo de Langmuir

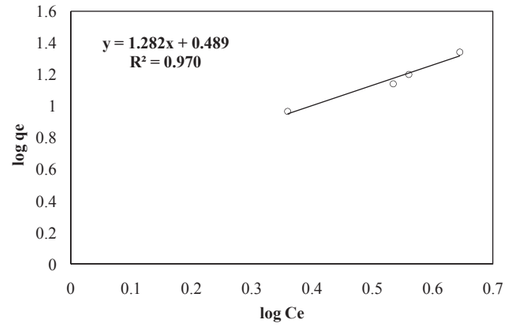


Figura 4b. Experimento 2: Modelo de Freundlich

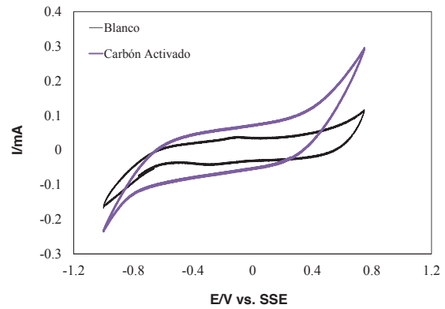


Figura 5. Capacidad de Electro-adsorción del cromo en ausencia y presencia de carbón activado al aplicar un potencial en un rango de -2.5 a 2.5 V.

Electro-adsorción. Como puede observarse en la Figura 5, la respuesta en corriente aumenta al emplear carbón activado sobre la superficie del electrodo de grafito (blanco) debido a que éste, más allá de la atracción generada por el campo eléctrico aplicado, aporta grupos OH^- superficiales que incrementan la afinidad de adsorción del Cr(III). La respuesta encontrada nos señala que se aumenta la adsorción del Cr(III) en más del 100% respecto a la respuesta en grafito, donde dichas diferencias se refieren a la señal capacitiva, es decir, adsorción de dichos iones sobre el sustrato. Por otro lado, la respuesta señala una capacidad de adsorción y desorción efectiva, al verse favorecido el proceso en ambas direcciones.

CONCLUSIONES

Emplear carbón activado para la remoción de cromo de soluciones acuosas resultó ser una alternativa efectiva ya que el fenómeno de adsorción a pesar de no ser altamente específico, se lleva a cabo a partir del primer minuto, empleando una cantidad relativamente baja de carbón. La máxima capacidad de adsorción fue de **59.52 mg Cr/ g** de carbón activado, cabe mencionar que para alcanzar esta capacidad se sugieren concentraciones de cromo por debajo de las 200 ppm. Por otro lado se comprobó que la electro-adsorción ofrece numerosas ventajas a la técnica como el poder controlar el proceso de adsorción, así como facilitar la desorción del cromo del carbón activado, posibilitando su regeneración y futura reutilización.

BIBLIOGRAFIA

Afkhami , A., & Conway, B. (2002). Investigation of removal of Cr(VI), Mo(VI), W(VI), V(IV) and V(V) oxy-ions from industrial waste-waters by adsorption and electroadsorption at high-area carbon cloth. *US National Library of Medicine: PubMed.gov*.

Celso de Mello Farías, P., & Soares Chaves, A. (2011). Transgenic Plants for Enhanced Phytoremediation - Physiological Studies. *Genetic Transformation*, 306-320.

Departamento de Geografía e Historia. (07 de 2016). *Tema 3: Las Revoluciones Industriales*. Obtenido de http://perseo.sabuco.com/historia/revolucionesindustriales.pdf

García, C. (02 de 01 de 2014). En Guanajuato, 22 puntos críticos de contaminación. *La Jornada*, pág. 23.

Instituto Nacional de Ecología. (15 de 11 de 2007). *Instituto Nacional de Ecología "Los efectos de la contaminación: es el caso de las sustancias tóxicas persistentes"*. Recuperado el 15 de 06 de 2016, de http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/467/yarto.html

Leyva, R., Flores, J., Díaz, P., & Berber, M. (2008). Adsorción de Cromo (VI) en Solución Acuosa sobre. *Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Facultad de Ciencias Químicas, Centro de Investigación*.

Liu, H., Liang, S., Gao, J., Ngo, H. H., Guo, W., Guo, Z., & Wanga, J. (2014). Enhancement of Cr(VI) removal by modifying activated carbon developed from Zizania caduciflora with tartaric acid during phosphoric acid activation. *ELSEVIER: Chemical Engineering Journal*, 168–174.

Morallón, E., Arias Pardilla, J., Calo, J., & Cazorla Amorós, D. (2009). Arsenic species interactions with a porous carbon electrode as determined with an electrochemical quartz crystal microbalance. *Science Direct: Electrochimica Acta*, 3996-4004.

Valdés Perezgasga, F. (Septiembre de 1999). La contaminación por metales pesados en Coahuila, México. *En Defensa del Ambiente, A.C.*

Wahby, A., Abdelouahab-Reddam, Z., Mail, R. E., & Stitou, M. (2011). Mercury removal from aqueous solution by adsorption on activated carbons prepared from olive stones. *Springer Link*, 603-609.

Wang, Z., Huang, M., & Liu, S. (2016). ReutilizationoftheCrionsadsorbedonactivatedcarbonascolorantsinglasspreparation. *ELSEVIER: Journal of Environmental Chemical Engineering*, 1555-1560.

Zakaria, T. (2014). *intercambio iónico sobre resinas poliméricas, coagulación-floculación, precipitación química, sedimentado y adsorción sobre varios materiales adsorbentes, entre los cuales destaca el carbón activado por su actividad, estabilidad y capacidad de regeneració.* Alicante: Universidad de Alicante.

IMPLEMENTACIÓN DE UNA PINZA MAGNÉTICA PARA APLICACIONES BIOLÓGICAS

Edgar Alberto Zúñiga Pérez[1] y Rosario Esperanza Moctezuma Martiñón[2]

RESUMEN

En el presente estudio se implementó una pinza magnética mediante el uso de alambre de cobre enrollado sobre un núcleo de hierro en una configuración de tipo solenoide, con el propósito de que al hacer pasar corriente por el alambre se indujera un campo magnético especialmente intenso en el centro del núcleo. El núcleo de hierro se construyó de tal manera que el campo magnético en el centro del solenoide se concentrara en la punta del núcleo, para lo cual fue construida con un diámetro muy pequeño para poder manipular la menor cantidad posible de partículas magnéticas a la vez. Se automatizó la fuente de corriente utilizada mediante un programa en LabVIEW que permitió la aplicación de corrientes variables en el tiempo. Finalmente, se prepararon distintas muestras con partículas magnéticas para probar la pinza magnética.

ABSTRACT

In the present study we perform a magnetic tweezer by coiling copper wire into an iron core in a solenoid type configuration. When the current passes through the wire, a magnetic field is induced especially intense in the center of the core. The iron core was built such that the magnetic field in the center of the solenoid was concentrated in the tip of the core, it was built with a very small diameter to manipulate the fewest possible amount of magnetic particles at the same time. The system was automatized by means of a program designed in LabVIEW that controls the current. Finally, we prepared distinct samples with magnetic particles to test the magnetic tweezer.

Palabras clave: pinza magnética, partículas magnéticas, mecanotransducción.

INTRODUCCIÓN

La técnica de pinzas magnéticas se ha convertido en una valiosa herramienta para el estudio y manipulación de moléculas simples. Se trata de una técnica flexible, económica y relativamente fácil de implementar que permite el estudio de sistemas biofísicos, y que ha permitido caracterizar por ejemplo, las propiedades elásticas y el enrollamiento del ADN, además de la actividad dinámica de las enzimas del ADN (Iwijn & Cees, 2012). También se ha utilizado para realizar mediciones reológicas y para caracterizar la viscoelasticidad de materiales suaves en el régimen no lineal, debido a la alta precisión que puede ser obtenida utilizando controles en tiempo real para la posición de la pinza y la corriente, y a las altas fuerzas que pueden ser producidas utilizando la pinza a distancias de solamente unos cuantos micrómetros de la muestra, todo esto fácilmente adaptable a un microscopio con una cámara para realizar grabaciones que pueden ser analizadas posteriormente (Philip & Ben, 2007). Con el uso de partículas magnéticas cubiertas con ligandos específicos que permiten su unión a la superficie celular y la técnica de pinzas magnéticas, ha sido posible el estudio de las propiedades celulares de mecanotransducción, es

[1] Instituto de Investigación en Comunicación Óptica, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Karakorum No. 1470, Lomas 4ª. Sección, C.P. 78210, San Luis Potosí, S.L.P., MÉXICO, zperezedgar@gmail.com

[2] Instituto de Física, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Manuel Nava No. 6, Zona Universitaria, C.P. 78290, San Luis Potosí, S.L.P., MÉXICO; rosario@ifisica.uaslp.mx

decir, el estudio de la activación de señales celulares, a través de estimulación mecánicas inducidas al activar el campo magnético producido por la pinza magnética (Nathan, 2010).

En el presente estudio, se llevó a cabo la construcción del arreglo experimental de unas pinzas magnéticas con el propósito de que en el futuro este mismo pueda ser utilizado para realizar experimentos de mecanotrasducción en distintos tipos celulares. Para aumentar la inducción magnética de la pinza, se utilizó un diseño basado en un electroimán con un núcleo de hierro. Se acondicionaron distintos tipos de diseños encontrados en la literatura para utilizar recursos de bajo costo que permitieran la obtención de fuerzas útiles para la realización de experimentos con partículas magnéticas, además de que se buscó que la pinza fuese lo suficientemente precisa y selectiva para poder manipular solamente unas cuantas partículas al mismo tiempo. Para lograr controlar con precisión la corriente aplicada a la pinza, se programó una aplicación en LabVIEW para poder manipular una fuente de corriente programable. Se prepararon muestras con partículas magnéticas para verificar su manipulación por medio de las pinzas magnéticas a través de un microscopio y se grabaron varios videos.

MARCO TEORICO

Una de las principales leyes en el electromagnetismo es la Ley de Biot-Savart, la cual nos permite calcular el campo magnético generado por una corriente eléctrica. En su usual forma la ley establece la contribución al campo magnético generado por una corriente circulando en un conductor de longitud unitaria según:

$$\delta \boldsymbol{B} = \frac{\mu_0}{4\pi r^2} i\, \delta \boldsymbol{l}\, X\, \boldsymbol{u} \tag{1}$$

Donde i es la corriente circulando en un elemento de longitud $\delta \boldsymbol{l}$ de un conductor, r es la distancia radial, $\boldsymbol{u}$ es un vector unitario a lo largo de la dirección radial, $\delta \boldsymbol{B}$ es la contribución al campo magnético y μ_0 es la permeabilidad del vacío (Raymond A. & John W., 2015). Otra forma de calcular el campo magnético generado por una corriente, y que generalmente resulta más práctica, es mediante la Ley de Ampere. En su forma integral la Ley de Ampere se escribe como:

$$\oint \boldsymbol{B} \cdot d\boldsymbol{l} = \mu_0 N i \tag{2}$$

Donde N es el número de portadores de corriente, y la integral se realiza a través de una trayectoria cerrada. La unidad de $\boldsymbol{B}$, que se conoce como densidad de flujo magnético o inducción magnética, en el SI es el Tesla (T), mientras que en el sistema CGS es el Gauss (G) que equivale a 10^{-4} T (Jiles, 1998). Por ejemplo, en la superficie de la tierra el campo magnético es de 5 Gauss, y el de un imán de barra es de 100 Gauss.

Un solenoide es un alambre aislado enrollado en forma de hélice para formar un cilindro, el cual permite producir un campo magnético razonablemente uniforme en el interior del solenoide cuando éste conduce corriente. Si las vueltas están muy apretadas y la longitud del solenoide es mucho menor que los radios de las vueltas, se dice que se trata de un solenoide ideal y el campo interior es uniforme. Un electroimán es hecho de una manera similar a un solenoide, excepto porque las vueltas son hechas sobre un material ferromagnético tal como el hierro. Este núcleo ferromagnético genera una mayor inducción magnética que un solenoide para el mismo campo magnético. Se puede demostrar mediante la Ley de Ampere, que el campo magnético cerca del centro de un solenoide ideal está dado por:

$$B = \frac{Ni}{l} = \mu_0 n i \tag{3}$$

Donde n es el número de vueltas por unidad de longitud.

La inducción magnética consiste de dos contribuciones, una debido al campo magnético por sí mismo, y otra debido a la magnetización del material. La inducción magnética es simplemente la suma vectorial dada por:

$$\boldsymbol{B} = \mu_0(\boldsymbol{H} + \boldsymbol{M}) \tag{4}$$

Donde $\boldsymbol{H}$ y $\boldsymbol{M}$ tienen unidades de ampere por metro**.** El campo magnético $\boldsymbol{H}$ es generado por corrientes eléctricas afuera del material tanto para un solenoide o electroimán, como para un imán permanente, mientras que la magnetización $\boldsymbol{M}$ es generada, como resultado de los espines y momentos angulares (no compensados) de los electrones en el sólido.

METODOLOGIA

Construcción de la pinza magnética

Para la construcción de la pinza magnética se realizó un arreglo basado en un electroimán, dónde el núcleo fue construido a partir de una barra de hierro. Se fabricaron tres núcleos de tamaños distintos, el diámetro de los tres núcleos fue de 6 mm, la longitud del primer y segundo núcleo fue de 17.5 cm, y la del tercer núcleo fue de 12 cm. El núcleo se acondicionó para colocarle una aguja en la punta que posteriormente fue doblada a aproximadamente 125°, con el fin de tener un mejor acceso a las muestras bajo el microscopio. A los tres núcleos distintos, se les colocaron tres agujas de diámetros distintos, con el fin de observar qué tamaño era el óptimo para los propósitos requeridos. Los diámetros de las agujas utilizadas en las pinzas fueron de 889 µm, 762 µm y de 558.8 µm, a las cuales se les nombra pinza 1, pinza 2 y pinza 3 respectivamente. Posteriormente se realizó el embobinado del núcleo, utilizando alambre de cobre AWG 20. A la pinza 1 se le enrrollaron 2 capas de 50 vueltas cada una, a la pinza 2 también se le enrrollaron 2 capas de 50 vueltas cada una, y finalmente a la pinza 3 se le enrrollaron 6 capas de 50 vueltas cada una, colocando una capa de barniz de la marca comercial Kemek® entre cada capa y recubriendo con cinta aislante cada 2 capas para evitar calentamiento excesivo de la bobina al momento de utilizarla. Después de que la última capa del embobinado fue colocada, se colocaron dos sujetadores en ambos extremos para sujetar el embobinado y se recubrió utilizando una capa de resina epoxi para asegurar el alambre. Las tres pinzas construidas se muestran en la Figura 1.

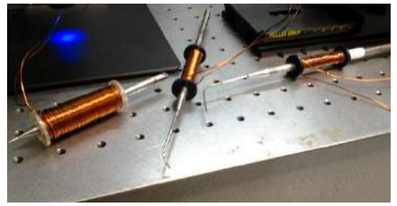


Figura 1. Se muestran las tres pinzas magnéticas construidas.

Automatización del sistema en LabVIEW

Para controlar la corriente suministrada a la bobina en la pinza magnética, se utilizó una fuente de poder bipolar de alta potencia de la marca Kepco, modelo BOP- MG 1KW, la cual es programable a través del protocolo RS 232 (Serial) y del protocolo IEEE 488 (GPIB). Adicionalmente esta fuente puede ser utilizada como un amplificador de potencia de ganancia fija o variable utilizando una señal de referencia externa, la cual es amplificada y puede ser utilizada para proporcionar la corriente necesaria en la pinza magnética. Se eligió utilizar la fuente como un amplificador de potencia de ganancia variable porque su programación en LabVIEW no requiere de conocimiento de los protocolos RS 232 ni GPIB, ni de los cables y tarjetas necesarios para estos protocolos y que pueden resultar difíciles de conseguir, además al utilizar una ganancia variable se pudo crear un programa que proporcionara señales variables en el tiempo, tales como señales senoidales. La fuente se configuró para funcionar como una fuente de corriente, ya que este parámetro nos permite conocer la intensidad del campo magnético producido por la bobina. Para proporcionar la señal de referencia que posteriormente sería amplificada por la fuente de

corriente se utilizó una tarjeta de adquisición de datos (DAQ 6001) de National Instruments, la cual fue configurada en LabVIEW, para generar una señal de voltaje análoga, entre -10v y 10v en demanda y en modo diferencial. El programa en el diagrama de bloques consistió básicamente de un ciclo While que contiene una estructura tipo Case, en la cual se conectó un Combo Box que contenía las opciones para generar distintos tipos de ondas. Los tipos de ondas disponibles fueron DC, impulso, Monopulso Gaussiano, Seno con Modulación Gaussiana, Sinc, Chirp, Triangular, Cuadrada, Diente de Sierra, senoidal y fórmula, esta última opción permitió poder ingresar cualquier expresión matemática deseada para generar una señal con esa forma. Dentro de cada caso se colocó un Sub-Vi de las paletas WaveForm Generation y Signal Generation correspondiente al tipo de onda que se deseaba generar. En el panel frontal se colocaron perillas y controles para ingresar los parámetros necesarios para generar la onda, como amplitud, fase, frecuencia, offset, etc. En el diagrama de bloques estos controles fueron conectados a las funciones para generar ondas y señales según fuese necesario, la señal resultante se conectó a una función DAQ Assistant, configurada como se mencionó anteriormente y a una gráfica tipo WaveForm para poder visualizar la señal aplicada. El panel frontal y el diagrama de bloques de la aplicación en LabVIEW se muestran en la Figura 2.

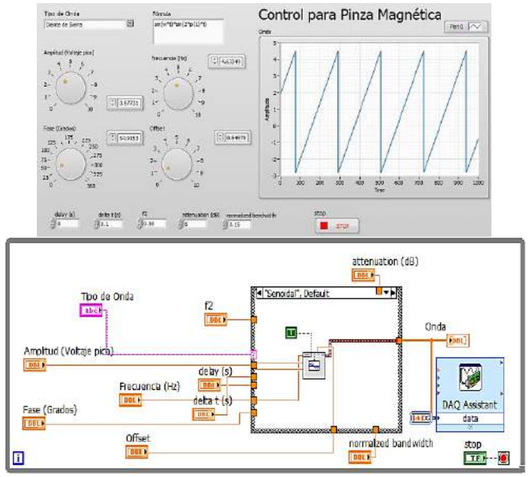


Figura 2. Se muestran el panel frontal y el diagrama de bloques de la aplicación programada en LabVIEW para automatizar la corriente suministrada a la pinza magnética.

Preparación de las muestras

Las muestras se prepararon utilizando partículas magnéticas Sera-Mag SpeedBeads Carboxylate-Modified de la marca Thermo Scientific®, las cuales poseen dos capas de magnetita para duplicar la velocidad y un rápido tiempo de respuesta magnética y tienen un diámetro de aproximadamente 1 µm. Se utilizó un arreglo de tipo celda, que consistió en colocar un cubreobjetos sobre un portaobjetos, después tres lados del cubreobjetos fueron sellados utilizando resina epoxi y en el lado que quedó descubierto se colocó la muestra de partículas magnéticas diluida en agua destilada a una concentración arbitraria utilizando una micropipeta, de tal manera que la muestra fuese entrando en la celda, y una vez que la muestra se encontraba uniformemente distribuida en la celda, esta se terminó de sellar utilizando la resina epoxi.

Caracterización de la pinza magnética

Para conocer las propiedades y la respuesta magnética de la pinza, se midió la magnitud del campo magnético generado a lo largo del eje de la aguja, utilizando un sensor de campo magnético PS-2112, y el

equipo de adquisición de datos Xplorer GLX Pasco®. Para generar el campo magnético se utilizó una corriente directa, y la medición del campo se realizó cada 0.5 A, hasta llegar a 6 A.

Observación de las partículas magnéticas

Para observar las partículas magnéticas y su respuesta ante la presencia de la pinza magnética, se utilizó un microscopio óptico con objetivos de 5x, 40x y 100x. Se realizaron grabaciones y se tomaron fotografías utilizando la cámara Canon EOS rebel T5i que puede ser adaptada al microscopio y el software EOS Utility 2.13.30.0, también se utilizó la cámara Dino-lite Digital Microscope Premier que posee aumento suficiente para visualizar las partículas por sí misma y el software Dinocapture 2.0. El arreglo experimental se muestra en la Figura 3.

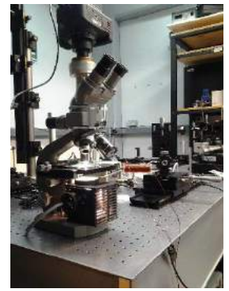


Figura 3. Arreglo experimental utilizado para observar las partículas magnéticas, y su respuesta ante la presencia de la pinza magnética

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La variación del campo magnético en función de la corriente se muestra en la Figura 4 para las tres pinzas magnéticas.

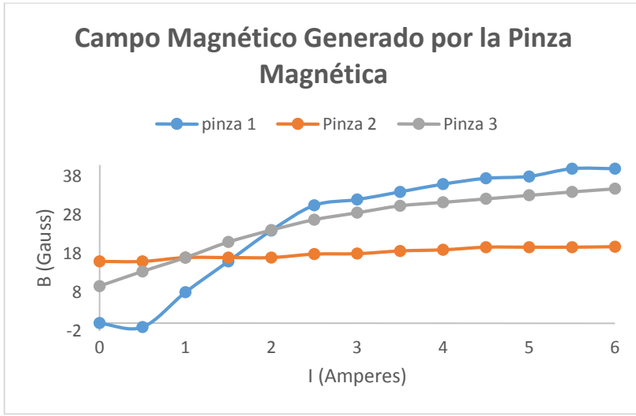


Figura 4. Se muestra el campo magnético generado por la corriente en las tres pinzas magnéticas.

Como puede observarse en la Figura 4, la pinza 2, presenta una débil respuesta a la generación de un campo magnético debido a la corriente circulando por la bobina, esto puede deberse a que la aguja está

hecha de un material que no es ferromagnético y por tanto presenta una magnetización muy pobre, por lo que esta pinza puede no ser útil para nuestros propósitos. Por el contrario la pinza 1 y la pinza 3, presentan una mejor respuesta a la generación del campo magnético, por lo que la punta debe estar compuesta de un material ferromagnético que presenta una buena magnetización al ser expuesta al campo magnético generado por la bobina. También puede observarse que las pinzas presentan una pequeña magnetización incluso antes de que se aplique corriente en ellas, esta magnetización es del orden del campo magnético en la superficie de la tierra, por lo que esta pequeña contribución se atribuye al campo magnético de la tierra. Por último, al contrario de lo que describe la ecuación (3), las pinzas presentan una respuesta lineal únicamente en una pequeña región, lo que significa que existe una saturación, debido a que existe un límite a la magnetización que puede presentar la aguja. En la figura 5 se muestra la respuesta de las partículas magnéticas ante el campo magnético generado por la pinza magnética.

Figura 5. Se observa la respuesta de las partículas magnéticas ante la presencia del campo magnético generado por la pinza magnética 3. El objetivo utilizado es de 5x.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los objetivos planteados, podemos concluir que los resultados obtenidos fueron positivos, ya que se logró construir tres pinzas magnéticas, de las cuales 2 resultaron tener una buena respuesta a la generación del campo magnético requerido para futuras aplicaciones de este dispositivo. Para futuros estudios, sería de utilidad medir la fuerza generada por el campo magnético sobre las partículas magnéticas, y observar la respuesta de células a las que se les haya introducido previamente partículas magnéticas.

BIBLIOGRAFIA

Iwijn, D. V., & Cees, D. (2012). Recent Advances in Magnetic Tweezers. *Annual Review of Biophysics*, 453-472.

Jiles, D. (1998). Magnetic Fields. En D. Jiles, *Introduction to Magnetism and Magnetic Materials* (págs. 3-33). New York: Taylor & Francis.

Nathan, J. S. (2010). Minireview: A Tiny Touch: Activation of Cell Signaling Pathways with Magnetic Nanoparticles. *The Endocrine Society*, 451-457.

Philip, K., & Ben, F. (2007). High-Force magnetic tweezers with force feedback for biological applications. *Review of Scientific Instruments*.

Raymond A., S., & John W., J. J. (2015). Fuentes del campo magnético. En S. Raymond A., & J. J. John W., *Física para ciencias e ingeniería* (págs. 904-934). D.F.: Cengage Learning.

ANALISIS PROTEOMICO DE LA CERVEZA ARTESANAL POR ISOELECTROENFOQUE EN CAPILAR

Iván Jaziel Hernández Gutiérrez[1] y Enrique Maldonado Cervantes[2]

RESUMEN

La producción y consumo de la cerveza, presenta una tendencia alcista, intentando recuperar la tradición en la elaboración, pudiendo comprometer la calidad del producto final. Es por ello que se analizó la cantidad de proteína de una cerveza artesanal producida por la UASLP, por dos métodos de cuantificación: Bradford (2.39 mg/ml) y BCA (1.14 mg/ml). Estas diferencias se atribuyen a la afinidad de ambos reactivos por compuestos orgánicos extras contenidos en la cerveza.

ABSTRACT

The production and consumption of the beer, he presents a high trend, trying to recover the tradition in the production, being able to compromise the quality of the final product. It is for it that one analyzed the quantity of protein of a handcrafted produced beer for UASLP whit two methods of quantification: Bradford (2.39 mg/ml) and BCA (1.14 mg/ml). These differences attribute to themselves to the affinity of both reagents for organic compounds extras contained in the beer.

Palabras clave: cerveza, proteìna, electroforesis, isoelectroenfoque

INTRODUCCIÓN

En el presente proyecto se tuvo como objetivo principal, obtener un perfil proteico de una cerveza artesanal que se prepara con fines didácticos de procesos industriales en la bioquímica de alimentos por alumnos de la carrera de Ing. Agroindustrial de la U.A.S.L.P. Los métodos realizados, se enfocaron en la obtención de un perfil de cuantificación y análisis electroforético de doble dimensión de las proteínas contenidas en dicho producto.

MARCO TEORICO

De manera general se debe conocer como proteína**,** a un "polímero lineal en los que las unidades monoméricas son los aminoácidos que lo conforman; éstos se pliegan en una notable diversidad de formas tridimensionales, que les proporcionan una correspondiente variedad de funciones bioquímicas." (Teijón J. 2006). Existen diversas formas de cuantificar las proteínas en un analito. Para el presente proyecto se realizaron dos cuantificaciones basadas en los métodos: Brandford y Ácido Biscinconico. Respectivamente, el primero se basa en la unión específica del colorante Coomassie blue G-250 o reactivo de Bradford con las proteínas disponibles de las muestras a analizar. Las proteínas se unen a la forma azul para formar el complejo proteína-colorante, produciendo una absorbancia máxima de 595 nm. "La determinación del contenido proteico requiere una comparación del valor de absorbancia de la muestra con las obtenidas, a partir de las cantidades conocidas de proteínas, con el que se construye una recta de calibración; a mayor cantidad de proteínas, mayor desarrollo y, por tanto,

[1] Universidad Autónoma de Aguascalientes
[2] Universidad Autónoma de San Luis Potosí

mayor absorbancia.” (Martínez A. 2015). Por su parte, el segundo método se basa en la acción de “un compuesto capaz de formar un complejo púrpura intenso con inones Cu^{1+} en medio alcalino. Este reactivo forma la base de un método analítico capaz de monitorizar el ión cuproso producido en una reacción entre las proteínas con Cu^{2+} en medio alcalino (reacción de Biuret)”. (Fernández E. et.al. 2012). La estabilidad del reactivo y el cromóforo proporciona un método para la cuantificación de proteínas que es sencillo, rápido, muy sensible.

Dichas moléculas, para su clasificación e identificación, además de poseer un determinado peso molecular definido, tienen una característica llamada punto isoeléctrico, que a definición de (Harris D. 2006), en dicho punto, la carga media de todas las formas de la proteína es cero, por lo tanto, cuando una proteína se encuentra en su punto o pH isoeléctrico, no migra en un campo eléctrico. Siendo este efecto es el fundamento de parte de la técnica realizada para la separación de proteínas.

La electroforesis bidimensional es una técnica de alta resolución cuyo objetivo es la separación de las proteínas secuencialmente por dos criterios físicos. En primer lugar “las proteínas son separadas en un gel con gradiente de pH en condiciones desnaturalizantes de acuerdo con su *punto isoeléctrico* (isoelectroenfoque). Tras esta separación por carga las proteínas son separadas de acuerdo con su *masa molecular* por electroforesis discontinua en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE), que le confiere a la proteína la propiedad de migrar en una sola dirección. Tras la tinción del gel (con Coomassie blue) las proteínas aparecen formando manchas circulares”. (Morales D. 2006)

METODOLOGIA

Se comenzó con la preparación de 10 ml. de Buffer de Fosfatos (Na_2HPO_4 0.1 M) pesando en balanza analítica 0.2922 g de NaCl y 0.14196 g de Na_2HPO_4 para mezclar ambos reactivos con 7 ml. de agua destilada y nivelando su pH con un potenciómetro a 7 con solución NaOH, al llegar al dicho punto, se aforó a 10 ml. Se procedió a obtener nuestro analito de cerveza desarrollando precipitación seriada. Se colocó en 6 tubos Ependorf 300 ul de muestra con 900 ul de Acetona y se dejaron reposar para su precipitación a 4° C durante dos horas. Luego de este tiempo, se centrifugaron a 13000 rpm durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante por decantación. La precipitación seriada se realizó colocando 300 ul de buffer de fosfatos (Na_2HPO_4)al primer tubo, agitándolo en el Vortex para luego pasar dicho contenido homogéneo al próximo tubo, realizando esto sucesivamente para obtener en el sexto tubo un concentrado.

Método Brafford. Para realizar nuestra curva de calibración se elaboró una solución de trabajo con la que se prepararon por triplicado nuestros estándares y muestra. Para éste, se mezcló 6 ml del reactivo Bradford (5mg de Azul de Coomasie G-250, 2.5 ml de etanol, 5ml de ácido fosfórico aforando a 50 ml.) con 24 ml de H_2O destilada obteniendo así 30 ml. del mismo. Para cada curva se realizaron 6 estándares de 1 ml. con concentraciones conocidas de albumina de suero bovino de 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mg/ml. y 1.503 ml. del analito de la siguiente manera.

Tabla 1. Cantidades de Reactivo Bradford y muestra de concentración conocida para la obtención de los estándares de calibración y analito

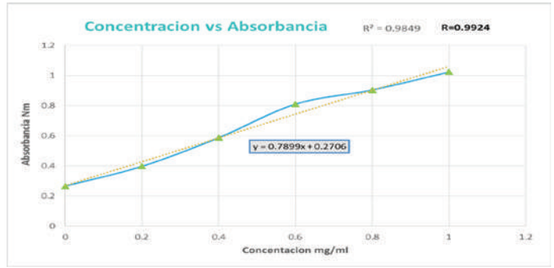
Concentración	ml. de Buffer de fosfatos	ml. muestra de concentración conocida
0	1	0
0.2	0.998	0.002
0.4	0.996	0.004
0.6	0.994	0.006
0.8	0.992	0.008
1	0	1
Analito	**1.5**	**0.03**

Con estos estándares se realizaron tres curvas de calibración midiendo su absorbancia a 595 nm obteniendo el siguiente resultado.

Tabla 2. Valores de Abs en nm de los estándares y el analito

ESTÁNDAR (mg/ml)	Abs 1 (nm)	Abs 2 (nm)	Abs 3 (nm)
0	0.0875		
0.2	0.920	0.815	0.852
0.4	1.127	0.958	
0.6	1.116	1.081	1.091
0.8	1.308	1.172	1.187
1	ND	1.322	1.328
ANALITO	0.858	0.896	**0.874**

Se calculó la ecuación de la recta de nuestra lectura 3 (y= 0.5854x + 0.734) obteniendo de ésta un R= 0.99 como grado de confianza para posterior a esto, ubicar nuestro analito 0.874 nm en la variable X obteniendo por interpolación una concentración.



Gráfica 1. Curva de calibración, ecuación de la recta y R

Método con ácido biscinconico. Para realizar nuestra curva de calibración se elaboró una solución de trabajo con la que se prepararon nuestros estándares y muestra. Para éste, se mezcló 9.8 ml de ácido biscinconico con 0.2 ml de $CuSO_4$ obteniendo así 10 ml. del mismo. Se realizaron 6 estándares de 1 ml. con concentraciones conocidas de albumina de suero bovino 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mg/ml. y 1.5 ml. del analito de la siguiente manera.

Tabla 3. Cantidades de Buffer de fosfatos y muestra de concentración conocida para la obtención de los estándares de calibración y analito

Concentración	ml. de Buffer de fosfatos	ml. muestra de concentración conocida
0	1	0
0.2	0.998	0.002
0.4	0.996	0.004
0.6	0.994	0.006
0.8	0.992	0.008
1	0	1
ANALITO	**1.4**	**0.08**

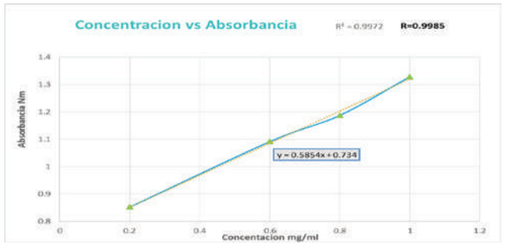
Se procedió a incubar dichos estándares durante 30 minutos a 37°C.

Con estos estándares se realizó una curva de calibración midiendo su absorbancia a 595 nm obteniendo el siguiente resultado.

Tabla 4. Valores de absorbancia en nm de los estándares

ESTANDAR (mg/ml)	Abs (nm)
0	0.267
0.2	0.398
0.4	0.588
0.6	0.811
0.8	0.905
1	1.024

Posterior a esto, se hizo la lecutura de absorbancia de nuestro analito, obtieniendo Abs= 1.117 nm. Para ubicar nuestro conocer su concentración, se calculó la ecuación de la recta (y= 0.7899x + 0.2706) con los valores de abs de concentración conocida teniendo como grado de confianza un R=0.99, ubicando nuestro analito en la variable X por interpolación.



Gráfica 2. Curva de calibración, ecuación de la recta y R

Electroforesis sds-page. Se elaboró el gel de separación con 2.77 ml de Acrilamida al 30%, 1.64 ml de Agua Destilada, 1.5 ml de Tris 15m pH=8.8, 60 ul de SDS 10%, 30 ul de PSA 10% y 3 ul de TEMED. La mezcla anterior se desgasificó durante 15 minutos y se colocó en el molde del gel previamente armado y se dejó polimerizar durante una hora. Para el gel concentrador se mezclaron con 0.132 ml de Acrilamida al 4%, 0.603 ml de Agua Destilada, 0.250 ml de Tris 0.5 M pH=6.8, 0.1 ml de SDS 10%, 0.05 ml de PSA 10% y 0.005 ul de TEMED colocando esta última mezcla en la parte superior del molde. Se prepararon 5 muestras añadiendo 8.36 ul de muestra concentrada con 3 ul de Buffer de Fostatos y 4ul de buffer de carga.

Se colocó un marcador de peso molecular conocido en el primer espacio de corrida del gel para en los siguientes cinco, colocar nuestras muestras. La electroforesis se desarrolló a 20 mA constante hasta correr completamente la muestra a lo largo del gel. Posteriormente el gel se tiñó en Azul de Coomassie al 0.025% durante 12 horas, para luego sumergirlo en una solución de desteñido con 50% etanol, 10% Acido Acético y 40% agua destilada.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 5. Concentraciones obtenidas respecto al método usado

MÉTODO	CONCENTRACIÓN (mg/ml)
Bradford	1.14
Ácido Biscinconico	2.39

La concentración mayor se obtuvo por el método de Ácido Biscinconico siendo casi el doble de proteína que por método Bradford, esta diferencia significativa puede deberse a la afinidad que tienen los reactivos hacia otros componentes dentro de la muestra. La intensidad de absorción en el método Bradford tal como lo describe García et. al. (1998) depende del contenido de aminoácidos básicos y aromáticos, existiendo alguna inferencia debido a compuestos nitrogenados y/o aromáticos extra dentro de nuestra muestra de origen artesanal. Otras sustancias que interfieren estos ensayos con BCA son los agentes fuertemente alcalinos que en congruencia con Roca. P. et.al. (2003) es fácilmente solucionable con la utilización de buffers. Mismo autor señala que las respuestas en la absorbancia no tienden a ser lineal debido a que el colorante no es estable con el tiempo.

Los únicos componentes presentes en nuestro método que pudieron de alguna forma contaminar nuestras muestras fueron SDS, Triton x-100. Dado que una proteína contiene varios grupos cargados, su solubilidad depende de la concentración de sales disueltas, la polaridad componentes nutritivos de la muestra como sacarosa, el pH y la temperatura. Autores como Harris D. (2006) describen que cualquier reactivo en la muestra que disminuya el pH a menos de 11 puede afectar la sensibilidad y reproductibilidad del ensayo.

Como se señala en distintas Técnicas de análisis instrumental el reactivo Bradford no tiene interferencias con polifenoles ni carbohidratos, pudiendo de esta manera fundamentar el resultado menor en los dos análisis, debido a que el reactivo ignora dichos componentes que pudieran estar en nuestra muestra de cerveza artesanal.

CONCLUSIONES

- La cerveza es una de las bebidas más consumidas a nivel mundial por lo que su interés nutricional de compuestos bioactivos es importante para la industria.
- La utilización de material adecuado y evitar contaminación de reactivos es importante durante el análisis proteómico.
- Los dos distintos métodos: Bradford y BCA para la cuantificación de proteínas tienen una gran diferencia significativa en la sensibilidad y afinidad por compuestos nitrogenados y aromáticos.
- El método de cuatificación Bradford y BCA son ideales en un análisis previo a la electroforesis SDS PAGE como método ideal para el análisis de proteínas.

BIBLIOGRAFIA

1. Teijón J. Et. Al. 2006. Fundamentos de bioquímica estructural. 2° edición. Editorial Tébar. Madrid. 44 4pp.
2. Martinez. A. 2015. Analisis comparativo de compuestos bioactivos en cerveza arteanal y cerveza industria. Universidad de Lleida. Disponible en http://repositori.udl.cat/bitstream/handle/10459.1/48689/amartinezm.pdf?sequence=1 Fecha de visita: 28/07/16.
3. Fernández E. et.al. 2012. Metodos para la cuantificación de proteínas. Universidad Rabanales. Córdoba Argentina. Disponible en http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-

mol/pdfs/27%20M%C3%89TODOS%20PARA%20LA%20CUANTIFICACI%C3%93N%20DE%20PROTE%C3%8DNAS.pdf (Fecha de visita: 25/07/16)
4. Harris. D. 2006. Analisis Quimico Cuantitativo. 3° edición. Reverté. España. 924 pp
5. Morales D. 2006. Métodos fisicoquímicos en biotecnología. UNAM. Disponible en http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/plataformas_de_proteomica.pdf (Fecha de visita 26/07/16)
6. García H. el.al.1998. Cuantificacion de proteínas. UNAM. Revista Bitacora. Disponible en www.smbb.com.mx/revista/Revista_1998_2/bitacora.pdf Fecha de visita (06/08/2016)
7. Roca. P. et.al.2003. Bioquímica: técnicas y métodos. Editorial Hélice. 348 pp

UASLP
Universidad Autónoma
de San Luis Potosí