

INDUCCIÓN A LA CIENCIA, LA TECNOLOGÍA
Y LA INNOVACIÓN EN LA REGIÓN CENTRO

VOL. III, NUM. 4

Ciencias

Naturales y Exactas



19° Verano
de la Ciencia
Región Centro

The background is a solid brown color with a repeating pattern of white line-art icons. These icons include a DNA double helix, a stack of books, a small plant with two leaves, a round-bottom flask with bubbles, an atomic model with three electrons, a twisted DNA strand, a microscope, a test tube, a hexagonal molecular structure, a graduated cylinder, and a pair of test tubes. On the right side, there is a large, stylized white graphic of a flask or beaker, and a vertical white bar with a small square cutout at the bottom.

Ciencias

Naturales y Exactas



Ciencias Naturales y Exactas

**CARACTERIZACION DE TEQUILA USANDO
ESPECTROSCOPIA RAMAN Y ANALISIS FISICOQUIMICOS** **15**
1 Rangel Sánchez, C. y 2 Rodríguez Ávila, R

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS
PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO DE PLANTAS DE
LAS ZONAS NATURALES PROTEGIDAS DEL ESTADO DE
GUANAJUATO** **19**
Raygoza Roque Fabian¹ y Gómez Luna Blanca Estela²

**ANÁLISIS DE LA GESTIÓN COMUNITARIA EN BENEFICIO DE
LA PROTECCIÓN DEL HUMEDAL CIÉNEGA DE TAMASOPO** **23**
Morán Rodríguez Oscar Alejandro¹ y Maldonado Miranda
Juan José²

**CARACTERIZACIÓN DE BIOPELÍCULAS PARA LA
REGENERACIÓN CELULAR** **27**
Hivon Guerrero Trejo¹, Ma. Elena Calixto Olalde² y José
Francisco Louvier Hernandez³

**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE CEPAS CON
CAPACIDAD DE BIODEGRADACIÓN DE COMPUESTOS
ORGÁNICOS
VOLÁTILES "COV S"** **31**
Becerra Cervera Jesus¹ y Conde Bajaras Eloy²

LA ATMÓSFERA DE JÚPITER **35**
J. A. Carreño¹ y M. A. Trinidad²

**HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE UN CONCENTRADO DE
PROTEÍNAS DE SUERO DE LECHE Y EVALUACIÓN DE SUS
PROPIEDADES TENSOACTIVAS.** **39**
Martha Ivonne Muñoz Martinez¹ y Mario Ávila Rodríguez²

**CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE ENFERMEDADES
DÉRMICAS EN ANUROS EN EL ANP LAS MUSAS.** **43**
Laviada-Camarena Ingrid Paulina¹, Márquez-Lucio María

EVALUACIÓN CUANTITATIVA DE LA PRODUCCIÓN DE AMILASAS EN HONGOS AISLADOS DE LOS AZUFRES, MICHOACÁN

Ana Guadalupe Salazar Suárez¹ y Divanery Rodríguez Gómez²

47

DIVERSIDAD DE LÍQUENES FOLIOSOS Y FRUTICOSOS DE LA SIERRA GORDA DEL ESTADO DE GUANAJUATO

Antonio Isaac Ramírez Rojas¹ y Varinia López Ramírez²

52

EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DE MOHOS Y LEVADURAS EN PRODUCTOS ACIDIFICADOS

Daniela Carolina González Quevedo¹ y Claudia Armas Garfias².

56

HUMEDALES ARTIFICIALES PARA EL TRATAMIENTO DE AGUAS CONTAMINADAS CON FIPRONIL.

González Cendejas Diego Armando¹ y Cisneros Almazán Rodolfo²

59

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE AISLADOS BACTERIANOS DE GUANAJUATO.

Elizabeth Mendoza Bravo y Juan Gualberto Colli Mull.

63

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS TIPO JAROSITA CON SUSTITUCIONES DE Cu Y Zn PARA ESTUDIOS DE CINÉTICA QUÍMICA HETERÓGENA

Pérez Ortega, H.E.¹; Reyes Domínguez, I.A.²

67

PARTICIPACIÓN DE LACASAS Y OXIDASAS SOBRE LA BIODEGRADACIÓN DE COLORANTES TEXTILES.

Martínez Martínez, L.A.¹ y Cervantes González, E.²

72

ESTUDIO DE LA MICROFLORA DE LA CAVIDAD ORAL Y CLOACAL EN REPTILES EN LA CUENCA BAJA DEL RÍO TEMASCATÍO

María Fernanda Rodríguez-Gutiérrez¹, Adrián Leyte-Manrique² María Azucena Márquez Lucio³ y Francisco Alejo Iturvide⁴

76

OBTENCIÓN DE ZnO NANOESTRUCTURADO LAMINAR MEDIANTE PRECIPITACIÓN QUÍMICA

Martín Castañeda Lozano¹ y Gabriel Herrera Pérez²

80

CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE HONGOS FRENTE A ESTRÉS POR METALES PESADOS

Sandra Olivia Crespo Ayala¹ y Varinia López Ramírez²

85

BIOCONTROL DE FITOPATÓGENOS DEL SUELO. Tania Itzel Yáñez Paniagua ¹ y Francisco Alejo Iturbide ² y María Azucena Márquez Lucio ³	89
VCRC CARACTERIZACIÓN DE BIOPOLÍMEROS SINTETIZADOS POR BACTERIAS AISLADOS EN SUELOS CONTAMINADOS CON METALES PESADOS DE XICHÚ GUANAJUATO Victoria Guadalupe Delgado Perez ¹ y Ma. Elena Calixto Olalde ²	93
"OPTIMIZACIÓN DEL TRATAMIENTO DEL AGUA DE POZO UBICADO EN EL ITSMEM SEGÚN SUS CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS Y BACTERIOLÓGICAS PARA USOS DIVERSOS" Axel Arnulfo Pérez Zamora ¹ y Adriana Hernández Córdova ² .	98
PILAS MICROBIANAS CREANDO ENERGÍA CON AGUAS RESIDUALES José Miguel Ferriño Guerrero ¹ y Baruck Francisco Alvarado ²	102
"OPTIMIZACIÓN DEL TRATAMIENTO DEL AGUA DE POZO UBICADO EN EL ITSMEM SEGÚN SUS CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS Y BACTERIOLÓGICAS PARA USOS DIVERSOS" Néstor Hugo Ramos Escalante ¹ y Adriana Hernández Córdova ² .	106
IDENTIFICACIÓN DE LA SUBUNIDAD ALFA DE CANALES BK EN RETINAS DE RATAS WISTAR Erika Márquez Padilla ¹ , Ricardo Espinosa Tanguma ² y Alma Rosa Barajas Espinosa ²	110
ASLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE ACTINOMICETOS DE SUELOS POTOSINOS Estefanía Pérez Martínez ¹ y Jesús Israel Morales Jiménez ²	114
CELULASAS DE ORIGEN MICROBIANO Melanie Lizbeth Ruvalcaba Villagrán. ¹ y Morales Jiménez Jesús Israel. ²	118
ADSORCIÓN Y LIBERACIÓN CONTROLADA DE CARVACROL SOBRE NANOESFERAS DE DIÓXIDO DE SILICIO Miguel Ángel Franco Carranza ¹ y Vicente Rodríguez	121

HONGOS RECOLECTADOS DE LA SIERRA MADRE ORIENTAL DE SAN LUIS POTOSÍ: IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE UN MICROMICETO García Castro Hermelinda.1 y Terán Figueroa Yolanda.2	125
MOSCAS DE LA FAMILIA SARCOPHAGIDAE EN EL MUNICIPIO DE TORREÓN, COAHUILA Taurino Velasco Hernández1 y Fabián García Espinoza2	129
ACTIVIDAD CEREBRAL EN EL ESTABLECIMIENTO DE PREFERENCIA DE ALIMENTO POR INTERACCIÓN SOCIAL EN RATONES Angela Elena De Luna Marmolejo y Raúl Gerardo Paredes Guerrero	133
EXPRESIÓN DE UNA MUTANTE DE LA ENZIMA TRANS-SIALIDASA DE Trypanosoma cruzi (TcTS) PARA LA GENERACIÓN DE ANTICUERPOS PROTECTORES CONTRA LA TRIPANOSOMIASIS Darío de Jesús Dávila Pasillas1, Arianna Núñez Beltran2 y Juana Elizabeth Reyes Martinez2*	137
ANÁLISIS DE DISTINTOS REFORZADORES EN UNA TAREA DE CONDICIONAMIENTO OPERANTE DE PALANQUEO EN RATAS WISTAR Esparza- Reyes Diana 1, Gabriela Santana-Chavez2 y Rojas- Piloni Gerardo2	141
IDENTIFICACIÓN DE LA SUBUNIDAD ALFA DE CANALES BK EN RETINAS DE RATAS WISTAR Erika Márquez Padilla1, Ricardo Espinosa Tanguma2 y Alma Rosa Barajas Espinosa2	145
HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE UN CONCENTRADO DE PROTEÍNAS DE SUERO DE LECHE Y EVALUACIÓN DE SUS PROPIEDADES TENSOACTIVAS Indra Betsabé Oliva Rodríguez1 y Mario Avila Rodríguez2	149
CELULASAS DE ORIGEN MICROBIANO Melanie Lizbeth Ruvalcaba Villagrán.1 y Morales Jiménez Jesús Israel.2	154
AMPLIFICACIÓN DE UN FRAGMENTO DEL GEN DE LA FOSFOLIPASA A1 EN TEOCINTE Juan Carlos Rivera Navarro1 y Rubén Rellán Álvarez2	157

CARACTERIZACIÓN DE LA PERMEABILIDAD INTESTINAL DE CRÍAS LACTANTES CARENTES DEL RECEPTOR DE PROLACTINA PROVENIENTES DE MADRES ALIMENTADAS CON UNA DIETA ALTA EN GRASAS Sandra Leticia González López ¹ , Ericka A. de los Ríos ² y Yazmín Macotela Guzmán ²	160
PRODUCCIÓN DE LISOZIMA DE HUEVO DE GALLINA EN ASPERGILLUS NIGER B1 Sofía Margarita Arellano Acosta ¹ y Sergio de Jesús Romero Gómez ²	164
EFFECTO CARDIOPROTECTOR DEL OMEGA 3 EN EL PROCESO DE ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN EN UN MODELO DE CORAZÓN AISLADO DE RATA Acevedo Díaz, Zaira Valeria ¹ y Torres Tirado, José David ² .	168
EXPOSICIÓN DIFERENCIAL DE GENES APOPTOTICOS EXPUESTOS A FLÚOR Vázquez Montoya, A; Limón Rojas, A; Escobar García, D; Pozos Guillén, A.	172
PROPIEDADES ELECTROQUÍMICAS DEL COMPÓSITO AIN/ Mg Alondra Zapata Flores ¹ y Josefina García Guerra ²	176
GENERACION DE MUTANTES EN EL HONGO PATOGENO Sporothrix schenckii Ana Delia Morales Requeses ¹ y Héctor Manuel Mora Montes ²	180
AISLAMIENTO DE BEGOMOVIRUS EN PLANTAS PREVIAMENTE INFECTADAS MEDIANTE BIOBALÍSTICA. de la Vega Montoya Arturo ¹ y Argüello Astorga Gerardo Rafael ²	184
REPRESENTACIONES SOCIALES DEL AGUA EN USUARIOS DE LA COMUNIDAD VALLE DE ARISTA. Atziri Azeneth Herrera Valero Universidad Autónoma de Coahuila Mtra. Alicia Villagómez Carvajal Universidad del Centro de México	188
EFFECTO DEL ETILENGLICOL EN EL TAMAÑO DE PARTÍCULA DEL ÓXIDO DE ZINC OBTENIDO POR METODO DE SOL-GEL Herrera Tovar Dalia Viridiana ¹ y Rosales Sosa María Gloria ²	194

COMPUESTOS BIOACTIVOS EN ALGAS MARINAS Eric Saenz Molina ¹ y Antonio De León Rodríguez ²	198
ESTABILIDAD DEL COLOR EN EL TEÑIDO DE FIBRAS NATURALES CON COLORANTES NATURALES Gabriela Yvonne De La Peña Elizondo ¹ y Gabriela Arroyo Figueroa ²	202
GENERACIÓN DE UN VECTOR QUE CONTENGA EL 5' - UTR sin uORFs DE LA POLIAMINO OXIDASA 4 DE Arabidopsis thaliana García-Vásquez Itzel ¹ y Guerrero-González María de la Luz ²¹	206
TRATAMIENTO PRELIMINAR DE FILTROS DE CIGARRO PARA OBTENCIÓN DE CARBÓN ACTIVADO DEL 19° VCRC Javier Alejandro Martínez Ligas ¹ y Gloria Guadalupe Treviño Vera ²	214
PUESTA EN MARCHA DE UN EQUIPO DE SINTESIS DE PELICULAS DELGADAS POR EL METODO DE DEPOSITACION QUIMICA DE VAPOR ASISITDA POR AEROSOL Jesus David Lopez Preciado ¹ y Juan Ramos Cano ²	215
PREPARACIÓN Y TRATAMIENTO QUÍMICO DE MINERAL DE CELESTITA PARA OBTENER COMPUESTOS MAGNETICOS José Alfonso Rodríguez Nañez ¹ y Ma. Gloria Rosales Sosa ²	221
LIXIVIACION DE MINERALES UTILIZANDO REACTIVOS ORGANICOS E INORGANICOS José Guadalupe Moreno Cedillos ¹ y Ma. Gloria Rosales Sosa ²	225
CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE CEPAS CON CAPACIDAD DE BIODEGRADACIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES "COV S" Pérez Mireles Karen Allinet ¹ y Conde Bajaras Eloy ²	228
 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DEL HONGO BEAUVERIA BASSIANA PROVENIENTES DEL ESTADO DE GUANAJUATO. Bañuelos Vaquera Karla Lizeth ¹ y Padilla Guerrero Israel Enrique ² .	232
ANÁLISIS DE LA MORFOLOGÍA DE PARTÍCULAS DE CUARZO POR MICROSCOPIA ÓPTICA Kassandra Arantxa Vega Treviño ¹ y Nancy Verónica Pérez Aguilar ² Enrique ² .	237

COMPROBACIÓN DE LA CAPACIDAD ADSORBENTE DE RESIDUOS DE CAFÉ MEDIANTE ISOTERMAS DE ADSORCIÓN Y PUNTO DE CARGA CERO Kassandra T. Ávila-Alvarez ¹ & Nancy V. Pérez-Aguilar ² .	241
ADSORCIÓN MULTICOMPONENTE DE METALES PESADOS EN CONDICIONES DINÁMICAS EMPLEANDO COLUMNAS DE LECHO FIJO DE CARBÓN DE HUESO Luis Alberto Guzmán Astrain ¹ y Adrián Bonilla Petriciolet ²	244
RESISTENCIA DE AISLADOS MICROBIANOS RESISTENTES A CO Y ZN. Miriam Anguiano Morales ¹ y Cesar Díaz Perez ²	247
CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE AISLADOS BACTERIANOS DE GUANAJUATO Patricia Jaqueline Nava Hernández ¹ y Juan Gualberto Colli Mull ²	250
CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE AISLADOS BACTERIANOS DE GUANAJUATO Rosa Ddariela Rosales Mejía ¹ Y Juan Gualberto Colli Mull ²	253
¿CÓMO REGULA LA EXPRESIÓN DE ALGUNOS FACTORES DE VIRULENCIA EL HONGO PATÓGENO OPORTUNISTA CANDIDA GLABRATA? Zulema Carlos López ¹ e Irene Beatriz Castaño Navarro	257
PRUEBAS DE CONTROL BIOLOGICO DE ACTINOMICETOS DE SUELO DE AREAS NATURALES PROTEGIDAS CONTRA HONGOS FITOPATOGENOS Albo Josué Hernández Rojas ¹ y Blanca Estela Gómez Luna ²	261
INTRODUCCION AL MANEJO DE MICROALGAS: CHORELLA Cinthia Alejandra Silva Hernández ¹ y Dr. Enrique Arturo Cantoral Uriza ²	266
CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES Y ESPECIES SILVESTRES DE LA FAMILIA DROSOPHILIDAE DEL CENTRO DE LA REPÚBLICA Cristopher Ivan Gastón Martínez ¹ y Dr. Juan R. Riesgo-Escovar ²	269
CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES Y ESPECIES SILVESTRES DE LA FAMILIA DROSOPHILIDAE DEL CENTRO DE LA REPÚBLICA Cristopher Ivan Gastón Martínez ¹ y Dr. Juan R. Riesgo-Escovar ²	273

RESTAURACIÓN ECOLÓGICA DEL BOSQUE MESÓFILO DE MONTAÑA EN XILITLA UTILIZANDO UN MÉTODO DE TRANSLOCACIÓN DE ESPECIES	277
Lizeth Harzbecher de la Vega ¹ y Jorge A. Flores Cano ²	
"EFECTO DE LA SUMINISTRACIÓN INTRACEREBROVENTRICULAR DE LPS EN LA PRODUCCIÓN DE OLIGÓMEROS DE AB EN RATÓN C57BL/6J"	281
Luis Felipe Delgado Sánchez ¹ y Díaz Miranda Sofía Yolanda ²	
EFFECTO DE LA D-SERINA SOBRE LA PLASTICIDAD NEURONAL EN RATAS DE EDAD AVANZADA.	285
Miranda Tavera Luis Fernando ¹ ; Alejandra Calero Vargas ² ; Rojas Piloni Gerardo ³ y Mónica López- Hidalgo ²	
ASLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE ACTINOMICETOS DE SUELOS POTOSINOS	288
Silva Robles Montserrat ¹ y Morales Jimenez Jesús Israel ²	
EFFECTO POTENCIAL DE LAS ESPECIES ÍCTICAS INVASORAS EN RÍOS DE LA RESERVA DE LA BIOSFERA DE LA SIERRA GORDA DE QUERÉTARO	292
Paola Lisette Hernández Rubio ¹ y Juan Pablo Ramírez Herrejón ²	
REMOCIÓN DE FLUORUROS Y BROMUROS DE SOLUCIONES ACUOSAS SOBRE HIDROGELES DE QUITOSANO RETICULADO CON FORMALDEHÍDO	296
Alejandra Castro Gámez ¹ y Nahúm Andrés Medellín Castillo ²	
DINÁMICA DE MEZCLAS AZEOTRÓPICAS CUATERNARIAS CON MAPAS DE RESIDUO	300
Bernardo Valadéz Hernández ¹ y Raúl González-García ²	
SÍNTESIS DE AZIDAS AROMÁTICAS UTILIZANDO NUEVAS METODOLOGÍAS.	305
Francisca Johana Aguilar Costilla ¹ , Elisa Leyva Ramos ¹ y Silvia Elena Loredó Carrillo ¹ .	
EFFECTOS DE LOS FRUCTOOLIGOSACARIDOS DE DIFERENTE ÍNDICE DE POLIMERIZACIÓN DEL Agave tequilana EN EL CRECIMIENTO DE BACTERIAS PROBIÓTICAS	309
Castro Flores Francisco ¹ y Martínez Gutiérrez Fidel ²	
ESTUDIO CINÉTICO DE LA EXTRACCIÓN DE RODIO (III) EN MEDIO CLORUROS EMPLEANDO CYPHOS® IL 104 COMO EXTRACTANTE	313
Jessica Guadalupe Meléndez Marmolejo ¹ y Mario Ávila Rodríguez ²	

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE BIOCHAR A PARTIR DE CÁSCARA DE NUEZ MODIFICADA POR IMPREGNACIÓN DE Na_2CO_3 Hernández Ramírez, J. J.; Ocampo Pérez, R.; Coronado Oyavide, P.; Medellín-Castillo N. A.	317
REGISTRO DE FAUNA SILVESTRE EN LA SIERRA DE ALVAREZ, SAN LUIS POTOSÍ Méndez González Karen Neftalí ¹ y Espinosa Andrade Santiago Rafael ²	322
ALTERACIONES DEL SISTEMA COLINERGICO ESTRIATAL EN UN MODELO DE RATA AUTISTA. Cantú Flores K.; Ibáñez-Sandoval O.; Ibáñez Sandoval D. N.; Nolasco Alfaro K.; Aguilar Aguilar A. E.	326
ESTIMACIÓN DE PRODUCCIÓN DE ENERGÍA SOLAR CONSIDERANDO LOS EFECTOS DE LOS PARÁMETROS METEOROLÓGICOS, EN LA REGIÓN ALTIPLANO DE ESTADO DE SAN LUIS POTOSÍ. Olvera Laura ¹ , Nava Dora ¹ , Reyes Diego ¹	330
DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS COLIFORMES TOTALES EN PLACA, DE QUESOS FRESCOS DE CABRA EN EL ALTIPLANO POTOSINO, SAN LUIS POTOSÍ, MÉXICO Noemi Orozco Villegas ¹ y María Cruz del Rocío Terrones Gurrola ²	334
EVALUACIÓN DE LA REGENERACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ZnO Y NANOCOMPOSITOS ZnO /POLIPIRROL COMO ADSORBENTES DE CROMO (VI). Hernández Loredo, N. E. 1 y Pérez Aguilar, N. V.2	338
DESARROLLO DE SEMICONDUCTORES PARA APLICACIONES EN CELDAS SOLARES Aguirre Contreras, S.1; Moreno García, H.2	342
ESTUDIO FITOQUÍMICO Y EVALUACIÓN DEL EFECTO HIPOGLUCEMIANTE DEL EXTRACTO FLUIDO DE TRONADORA COMPUESTO REDSA®. Hernández Zapata, S.1; Juárez Flores, B.2; Portillo Gerónimo, E.3; Rendón Huerta, J. A. 2; Regalado Rentería,	346
EVALUACIÓN DE LA FACTIBILIDAD TECNOLÓGICA DE ELABORADO PAPEL CON CELULOSA DE OPUNTIA FICUS INDICA Y SUS CARACTERÍSTICAS. Aleydis Cervantes Dueñas ¹ y Myrna Alicia Abraján	350

Villaseñor²

IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS METAL RESISTENTES EN SUELOS CONTAMINADOS

Claudia Zelmira Jiménez Aguilar¹ y Juan Armando Flores De La Torre²

354

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE REMOCIÓN DE DICLOFENACO Y NAPROXENO, SOLOS O EN MEZCLA UTILIZANDO PLANTAS

Gamez Villela Sandra Nayeli¹ y Alfaro de la Torre Ma. Catalina²

358

ANÁLISIS FITOQUÍMICO Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE GARAMBULLO Y CAPULÍN

Stephanie Fernández Avalos¹ y Dra. María Isabel García Vieyra²

362

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE 7-METOXI-4-FENIL-3,4-DIHIDRO-2H- BENZO[1,3]OXAZINA-2-THION.

¹Verónica Lizeth Venegas González y ²Gerardo González García.

366

EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE PÉPTIDOS SINTÉTICOS DE VASOHINIBINAS EN UN MODELO FISIOLÓGICO DE RATONES BALB/C

Yolanda Monserrath Jacobo Delgado¹, Gabriela Navarro Tovar², Aarón Milo Álvarez^{2, 3}, Sergio Rosales Mendoza^{2, 3}, Juan Jesús Barrios Capuchino^{2, 3} y María del Carmen González Castillo^{2, 3}

370

SINTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE CRISTALES TERMOLUMINIScentes DE LiF DOPADOS CON TIERRAS RARAS POR EL MÉTODO DE PRECIPITACIÓN

Arizbeth Vianey Andrade Lobatón¹ y Miguel Ángel Vallejo Hernández²

374

A FURTHER SEARCH FOR GALACTIC STARS WITH DOUBLE RADIO LOBES

Braulio Arredondo Padilla¹ and Heinz Andernach²

378

ACTIVIDAD ELECTROQUÍMICA DEL RODIO (III) EN EL LÍQUIDO IÓNICOTRIHEXIL(TETRADECIL)-FOSFONIO BIS (2-4-4 TRIMETILPENTIL)FOSFINATO (CYPHOS IL 104) SOBRE SUSTRATO DE ORO

Pacheco Díaz Diana Laura¹ y Silvia Gutiérrez Granados²

382

EFFECTOS ANTINOCICEPTIVOS DE TILIFODIOLIDE UN COMPUESTO AISLADO DE SALVIA TILIIFOLIA VAH1 (LAMIACEAE)

Edgar Isaac Rojas Bedolla.¹ y Ángel Josabad Alonso

386

Castro 2. LAS CUTÍCULAS DE NOPAL (<i>Opuntia ficus indica</i> var. <i>Atlíxco</i>) Y SU ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA NATURAL Elizabeth Flores Rodríguez ¹ , Lorena Vargas Rodríguez ² , Eva Edilia Ávila Muro ³	389
TOLERANCIA A ESTRÉS ABIÓTICO POR METALES PESADOS INDUCIDO POR HONGOS ENDÓFITOS Valadez Becerra Fátima ¹ y Morales Vargas Adan ²	393
ANÁLISIS CINEMÁTICO DE LA MARCHA EN RATAS CON LESIÓN MEDULAR TRATADAS CON ACETATO DE LEUPROLIDA Fátima Guadalupe Tapia Rodríguez ¹ y José Luis Quintanar Stephano ²	397
REDUCCIÓN DE CROMO HEXAVALENTE MEDIANTE CEPAS DE <i>YARROWIA LIPOLYTICA</i> Guaní Sánchez Gloria Dhení ¹ y Morales Vargas Adan Topiltzin ²	401
EFFECTOS ANTINOCICEPTIVOS DE TILIFODIOLIDE UN COMPUESTO AISLADO DE <i>SALVIA TILIIFOLIA</i> VAH1 (LAMIACEAE) Jorge Luis Gutiérrez Pérez ¹ y Ángel Josabad Alonso Castro ²	405
EVALUACIÓN DE LA TOLERANCIA A CR VI EN CEPAS DE HONGOS ENDÓFITOS González Bravo María Guadalupe ¹ y Morales Vargas Adan Topiltzin ²	409
CARACTERIZACION DE UN MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES EN RATA. Mario Iván Arenas López ¹ y Karla Susana Vera Delgado. ²	413
COMPLEJOS DE Cu(I) CON LIGANTES SACNAC EN CATÁLISIS Acevedo González Reynaldo (1), López Jiménez Jorge Albino (2)	417
MONITOREO DEL CRECIMIENTO DE UNA PLÁNTULA. Rodríguez Estrada Luis Enrique ¹ y Mata Donjuan Gloria Flor ²	421
GEOLOCALIZACIÓN Y DIVULGACIÓN DE ZONAS DE RIESGO POR MERCURIO EN ZONA MINERA DE PEÑAMILLER José Raúl Vasconcelos Hernández ¹ e Hilda Romero Zepeda ²	424

CARACTERIZACION DE TEQUILA USANDO ESPECTROSCOPIA RAMAN Y ANALISIS FISICOQUIMICOS

¹ Rangel Sánchez, C. y ² Rodríguez Ávila, R

RESUMEN

La presente investigación fue realizada con una de las espectroscopias de mayor crecimiento en los últimos años; la espectroscopia Raman, con la cual se analizaron cuatro diferentes tequilas comerciales; obteniendo de estos sus grupos funcionales, así se pudo descartar la presencia de metanol en ellos; pero se encontraron grupos funcionales que les brindan su aroma y sabor característico entre estos se encontró el grupo funcional del etanol. También se realizaron pruebas físico químicas las cuales fueron de acidez total y de cenizas; estas fueron llevadas a cabo conforme a las Normas NMX-V-016-1980 y NMX-V-017-S-1981 respectivamente. Los tequilas analizados poseen diferencias en su forma de producción por esto las cantidades de acidez y de cenizas son diferentes.

ABSTRACT

The present research was carried out with one of the highest growth spectroscopies in recent years; Raman spectroscopy, with which four different commercial tequilas were analyzed; Obtaining from these their functional groups, thus could be ruled out the presence of methanol in them; But functional groups were found that give them their characteristic aroma and flavor among which the ethanol functional group was found. Physical chemical tests were also carried out, which were of total acidity and ashes; these were carried out in accordance with NMX-V-016-1980 and NMX-V-017-S-1981 respectively. The analyzed tequilas have differences in their form of production for this the amounts of acidity and ashes are different.

Palabras clave: Tequila, espectroscopia Raman, análisis fisicoquímicos.

INTRODUCCIÓN

El Tequila es una bebida alcohólica mexicana con denominación de Origen (D. O. T.) obtenida de la doble destilación de jugo fermentado, también llamado mosto, que proviene de la planta *Agave Tequilana* Weber variedad Azul (Ulises Contreras-Loera, 2009). La fermentación alcohólica en el proceso de elaboración del tequila es una etapa de suma importancia, ya que influye en el rendimiento y en las características organolépticas del destilado alcohólico (José Arnoldo Lopez-Alvarez, 2012). En el proceso de fermentación del tequila es importante controlar el factor de la acidez de este ya que debe estar en un rango de entre 4-5 (NOM-006-SCFI-2005).

El método Raman es una técnica rápida y no destructiva puede ser una herramienta útil, por rapidez y bajo costo (J.Luis Sanchez-Millan, 2007). Se ha utilizado la espectroscopia Raman para una gran variedad de análisis en alimentos como pueden ser identificación de contaminantes, determinación cualitativa y cuantitativa de azúcares, carbohidratos, grasas o adulteraciones presentes en los alimentos (J.C. Ramos, 2013) - (Batsoulis, 2005).

MARCO TEÓRICO

El tequila es una de las bebidas más famosas a nivel nacional y mundial. Se obtiene de la planta *Agave tequilana* Weber, mejor conocido como *Agave azul*. La parte de la planta que es utilizada para la elaboración del tequila es la piña. Una vez que las piñas son cortadas, se llevan a un horno en donde se realiza la operación del cocimiento; éste tiene la finalidad de degradar los azúcares complejos presentes en la piña en azúcares simples para que puedan ser utilizados por la levadura en la operación de fermentación. El principal carbohidrato complejo presente en el agave es la inulina, el cual es un polímero de fructosa con un residuo terminal de glucosa. Cuando la inulina se degrada por se degrada por la acción de la acidez del jugo y del calor en el cocimiento, se obtienen principalmente fructosa y glucosa. En seguida, se muelen las piñas para extraer el jugo que es colocado en tinajas y es inoculado con un cultivo de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, responsable de la fermentación de los azúcares presentes en el jugo. Después el fermentado se destila, para obtener etanol y vinazas (mezcla de levaduras muertas, azúcares no fermentables y minerales). El tequila puede ser envasado inmediatamente después de la destilación o puede añejarse en barricas de madera, las que le confieren las características de sabor y color (M. Bauista Justo. L.J. Oropeza Garcia, 2001). La espectroscopia Raman es una técnica fotónica que al hacer incidir un haz de luz monocromática tipo láser sobre la muestra permite analizar la pequeña fracción de luz dispersada que presenta cambios frecuenciales (bandas Raman) emitidos y que son característicos del material en estudio y representan información valiosa acerca de la composición química. Es una técnica inelástica debido a que no existe conservación de la energía, es decir la energía del fotón incidente del Laser es distinta a la del fotón emitido por la muestra y su diferencia energética representa la energía necesaria para activar los modos normales de vibración molecular. Como toda técnica espectroscópica, la información de los picos característicos obtenidos de la señal Raman para una sustancia; constituyen la huella digital que permiten verificar la presencia de esta en una muestra y su respectiva cuantificación (G. Soler Barrera J. L.-H., 2013). La espectroscopia Raman se ha utilizado para la determinación de los grados de alcohol en bebidas alcohólicas como el pulque, vino y whisky; al igual en vodka también se ha utilizado para determinar el contenido de metanol y así identificar las bebidas adulteradas (M. Cervantes Contreras, 2008).

METODOLOGÍA

Para poder realizar el análisis de las muestras se contó con los siguientes procesos y equipos.

ESPECTROSCOPIA RAMAN

Fue realizada con el equipo Ocean Optics modelo QE65000 con una longitud de onda de 785nm y una potencia de 490 mw. En las figuras 1-2 se muestra el espectrómetro y el arreglo del equipo, respectivamente.



Figura 1. Espectrómetro



Figura 2: Arreglo de la instalación del espectrómetro

Se llevó a cabo la calibración del equipo usando como muestra aspirina (ya que el espectro arrojado ya es conocido); el software a usar es Spectrasuite con una potencia de 900 mw.

Para llevar a cabo el análisis de las muestras de tequila Jose Cuervo, Campo Azul, 7 Leguas y El Relicario de Tonayan en espectroscopia Raman se tomaron 3 mL para su análisis, en la figura 3 se muestra una imagen de los tequilas comerciales usados en este análisis.



Figura 3. Muestras de Tequila comercial

DETERMINACIÓN DE ACIDEZ TOTAL.

En una cápsula de porcelana se neutralizaron 250 mL de agua, se utilizaron 2 mL de disolución de fenolftaleína como indicador y disolución de hidróxido de sodio 0.1N, se agregaron 25 mL de la muestra y se tituló con disolución de hidróxido de sodio 0.1N.

DETERMINACIÓN DE EXTRACTO SECO Y CENIZAS.

Se tomaron de 25 a de la muestra, se colocaron en el crisol que se encuentra a masa constante, se evaporó a sequedad en el baño maría, se llevó el crisol a la estufa a una temperatura de 95°C durante 3 horas; se dejó enfriar en el desecador y se determinó su masa. El crisol que contiene el residuo del extracto seco se colocó en la mufla a una temperatura de 525°C durante 1 hora, se sacó el crisol se enfrió y se humedecieron las cenizas con agua, se secaron en baño maría, luego en la parrilla y se recalcaron en la mufla a 525°C hasta obtener masa constante.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las figuras 4, 5, 6 y 7 se muestran los espectros de los tequilas analizados en el equipo Raman, así como en la figura 8 se muestra el espectro que incluye a los espectros de tequila anteriores y a los espectros del etanol y metanol puros, en lo cual cabe remarcar que el grupo funcional que se presenta es del etanol dejando de lado la presencia de metanol en los tequilas analizados, de igual manera se muestran las intensidades Raman encontradas en los tequilas los cuales nos indican su composición en lo que destaca grupos funcionales de anillos aromáticos, grupos carbonil y grupos hidroxilo.

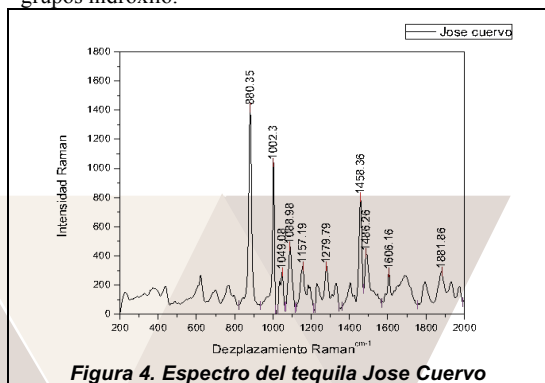


Figura 4. Espectro del tequila Jose Cuervo

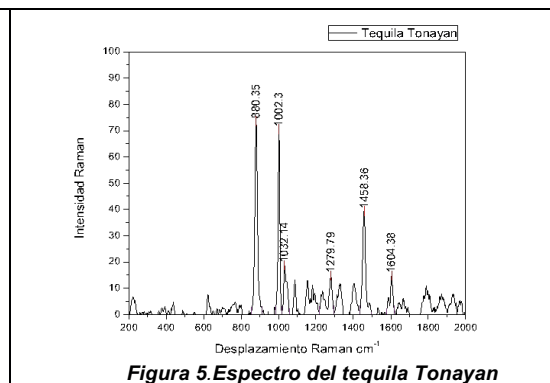


Figura 5. Espectro del tequila Tonayan

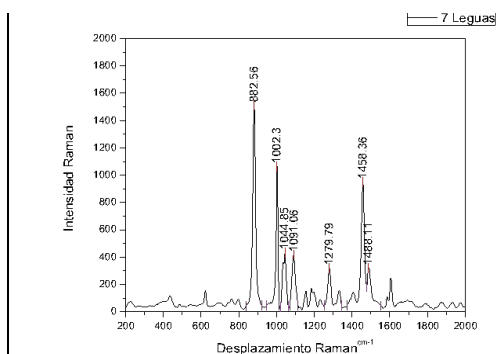


Figura 6. Espectro de tequila 7 Leguas

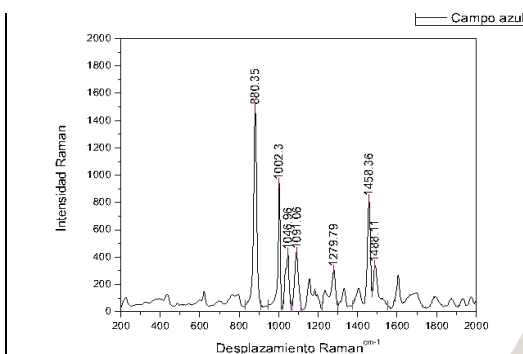


Figura 7. Espectro del tequila Campo Azul

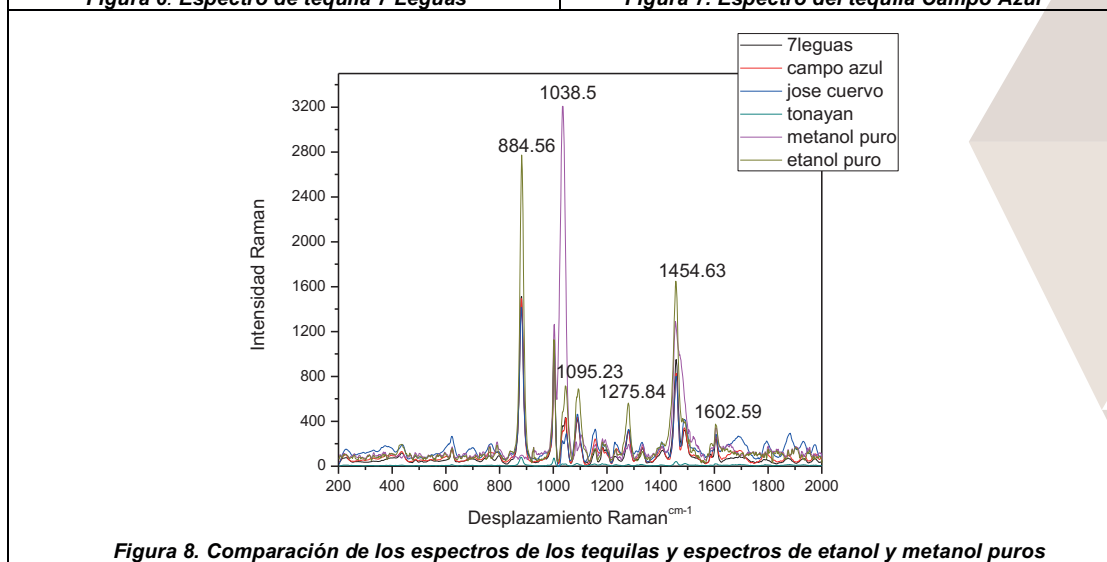


Figura 8. Comparación de los espectros de los tequilas y espectros de etanol y metanol puros

Los grupos de mayor relevancia son expuestos en la tabla 1 en la cual se puede apreciar los grupos funcionales representativos de la intensidad Raman encontrada en el espectrómetro, el grupo funcional fue asignado conforme la bibliografía de la referencia a seguir (Colthup, 1990).

Tabla 1. Grupos funcionales del tequila a diferentes intensidades encontradas en Raman

Grupo funcional	Frecuencia Raman cm-1	Referencia de intensidades
C-O	1038.5	750-1300
OH	884.56	500-900
C-O	1095.23	1000-1300
CH	1275.84	1150-1350
CH2 y CH3	1454.63	1250-1500
Anillos Aromáticos	1602.69	1420-1620

La determinación de la acidez total se realizó conforme a los lineamientos establecidos por la norma NMX-V-016-1980 con la formula (1) que se obtuvo de la norma para el cálculo de la acidez total de las bebidas alcohólicas destiladas, obteniendo como resultado los siguientes valores:

$$A.T. = \frac{V \times N \times 60 \times 100}{M} \times \frac{100}{G.A.R.} \quad (1)$$

A.T.= Acidez total; V= Volumen de la disolución de hidróxido de sodio gastado en la titulación de la muestra, en mL; N= Normalidad de la solución; M= Volumen de muestra empleada en mL; G.A.R.=Grados de alcohol reales; 60=Miliequivalente del ácido acético expresado en miligramos.

Campo azul A.T.= 105 mg de ácido acético/100 mL de muestra.

7 Leguas A.T.= 60 mg de ácido acético/100 mL de muestra.

Jose Cuervo A.T.= 12.63 mg de ácido acético/100 mL de muestra.

La determinación de cenizas se realizó conforme a los lineamientos presentes en la norma NMX-V-017-S-1981 con la formula (2) respectivamente que se establece en la norma para calcular la cantidad de cenizas presentes en las bebidas alcohólicas, obteniendo los siguientes resultados:

$$C = \frac{M_o - M_1}{V} \times 100 \quad (2)$$

C=Cenizas; V=Volumen de muestra empleada en mL; Mo=Masa de la cápsula más cenizas en g; M₁=Masa de cápsula vacía en g.

Campo azul C=0.0584 g/L

Tonayan C=0.0208 g/L

Jose Cuervo C=0.0684 g/L

Los resultados obtenidos de las pruebas fisico-químicas fueron acordes a lo esperado, ya que los valores se encuentran dentro de los límites permisibles, aunque el Tequila “Tonayan” mostro muy poca cantidad de cenizas y un valor muy alto en la prueba de acidez total, esto puede ser causado por el proceso de fabricación ya que también presentaba características físicas diferente a los demás como era su color y su aroma estos más intensos que los demás tequilas analizados.

CONCLUSIÓN

Los tequilas analizados por espectroscopia Raman no muestran presencia de metanol, lo que nos indica que no son adulterados y pueden ser consumidos bajo la responsabilidad de quien lo adquiere. Se encontraron grupos funcionales similares entre las diferentes muestras de tequila como fueron anillos aromáticos con una frecuencia de 1602.69, CH₂ y CH₃ con una frecuencia de 1454.63, por mencionar algunos. Por otro lado la prueba de cenizas nos arroja datos sobre cuanto extracto del agave tiene el tequila, así se pudo conocer que el tequila Relicario es elaborado sin el uso de mucho agave en su producción por lo cual su acidez esta en incremento con un pH de 8.38 saliendo totalmente de la norma.

BIBLIOGRAFÍA

- Batsoulis, A. N. (2005). FT-Raman spectroscopy simultaneous determination of fructose and glucose in honey. *Journal of Agricultural and food chemistry*, 3.
- Bautista Justo M., G. O.-C.-N. (2001). EL Agave tequilana Weber Y LA PRODUCCIÓN. *Acta Universitaria*, 11(2), 10.
- Colthup, N. B. (1990). *Introduction to infraared and raman spectroscopy*. Academic Press, Inc.
- G. Soler Barrera, J. L.-H. (2013). Caracterizacion vibracional por espectroscopia Raman del grano de cafe tipo comercial. *Scientia et Technica*, 6.
- J.C. Ramos, A. L. (2013). Espectroscopia Raman y sus aplicaciones . 13.
- J.Luis Sanchez-Millan, M. S.-C.-E. (2007). Espectroscopia Raman: herramienta rapida y no invasiva para determinar carotenoides en inflorecencias de tagetes erecta. *Agociencia*, 10.
- Jose Arnoldo Lopez-Alvarez, A. L.-P.-G. (2012). Estudio comparativo de rendimiento y contenidos de compuestos volatiles en un proceso de elaboracion de tequila a nivel industrial. *Ciencia Nicolaita*, 12.
- M. Bauista Justo. L.J. Oropeza Garcia, L. P.-N. (2001). El agave tequilana Waber y la produccion . *Acta Universitaria*, 10.
- M. Cervantes Contreras, M. P. (2008). Caracterizacion microbiologica del pulque y cuantificacion de su contenido de etanol mediante espectroscopia Raman. *Superficies y Vacio* , 5.
- Ulises Contreras-Loera, e. a. (2009). Identificacion y discriminacion de tequilas reposados in situ para la proteccion de la marca. *Revista Electronica Nova Scientia*, 12.

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

Raygoza Roque Fabian¹ y Gómez Luna Blanca Estela²

RESUMEN

Los actinomicetos son bacterias que poseen propiedades para el crecimiento vegetal, su obtención y caracterización representa una de las apuestas más grandes para la conservación de las ANP's (áreas naturales protegidas) y la obtención de nuevos fertilizantes biológicos, los cuales reducirían notablemente los efectos producidos por fertilizantes químicos y brindarían protección a semillas y plántulas en desarrollo contra agentes biológico-patógenos. En el presente trabajo se realizó el aislamiento de nuevas promotoras de crecimiento, así como su resistencia y capacidad de inhibición ante agentes fitopatógenos (antagonismo), se probó la eficacia para incrementar aspectos a un crecimiento sano como la velocidad de crecimiento, tamaño de la raíz, aumento en los pelos radiculares, efectividad de germinación, peso húmedo y seco de plántulas de rábano y lenteja.

ABSTRACT

Actinomycetes are bacteria that have properties for plant growth, their production and characterization represents one of the biggest bets for the conservation of natural protected areas and the obtaining of new biological fertilizers, which would greatly reduce the effects produced by chemical fertilizers and Would provide protection to seeds and seedlings in development against biological-pathogenic agents. In the present work, the isolation of new growth promoters, as well as their resistance and ability to inhibit phytopathogenic agents, were tested to increase aspects of healthy and rapid growth such as growth speed, root size, Increase in root hair, germination effectiveness, wet and dry weight of radish and lentil seedlings.

Palabras clave: actinomicetos, áreas naturales protegidas, fitopatógenos, antagonismo.

INTRODUCCIÓN

La humanidad enfrenta, actualmente, una crisis ambiental y social causada por diferentes factores socio-económicos que impactan sobre la diversidad biológica (Challenger, 2009). En México, los problemas de degradación de suelos, deforestación, sobreexplotación de recursos hídricos y pérdida de biodiversidad, dejaron de considerarse como simples datos estadísticos para constituir la causa de numerosos conflictos sociales (Cotler, 2004). El país conserva solo aproximadamente 50% de su cobertura de vegetación natural y se han perdido 127 especies vegetales y animales de las que 74 (58.2%) eran endémicas (Conabio, 2009).

Para tratar de solventar estos problemas, se han llevado a cabo diversos programas de reforestación, pero, uno de los problemas existentes es que en la rizósfera se encuentran hongos fitopatógenos tales como *Alternaria* spp., *Fusarium* pp, *Rhizoctonia*spp. y *Colletotrichum* spp., entre otros que atacan pequeñas plántulas y semillas importantes para las ANP's (Gohel et. al., 2006).

Con las nuevas regulaciones y restricciones en el uso de plaguicidas y la demanda de productos orgánicos, crece el interés por el uso de tácticas alternativas a los fungicidas para el manejo de enfermedades, particularmente el uso de microorganismos benéficos, y sus metabolitos primarios y secundarios (Ezziyyani et. al. 2004). Actualmente, diversas investigaciones se han centrado en la búsqueda de nuevos antimicrobianos, principalmente de origen en actinomicetos, por su prolífica producción de antibióticos naturales y metabolitos secundarios (Oskay & Tamer, 2004). Los productos de actinomicetos incluyen principalmente: antibióticos, antifúngicos, metabolitos, enzimas extracelulares (quitinasas, peroxidasas, glucanasas), inhibidores enzimáticos, neurotransmisores, terpenoides, pigmentos, anticancerígenos y pesticidas entre otros; presentan una alta actividad metabólica y son capaces de degradar la materia orgánica vegetal y animal, producen sideróforos, sustancias promotoras del crecimiento vegetal *in vitro*, ayudan a la asimilación del hierro en la fijación de nitrógeno, lo cual contribuye indirectamente a la promoción de crecimiento vegetal (Crawford et. al., 1993), de ahí destaca la importancia del presente trabajo.

METODOLOGÍA

Obtención de suelo

Se tomaron muestras provenientes de los alrededores de las raíces de encinos, removiendo la hojarasca, ubicando la zona de extracción a 15 cm de la superficie.

Preparación del suelo

Se tamizará la muestra de rizófora obtenidas, provenientes de la Sierra de los agustinos con posición geográfica y agitando vigorosamente durante 2 horas utilizando un tamiz de la serie TYLER malla no. 20

Posteriormente, se tomarán 20 g de rizósfera para disolver en 90 ml de agua estéril.

Obtención de nuevas promotoras de crecimiento

Para el aislamiento de las rizobacterias, Las muestras de suelo se inocularon en el medio selectivo ACC (1- ácido carboxílico, -1- aminociclopropano desaminasa), el cual contiene por litro 4 g KH₂PO₄, 6 g NaHPO₄, 0.2 g MgSO₄, 1 mg FeSO₄, 10 µg H, 10 µg MnSO₄, 50 µg CuSO₄, 10 µg MoO₃, 70 µg ZnSO₄, glucosa 0.2%, ac. Glucónico 0.2%, 0.2%, agar bacteriológico al 2% y ACC 3mM.

Vaciar en placas el medio que contiene agar.

Preparación de los actinomicetos

Para el experimento se utilizaron las cepas 113, 121, 125, 210, 254, 256, 257, 257.1, 258, 263, 263.1, 264, 264.1, 265, 265.1, 266, 269, 302, 303, 304 y un control, dichas cepas se sembraron en el medio PDA para aislar y aumentar su población, se incubaron a 28°C por 24 horas.

Se realizó tinción de Gram a cada una de las cepas antes mencionadas.

Prueba de germinación

En tubos falcon, se inocularon 10 ml de PDA, los cuales se incubaron a 28°C por 24 horas para posteriormente colocar 15 semillas de rábano (*Rabhanus sativus*) y 25 semillas de lenteja (*Lens culinaris*), las cuales se llevaron a agitación por 15 minutos.

En cajas Petri con papel previamente esterilizadas, se colocaron 3 ml de agua estéril para humedecer el papel y posteriormente se colocaron las semillas en 3 hileras de 5 semillas para el caso del rábano y en 5 hileras de 5 semillas para el caso de la lenteja. Las cajas se llevaron a incubar a 28°C por 3 días con revisión cada 24 horas

Prueba de Antagonismo

A las cepas antes mencionadas, se les realizó una prueba de antibiosis contra hongos fitopatógenos; *Fusarium oxysporum*, *Alternaria sp*, *Bipolaris sp*. Dichos hongos se aislaron colocando una rodaja de cepa de hongo en el centro de una caja de Petri con medio PDA para obtener un crecimiento radial, posteriormente se llevaron a incubar a 28°C por 48 horas para obtener una ligera ventaja del crecimiento del hongo contra la bacteria. Obtenido el crecimiento adecuado del hongo, se procede a sembrar las cepas de bacterias antes mencionadas en 4 puntos de la placa, se dejan en incubación por 48 horas a una temperatura de 28°C.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Pruebas de germinación

Se obtuvieron los siguientes resultados para los dos tipos de semillas utilizadas, se utilizó un control únicamente con agua para tratar las semillas, para las demás, se utilizó como tratamiento 1 ml de caldo PDA inoculado con la respectiva cepa a evaluar.

a) Lenteja

Se observó un crecimiento de las raíces superiores al control en las cepas 113 (18.66%), 121(8.86%), 210(20.72%), 254(20.28%), 256(31.37%), 257.1(3.41%), 258(67.74%), 265(17.99%), 265.1(6.67%), 269(3.27%), 302(44.02%) y 303(34.71%) como se indica en la figura 1.

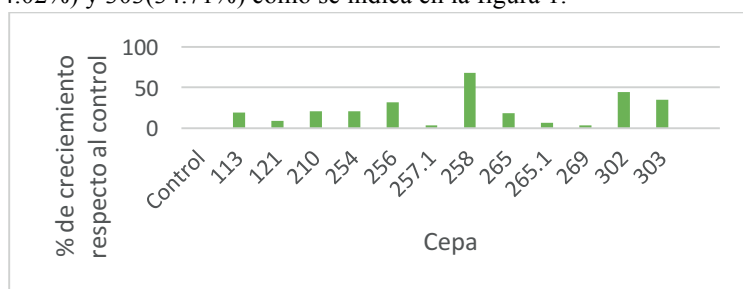


Figura 1 Aumento de crecimiento de las raíces de lenteja respecto al control en porcentaje

Para el porcentaje de germinación se obtuvo que las cepas 113 (96%), 121 (100%), 210 (100%), 254 (100%), 256 (100%), 258 (100%), 263 (96%), 263.1 (96%), 264 (100%), 265 (100%), 265.1 (100%), 266 (96%) y 303 (96%) tuvieron una tasa de germinación mayor a la del control (95%) como se muestra en la figura 2.

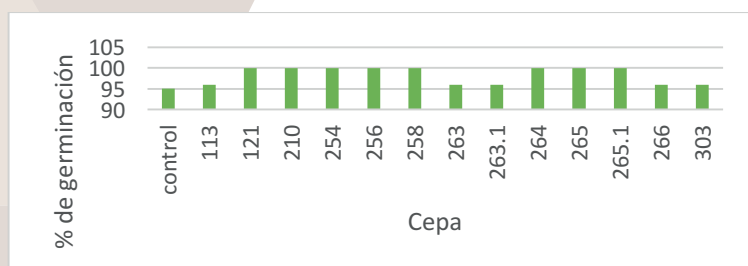


Figura 2 Porcentaje de germinación de la lenteja respecto al control

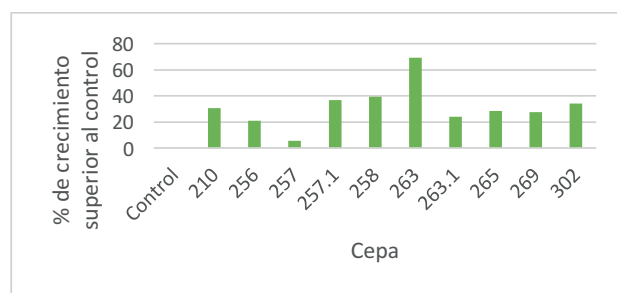


Figura 3 Porcentaje de crecimiento superior de la raíz de rábano respecto al control

Se obtuvieron resultados para un porcentaje de germinación del rábano superior al del control en todas las cepas probadas a excepción de la 254 y 257.1 como se indica en la figura 4.

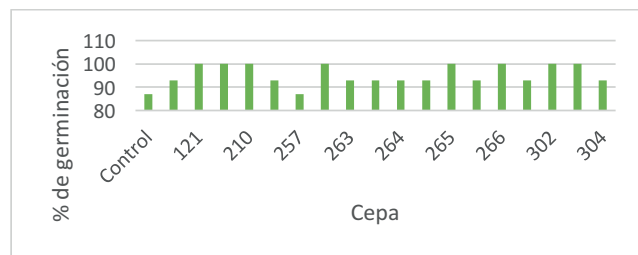


Figura 4 Porcentaje de germinación de las semillas de rábano

Prueba de antagonismo

De las cepas confrontadas a *Fusarium oxysporum* las que mostraron resistencia fueron: 113, 121, 256, 257, 258, 263, 263.1, 266, 269, 302, 303 y 304. Para la confrontación ante *Bipolaris sp* las cepas que mostraron resistencia fueron: 121, 254, 256, 257, 258, 263, 263.1, 265, 266, 303 y 304. Para la confrontación ante *Alternaria sp* las cepas que presentaron resistencia e inhibición al crecimiento fueron: 113, 256, 257, 263, 263.1, 265, 266, 269, 302, 303, 304.



Figura 5 Confrontación de cepa vs *Fusarium oxysporum* cara inferior de la placa

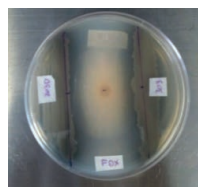


Figura 6 Confrontación de cepa vs *Fusarium oxysporum*, cara superior de la placa

CONCLUSIONES

El estudiar bacterias que promueven el crecimiento bacteriano, es una de las alternativas más prometedoras no solo para la industria, también para las áreas naturales protegidas, puesto que, éstas muestran un aumento significativo en el crecimiento vegetal y no solo eso, sino que también una protección ante elementos Fito patógenos del medio natural en donde se encuentran. Las bacterias provenientes de las áreas naturales protegidas juegan un papel muy importante para la conservación y protección de las áreas naturales protegidas y posiblemente serán los fertilizantes del futuro.

REFERENCIAS

- Bautista-Calderón. (2007). Las vedas forestales en el México post-revolucionario. *SciELO*, 186.
- Challenger, A. y. (2009). "Factores de cambio y estado de la biodiversidad" *Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Capital natural de México. Vol. II*. Conabio.
- Conabio. (2009). *Capital natural de México*. México: Conabio.
- Cotler, H. (2004). El manejo integral de cuencas en México: estudios y reflexiones para orientar la política ambiental. 2a ed. *Instituto Nacional de Ecología*, 345.
- Crawford, D. L., Lynch, J. M., & Whipps, J. M. (1993). Isolation and characterization of actinomycetes antagonists of a fungal root pathogen. *Appl. Env. Microbiol*, 59:3899-3905.
- Ezziyyani, M., Pérez, C., Requena, M., & Rubio, L. a. (2004). Biocontrol por *Streptomyces rochei*- Ziyani-, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. *Anales de Biología*, 26:69-78.
- Gohel, V., Singh, A., Vimal, M., & Ashwini, P. a. (2006). Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms. *Afric. J. Biotechnol*, 5:54-72.
- Oskay, M., & Tamer, A. U. (2004). Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *Afric. J. Biotechnol*, 3:441-6.



Zuberer, A. &. (1991). *Use of Chrome azurol S*. Earth and Environmental Science.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia que me brindó todo el apoyo posible para poder realizar este verano.

A la Dra. Blanca Estela Gómez Luna que me ayudó e instruyó, aceptó y recibió en su laboratorio e investigación

A mis estupendos compañeros y colegas de laboratorio

ANÁLISIS DE LA GESTIÓN COMUNITARIA EN BENEFICIO DE LA PROTECCIÓN DEL HUMEDAL CIÉNEGA DE TAMASOPO

Morán Rodríguez Oscar Alejandro¹ y Maldonado Miranda Juan José²

RESUMEN

El humedal Ciénega de Tamasopo alberga especies de flora y fauna de importancia ecológica, siendo la agricultura y la ganadería las principales actividades emprendidas en la zona, las cuales ponen en riesgo su conservación. Con la finalidad de proteger el humedal, este fue decretado sitio Ramsar en el 2008; no obstante, las actividades humanas dentro la Ciénega (realizadas principalmente por habitantes de la región) continúan afectando su integridad. La presente investigación pretende analizar en qué estado se encuentra la participación social en torno a la conservación sustentable de la Ciénega de Tamasopo, así como la perspectiva que tienen los habitantes respecto al papel que desempeña el gobierno a través de sus políticas públicas dirigidas a la protección del humedal.

ABSTRACT

The wetland Ciénega of Tamasopo is home to flora and fauna of ecological importance, agriculture and livestock are the main activities undertaken in the site, which endanger his conservation. In order to protect it the wetland was designated as a Ramsar site in 2008; however, the human activities within the Ciénega (mainly carried out by the region's inhabitants) continue to affect its integrity. The following research aims to analyze the state of social participation in the sustainable conservation of the Ciénega of Tamasopo, as well as the perspective that the inhabitants about the role of the government plays through its public policies concerning the wetland it's protection.

Palabras clave: Áreas Naturales Protegidas, Participación Social, Sustentabilidad Ambiental, Políticas Públicas.

INTRODUCCIÓN

Los trastornos generados al medio ambiente como consecuencia de la actividad humana han dado origen a la creación de diversos programas para la protección de aquellas áreas naturales cuya conservación resultan de vital interés, ya sea para promover un uso de los recursos naturales de una manera sustentable, para proteger los servicios ambientales que proveen, o por la flora y fauna que habitan en dichas regiones (especialmente si se tratan de especies endémicas y/o en peligro de extinción).

En México, la Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP), es el organismo encargado de generar, impulsar y fortalecer iniciativas para la conservación y manejo sustentable de la biodiversidad del país. Actualmente, la CONANP administra 182 áreas naturales de carácter Federal, las cuales contienen en su conjunto 90,839,521.55 hectáreas (ha); además, apoya 381 áreas destinadas voluntariamente a la conservación con una superficie de 408,639.83 ha. De las 182 Áreas Naturales Protegidas (ANP), 66 de ellas son Parques Naturales, 45 Reservas de la Biósfera, 40 Áreas de Protección de Flora y Fauna, 18 Santuarios, 8 Áreas de Protección de Recursos Naturales y 5 Monumentos Naturales (CONANP, 2017).

Dentro del Estado de San Luis Potosí, los esfuerzos dirigidos hacia la creación y conservación de ANP han dado origen a la creación de 19 zonas decretadas como tal. Dentro de estas, sólo una de ellas se encuentra registrada dentro del Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SINAP), siendo éste el caso de la Reserva de la Biósfera Sierra del Abra Tanchipa (RBSAT), la cual colinda con el estado de Tamaulipas en una pequeña porción y cuenta con una superficie total de 21,464.4425 ha (CONANP, 2016). Así mismo, la CONANP, al tener el mandato de conservar las áreas naturales protegidas de ámbito Federal, entre ellas los ecosistemas de humedales (Diario Oficial de la Federación, 2013), se encarga de gestionar el Sitio Ramsar Humedal Ciénega de Tamasopo (SRHCT), que forma parte de la micro cuenca N° 40 y cuenta con una superficie de 1,364.2 ha (Ramsar, 2008). Ambas ANP, son el objeto de estudio la presente investigación, donde se realizó un diagnóstico de la Participación Social (PS), siendo el SRHCT la médula central de la investigación, tomando a la RBSAT como objeto de comparación.

Dado que dentro de las ANP en estudio han existido asentamientos de comunidades humanas que dependen de sus recursos naturales y servicios ambientales incluso antes de que éstas fueran declaradas como tal, es importante contemplar el impacto que generan las actividades de dichas poblaciones con respecto a la conservación de estas áreas, de tal manera que resulta pertinente conocer en qué grado se encuentran involucrados y comprometidos los habitantes de la región para así determinar el nivel de la participación social dirigida hacia la conservación de dichas ANP. Con lo anterior se pretende que la información obtenida sea de ayuda para la planeación, implementación y reforzamiento de las medidas, reglamentos y/o normas dirigidas a la conservación de las ANP a través del fomento de la Participación Social de una manera consiente y sustentable.

MARCO TEÓRICO

De acuerdo con el Plan Nacional de Desarrollo 2007-2012, la sustentabilidad ambiental es abordada como “la administración eficiente y racional de los recursos naturales, de manera tal que sea posible mejorar el bienestar de la población actual sin comprometer la calidad de vida de las generaciones futuras”. Para lograr lo anterior resulta indispensable que tanto los gobiernos como la sociedad civil se involucren de manera activa y consciente a partir de

la protección, conservación y restauración del medio ambiente. Sin embargo, si se pretende alcanzar lo anterior, es necesario implementar Políticas Públicas (P.P) que contemplen la PS como un factor a considerar dentro de su diagnóstico, planeación, implementación y control de manera que las P.P., sean compatibles con el desarrollo sustentable de las ANP y los intereses de las comunidades que forman parte de ellas.

Mballa, Carranza y Maldonado (2011), consideran que las P.P. deben “establecer formas y procedimientos para actuar e intervenir en la sociedad”. Una de esas P.P, que sostienen una mayor definición jurídica para la conservación de la biodiversidad son las ANP, (CONANP, 2017), las cuales, según el artículo 47 de la Ley General de Equilibrio Ecológico y la Protección del Ambiente (1988), deben de tener en cuenta la participación de sus habitantes en conformidad, con el fin de promover el desarrollo de las comunidades y asegurar la protección de los sistemas.

Por definición, las ANP son zonas de un territorio donde el ambiente original no ha sido modificado significativamente por actividades humanas y que requieren ser preservadas o restauradas. En México son creadas a partir de un decreto presidencial y a partir de ello las actividades realizadas dentro de ellas son reguladas de acuerdo a la Ley General del Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente (LGEEPA), su Reglamento, el programa de manejo y los programas de ordenamiento ecológico, además, se encuentran sujetas a regímenes especiales de protección, conservación, restauración y desarrollo, según categorías establecidas en la Ley (CONANP, 2016). Asimismo, para llevar a cabo una declaratoria de éste tipo es necesario que los habitantes de las ANP sean previamente informados y consultados con la finalidad de que otorguen su consentimiento en relación a la declaración.

Las ANP se engloban en distintas categorías, una de ellas es la Reserva de la Biósfera, éstas son zonas reconocidas por el Programa el Hombre y la Biosfera (MaB) de la UNESCO y están compuestas por ecosistemas terrestres, marítimos y costeros donde se busca fomentar la sustentabilidad y la conservación de la biodiversidad, el desarrollo económico, la investigación y la educación (UNESCO, 2017). La RBSAT fue decretada como tal el 27 de septiembre de 1994 bajo la presidencia de Carlos Salinas de Gortari y en el artículo décimo quinto del decreto se expone que “los ejidatarios, propietarios y poseedores de predios ubicados en la Reserva de la Biosfera, están obligados a la conservación del área” (DOF, 1994).

Otra categoría para las ANP son los sitios Ramsar, nombre adoptado tras la Convención de Ramsar de 1971 que derivó en un acuerdo internacional entre países y ONG’s preocupados por la pérdida y degradación de humedales que son zonas donde el agua es el principal factor que controla el ambiente, la vegetación y la fauna, en ellos la capa freática se encuentra en o cerca de la superficie del terreno o donde el terreno está cubierto por agua y son regulados por la (CONANP) en coordinación con unidades administrativas competentes de aplicar los lineamientos adoptados por la Convención de Ramsar (CONANP, 2014). El SRHCT fue decretado sitio Ramsar N° 1814 el 2 de febrero del 2008 durante la presidencia de Felipe Calderón Hinojosa y de acuerdo con el Cuarto Plan Estratégico de Ramsar para 2016-2024 (Ramsar, 2015) se pide “fortalecer y respaldar la participación plena y efectiva y las acciones colectivas de los interesados, entre ellos los pueblos indígenas y las comunidades locales, en pro del uso sostenible, integral y racional de los humedales”.

MÉTODOS Y MATERIALES

El enfoque de la investigación es de carácter cualitativo, descriptivo, analítico, correlacional y documental. Para llevarla a cabo esta metodología se utilizó como instrumento de medición la encuesta de 16 reactivos con el fin de conocer los niveles de participación social, la cual fue aplicada en un trabajo de campo y complementada con una investigación documental. Las encuestas fueron aplicadas sobre dos muestras a partir de un muestreo no probabilístico; dado que se trata de una investigación cualitativa, el tamaño de las muestras fue ajustado por conveniencia de acuerdo con Sampieri (2010). Se realizaron un total de 25 encuestas, 15 de ellas fueron aplicadas en la comunidad de Cabezas, Municipio de Tamasopo S.L.P. (para conocer los niveles de percepción social en el SRHCT) y las 10 restantes en la comunidad de Laguna del Mante (para conocer los niveles de Participación Social en RBSAT); dichas comunidades cuentan con una población de 212 y 2,036 habitantes respectivamente (SEDESOL, 2010). Por último, los datos obtenidos fueron procesados por medio de un software de Google Form para poder facilitar su análisis, tomando como eje central de la investigación del Sitio Ramsar Humedal Ciénega de Tamasopo cuyo comportamiento fue comparado con el de la RBSAT dado que este último resulta un punto de comparación idóneo para el estudio.

RESULTADOS

El objetivo general de este trabajo fue conocer la participación social de la población que habita en la región del Sitio Ramsar Humedal Ciénega de Tamasopo (SRHCT), los 16 reactivos de la encuesta realizada fueron englobados en cinco indicadores: Conocimiento, Disposición, Involucramiento, Acción Gubernamental y Percepción de la Acción Gubernamental. Los resultados se encuentran desglosados por indicadores en la Tabla 1, donde además se muestra una comparación con los resultados de la RBSAT.

Como se puede observar en la Tabla 1, el indicador de Conocimiento tiene un comportamiento muy similar entre ambas poblaciones, donde el 66.7% de la población del SRHCT y el 63.3% en RBSAT tienen algún conocimiento sobre los beneficios que les brinda su ANP, sus comités y dónde hacer denuncias; mientras el 33.3% y el 36.7% de la población, respectivamente, no tiene ese conocimiento.

En cuanto al indicador de Involucramiento, se observa que existe una diferencia un poco mayor entre ambas poblaciones, sin embargo ambas tienen una tendencia similar. El 60% de la población del Sitio Ramsar Humedal Ciénega de Tamasopo (SRHCT), y el 76.7% en la RBSAT se encuentran involucradas en reuniones, diseño de propuestas y conservación, con un respectivo 40% y 23.3% población no involucrada.

Tabla 1. Resultados de Encuestas.

Reactivos	SRHCT	RBSAT
-----------	-------	-------

↓ Respuesta →												
	Sí			No		Sí			No			
CONOCIMIENTO												
1	53.3			46.7		40			60			
4	86.7			13.3		80			20			
14	60			40		70			30			
Media	66.7 %			33.3 %		63.3 %			36.7 %			
INVOLUCRAMIENTO												
3	13.3			86.7		70			30			
9	86.7			13.3		100			0			
16	80			20		60			40			
Media	60 %			40 %		76.7 %			23.3 %			
ACCIÓN GUBERNAMENTAL												
2	6.7			93.3		50			50			
5	20			80		50			50			
7	27.6			73.3		50			50			
10	27.6			73.3		50			50			
Media	20.5 %			79.5 %		50 %			50 %			
DISPOSICIÓN												
6	93.3			6.7		90			10			
15	86.7			13.3		40			60			
Media	90 %			10 %		65 %			35 %			
Respuesta →	Nula		Poca		Mucha		Nula		Poca		Mucha	
8	26.7		60		13.3		40		20		40	
PERSEPCIÓN DE LA ACCIÓN GUBERNAMENTAL												
Respuesta →	Sí			No			Sí			No		
13	20			80			40			60		
Respuesta →	0		1-3	4-6	7-10	0		1-3	4-6	7-10		
11	73.3		26.7	0	0	20		70	10	0		
Respuesta →	Municipal	Estatal	Federal	Todos	Ninguno	Municipal	Estatal	Federal	Todos	Ninguno		
12	13.3	13.3	20	6.7	46.7	20	20	30	20	10		

Fuente: elaboración propia

Por otra parte, la Acción Gubernamental se observa que sólo un 20.5% de la población en el SRHCT ha recibido apoyo, informes, capacitación o ha sido solicitada su opinión por alguna institución de gobierno, contra un 50% de la población de la RBSAT, es decir, más del doble con respecto al Sitio Ramsar Humedal Ciénega de Tamasopo (SRHCT).

Respecto al indicador de disposición muestra que el 90% de la población del SRHCT tiene la disposición y el interés por participar en la conservación, contra un 65% en la RBSAT; en cambio, sólo el 13.3% en el SRHCT considera que lo hace de una manera considerable, frente a un 40% en la RBSAT.

Por último, la Percepción de la Acción Gubernamental muestra que un 80% de la población del SRHCT y un 60% en la RBSAT consideran que la ley no regula de igual manera las actividades de los habitantes y las empresas privadas, además, el 73.7% de la población cree que ningún programa gubernamental ha funcionado en el SRHCT, mientras sólo un 20% lo cree así en la RBSAT. Asimismo, el 46.7% consideran que ninguno de los tres niveles de gobierno tiene participación en la conservación del Sitio Ramsar Humedal Ciénega de Tamasopo (SRHCT), en contraste con el 30% que cree que el gobierno federal es quien tiene mayor participación en la conservación de la RBSAT.

CONCLUSIONES

De manera generalizada, se puede afirmar que para conseguir una conservación sustentable de las ANP es indispensable involucrar la participación consiente de la sociedad. Para lograrlo es preciso implementar políticas públicas que tomen en cuenta los intereses y necesidades de las comunidades con el fin de fomentar la participación de los habitantes. Respecto a ello, en el Sitio Ramsar Humedal Ciénega de Tamasopo (SRHCT) se observó una débil participación social derivada de una deficiente intervención del gobierno, no obstante, existe la disposición de los habitantes por contribuir en la conservación del humedal. En consecuencia, se recomienda a las autoridades reconocer la importancia que la sociedad tiene en el cuidado de las ANP para así consumir programas que favorezcan una participación consiente y proactiva de la sociedad a partir de la consulta de los intereses, inquietudes y expectativas que ésta pueda tener sobre la preservación de las mismas.

BIBLIOGRAFÍA

- COMISIÓN NACIONAL DE ÁREAS NATURALES PROTEGIDAS (2014). Humedales en México. Consultada en http://ramsar.conanp.gob.mx/la_conanp_y_los_humedales.php (fecha de consulta: 14-06-2017).
- COMISIÓN NACIONAL DE ÁREAS NATURALES PROTEGIDAS (2016). Áreas Naturales Protegidas. Consultada en <http://www.conanp.gob.mx/regionales/> (fecha de consulta: 13-06-2017).
- COMISIÓN NACIONAL DE ÁREAS NATURALES PROTEGIDAS (2016). Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SINAP). Consultada en <http://www.gob.mx/conanp/acciones-y-programas/sistema-nacional-de-areas-protegidas-sinap> (fecha de consulta: 29-06-2017).
- COMISIÓN NACIONAL DE ÁREAS NATURALES PROTEGIDAS (2017). Áreas Naturales Protegidas Decretadas. Consultada en: <http://www.gob.mx/conanp/acciones-y-programas/areas-naturales-protegidas-decretadas> (fecha de consulta: 05-07-2017).

- COMISIÓN NACIONAL DE ÁREAS NATURALES PROTEGIDAS (2017). Áreas Naturales Protegidas Decretadas. Consultada en: http://sig.conanp.gob.mx/website/pagsig/datos_anp.htm (fecha de consulta: 28-06-2017).
- DIARIO OFICIAL DE LA FEDERACIÓN (1994). Decreto por el que se declara como área natural protegida, con el carácter de reserva de la biosfera, la región conocida como Sierra del Abra Tanchipa, ubicada en los municipios de Ciudad Valles y Tamuín, S.L.P. (Segunda publicación). Consultada en http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4745247&fecha=27/09/1994&print=true (fecha de consulta: 13-06-2017).
- DIARIO OFICIAL DE LA FEDERACIÓN (2013). Programa sectorial de medio ambiente y recursos naturales 2013-2018. [pp. 63] Consultada en http://www.dof.gob.mx/nota_detalle_popup.php?codigo=5326214 (fecha de consulta: 06-09-2017).
- MBALLA, I. V., C. CARRANZA ÁLVAREZ Y J.J. MALDONADO-MIRANDA (2011). “Perspectivas de la planificación para la conservación del área Sierra del Abra Tanchipa” en *Ide@s CONCYTEG*, Núm. 78, Vol. VI, [pp. 1450].
- RAMSAR (2008). Ciénega de Tamasopo. Consultada en <https://rsis.ramsar.org/es/rsis/1814> (fecha de consulta: 28-06-2017).
- RAMSAR (2015). El Cuarto Plan Estratégico para 2016-2024. [pp. 7] Consultada en http://www.ramsar.org/sites/default/files/documents/library/4th_strategic_plan_2016_2024_s.pdf (fecha de consulta: 29-06-2017).
- SAMPIERI, R. (2010). *Metodología de la investigación*, México: McGraw-Hill. 5ª Edición. [pp.408].
- SECRETARÍA DE DESARROLLO SOCIAL (2010). Sistema de Apoyo para la Planeación del PDZP. Consultada en <http://www.microrregiones.gob.mx/catloc/Default.aspx?tipo=clave&campo=mun&valor=24> (fecha de consulta: 03-07-2017).
- UNESCO (2017). Reservas de la Biósfera. Consultada en <http://www.unesco.org/new/es/natural-sciences/environment/ecological-sciences/biosphere-reserves/> (fecha de consulta: 29-06-2017).
- (2007). Pan Nacional de Desarrollo 2007-2012. [pp.234] Consultada en http://pnd.calderon.presidencia.gob.mx/pdf/PND_2007-2012.pdf (fecha de consulta: 05-07-2017).
- (1998). Ley General de Equilibrio Ecológico y Protección al Medio Ambiente. Consultada en <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/compil280188.html> (fecha de consulta: 05-07-2017).

CARACTERIZACIÓN DE BIOPELÍCULAS PARA LA REGENERACIÓN CELULAR

Hivon Guerrero Trejo¹, Ma. Elena Calixto Olalde² y José Francisco Louvier Hernandez³

RESUMEN

Se prepararon películas poliméricas para su potencial aplicación a la regeneración celular a base de QT y PVA usando glicerina como plastificante e incorporando aloe vera al 1% y aceite de caléndula al 0.5 y 1 % para potencializar su capacidad de regeneración celular. También se realizó el entrecruzamiento del PVA con bórax para modificar sus propiedades mecánicas y favorecer una mayor elasticidad. Las películas con sábila presentaron mejor transparencia y elasticidad. El aceite de caléndula proporcionó mayor flexibilidad y suavidad al tacto. Las pruebas mecánicas mostraron que la adición de los extractos aumenta la rigidez en las películas, y el entrecruzamiento del PVA con bórax da características de elastómeros.

ABSTRACT

Polymeric films for cell regeneration based on QT and PVA were made using glycerin as a plasticizer due to they have an antimicrobial effect, are non-toxic, biodegradable and favor cell growth. The base formulation B aloe vera 1% and marigold oil at 0.5 and 1% were added, A cross-linking of PVA was performed with borax in aqueous solution, obtaining films with better transparency and smoothness in the case of B-S, opacity and oily surface In B-AC films and greater flexibility and softness to the touch in B-E. The mechanical tests showed that the addition of the extracts increases the stiffness in the B-S and B-AC films whereas B-E presents a remarkable reduction of stiffness and characteristics of elastomers.

Palabras Clave: biopelículas, PVA, caléndula, sábila, entrecruzamiento.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad se han realizado numerosas investigaciones para el desarrollo de películas poliméricas principalmente para usos médicos, debido a la necesidad de acelerar el proceso de regeneración del tejido dañado debido a quemaduras o úlceras. El objetivo principal de la creación de este tipo de películas es proporcionar a la zona afectada un material compuesto que simule las funciones de la piel proporcionando así un ambiente adecuado para la cicatrización que evite la pérdida de humedad, reduzca el contacto con bacterias presentes en el medio ambiente y estimule la regeneración celular.

El quitosano es un polímero que se obtiene por desacetilación de la quitina que se caracteriza por su grado de acetilación y por su peso molecular (el cual varía dependiendo de la fuente) los cuales influyen en su viscosidad y solubilidad. El quitosano puede plastificarse con glicerol para obtener una clase de termoplástico [1]. Este polímero presenta propiedades únicas, como la biodegradabilidad, no toxicidad, efecto antibacteriano y biocompatibilidad que permite proteger una herida al usarlo como apósito manteniendo un nivel de humedad adecuado [2]. El alcohol polivinílico es un polímero sintético, obtenido por hidrólisis ácida o básica del acetato de polivinilo, muy utilizado en la preparación de películas por sus propiedades elásticas, mecánicas y permeabilidad. Debido a estas características el QT y el PVA se utilizan en la creación de apósitos para la regeneración celular.

El objetivo de este proyecto es evaluar las propiedades de películas de QT, PVA y glicerina al adicionar aloe vera al 1% y aceite de caléndula al 0.5% y 1%, además de realizar un entrecruzamiento del PVA con bórax al 1%. Al adicionar aloe vera y aceite de caléndula se pretende aumentar el potencial de regeneración celular de la película.

El aloe vera es muy utilizado en lesiones de la piel, fundamentalmente por su poder emoliente suavizante que ejerce. Se ha confirmado que estos cristales o pulpas contienen vitaminas A, B1, B2, B6, C, E y ácido fólico. Además contienen minerales, aminoácidos esenciales y polisacáridos que estimulan el crecimiento de los tejidos y la regeneración celular [3]. En cuanto a la caléndula contiene compuestos activos como triterpenos (antiinflamatorios) y flavonoides, aceites esenciales, saponinas, mucilagos y sustancias amargas como la calendina. Estos componentes son algunos de los principios activos que le confieren a la *C. officinalis* sus propiedades antiinflamatoria, antiséptica. Cicatrizante, desintoxicante y fungicida [4].

El entrecruzamiento del polímero PVA se lleva a cabo por medio de enlaces no covalentes con el ion borato, creando así redes tridimensionales de gel. Para lograr el entrecruzamiento con bórax es necesario hidrolizarlo en solución acuosa y de esta manera formar un sistema buffer ácido bórico- borato. Como el ion borato es tetrafuncional en su interacción con los polioles brinda un mejor grado de entrecruzamiento que el ácido bórico por sí solo.

MÉTODOS Y MATERIALES

Reactivos

Los materiales utilizados fueron quitosano (QT) (utilizado en forma de polvo blanco de bajo peso molecular y con un grado de desacetilación de 90%), alcohol polivinílico (PVA) (con un grado de hidrólisis de 99%), ácido acético glacial (99%), todos de la marca Sigma-Aldrich, borato de sodio (bórax) marca Golden Bell, la glicerina (GL) de grado comercial, aceite de caléndula de grado comercial adquirido en un centro botánico y la pulpa de sábila (aloe vera).

Preparación de películas

La preparación de las películas fue realizada con base a la formulación establecida de quitosano 1%, PVA 1% y glicerina 5%. A esta formulación base se le incorporó por separado aceite de caléndula al 0.5 y 1% y sábila 1%. Otra de las modificaciones realizadas fue el entrecruzamiento del PVA con bórax.

El procedimiento para la preparación de las películas consistió de la disolución de PVA al 1% a 80°C y 300 rpm, una vez disuelto por completo se dejó enfriar a temperatura ambiente y posterior a esto se adicionó ácido acético al 1% agitando a 300 rpm con un agitador mecánico, después de dos minutos se le adicionó CHT al 1% en pequeñas cantidades hasta disolver por completo. Una vez disuelto el CHT se adicionó como plastificante glicerina al 5% continuando la agitación por 40 minutos. Para el caso de las películas con aceite de caléndula este se adicionó después de la adición de ácido acético con la finalidad de favorecer la incorporación del aceite dentro del medio, la adición de los reactivos siguió la misma secuencia antes mencionada. Para la película en la cual se incorporó la sábila, ésta se adicionó a la mezcla en 1% al momento de agregar la glicerina y continuando con la agitación mecánica por 40 minutos. Para el entrecruzamiento del PVA con bórax, se preparó una un volumen igual al volumen de la mezcla a un porcentaje igual al de la solución de PVA y se agregó a la mezcla base una cuarta parte del volumen de la solución de bórax.

En todos los casos, la mezcla fue vaciada en placas de acrílico y se dejaron secar en incubadora por 24 horas a 28°C y después de sacar de la incubadora se dejaron 24 horas más a temperatura ambiente.

B= QT 1%, PVA 1% y glicerina 5%.

B-E= QT 1%, PVA 1%, glicerina 5% y entrecruzamiento del PVA con bórax.

B-S= composición base (B) más pulpa de sábila al 1%.

B-AC/0.5= composición base más aceite de caléndula al 0.5%.

B-AC/1= composición base más aceite de caléndula al 1%.

Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros infrarrojo se obtuvieron con un espectrómetro de infrarrojo con transformada de Fourier marca PerkinElmer 77016 FT-IR.

Análisis Termogravimétrico (TGA)

El análisis se realizó en un equipo TA Instruments Modelo 20 en un intervalo de 25-600 °C, a 10 °C/min y con un flujo de N₂ mL/min.

Propiedades mecánicas

Las pruebas mecánicas se llevaron a cabo en una maquina universal de ensayos mecánicos Shimadzu AGS-X de acuerdo a la norma ISO 527-3:1995.

RESULTADOS

Se obtuvieron las películas de manera exitosa, mostrando una buena transparencia y una menor segregación de la glicerina y del aceite de caléndula, esto se logró realizando pruebas con el orden de adición de los reactivos y el tiempo de mezclado hasta obtener películas más homogéneas y con un menor grado de segregación de la glicerina y el aceite de caléndula. Para el tiempo de secado de las películas, la humedad es un factor importante que interfiere en este periodo, por lo que se recomienda mayor tiempo en una atmosfera controlada como lo son las incubadoras.



Figura 1. Películas, de izquierda a derecha, B, B-S, B-AC/0.5, B-AC/1 y B-E.

Análisis FTIR

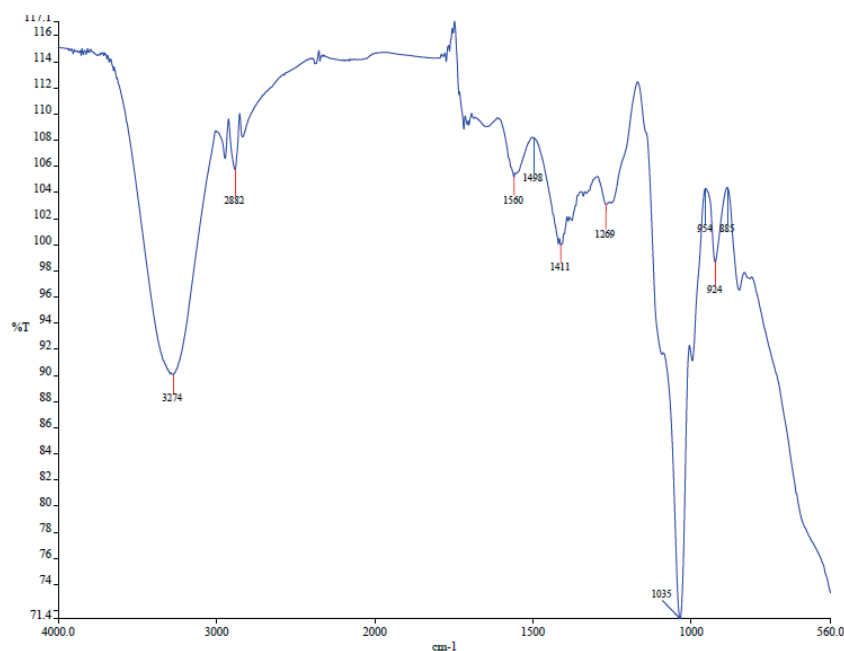


Figura 2. Espectro FTIR de B.

La figura 2 muestra el FTIR de la película B, se observa entre 1000 y 1050 cm^{-1} una banda característica de tensión C-O, entre 3000 y 3300 cm^{-1} se encuentra una banda de tensión O-H, es una banda ancha debido a que estos grupos OH de la glicerina pueden formar puentes de hidrogeno entre sus moléculas o con moléculas vecinas de QT y PVA, lo que da lugar a la observación de la banda característica del quitosano aproximadamente entre 1500 y 1600 cm^{-1} [2] [5]. En el FTIR de la película B-S lo que se esperaría ver es la señal de los enlaces glucosídicos pertenecientes a los polisacáridos presentes en el mucilago de la sábila, sin embargo no es apreciable, esto puede ser debido a que el aloe vera contiene en su mayoría agua, cerca de un 98.5% y el resto de mucilaginos compuestos en su mayoría por polisacáridos [6]. Para las películas B-AC se pueden apreciar claramente bandas entre 560 y 700 cm^{-1} , estas pueden atribuirse a la interacción del aceite de caléndula. El FTIR de B-E presenta la banda de tensión O-H entre 3000 y 4000 cm^{-1} es ancha por la formación de enlaces de hidrogeno característicos de las interacciones entre el ion borato y los radicales OH del PVA, entre 1400 y 1500 cm^{-1} se muestra la señal característica de grupos $-\text{CH}_2$ [7].

Análisis TGA

Tabla 1. Resultados del análisis TGA

<i>Película</i>	<i>Porcentaje de humedad (%)</i>	<i>Temperatura de máxima velocidad de pérdida de peso (°C)</i>	<i>Porcentaje de peso residual a 300 °C (%)</i>
B	20	205	15
B-S	20	208	18
B-AC/0.5	25	211	10
B-AC/1	20	213	18
B-E	22	200	18

Los resultados del análisis TGA nos muestran un porcentaje de humedad similar entre las muestras, esto se refleja en la pérdida de peso a 100 °C, además la temperatura de máxima velocidad de pérdida de peso también es muy similar entre las muestras encontrándose entre los 200 y 220 °C, a temperaturas similares (200 a 300 °C) se lleva a cabo la despolimerización del quitosano. La degradación térmica del PVA se lleva a cabo por debajo de los 300 °C, entre los 200 y 300 °C se desprenden los grupos hidroxilo formando agua, ácido acético y acetaldehído, a temperaturas superiores a los 300 °C se lleva a cabo la degradación de la cadena principal. La similitud entre las temperaturas de máxima velocidad de pérdida de peso entre las películas se debe a que su composición principal es PVA y QT y la degradación de estos compuestos inicia entre 200 y 300 °C [5] [8]. En las películas B-S y B-AC se observa un comportamiento parecido dándose la máxima pérdida de peso entre 208 y 213 °C, para el caso de B-S la descomposición del mucilago que es el mayor componente en la pulpa de sábila se da alrededor de los 270 °C [9] y para B-AC. En B-E la temperatura de fusión del PVA baja por efecto del entrecruzamiento, además la degradación del polímero o la deshidratación del bórax sin reaccionar se llevan a cabo cerca de los 230 °C [10].

Pruebas mecánicas

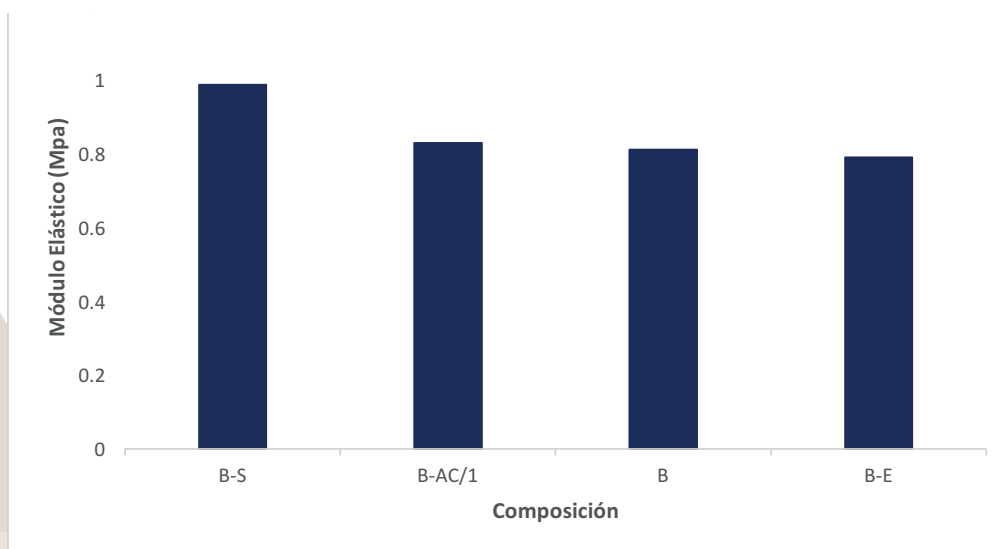


Figura 3. Grafica de módulo de elasticidad.

En la gráfica 3 se puede observar que se necesita una mayor fuerza para lograr la deformación en B-S, lo que nos indica que la pulpa de sábila le aporta mayor rigidez a la película. Comparando B con B-AC/1 se observa que al incorporar aceite de caléndula también aumenta muy poco la rigidez, en cambio para la película B-E se observa una disminución de la fuerza necesaria para lograr la deformación, lo que nos indica una película más flexible. Una de las características importantes que se presentó al llegar al momento de rotura la película B-E fue que emitió un sonido parecido al de una liga plástica al romperse y regreso rápidamente a su forma original, dio origen a una curva stress-strain característica de elastómeros.

CONCLUSIONES

Las películas a base de PVA y QT plastificadas con GL (B) mostraron una buena flexibilidad y transparencia, al agregar los extractos (aloe vera y aceite de caléndula) se observó un cambio en estas propiedades. La película B-S mostró mejor transparencia y suavidad al tacto mientras que en B-AC se observó opacidad y textura un poco aceitosa, en el caso de la película B-E presentó un color entre blanco y gris y una gran flexibilidad. Las pruebas mecánicas mostraron que se necesita una mayor fuerza para lograr la deformación de las películas B-S y B-AC indicando una mayor rigidez atribuida al aloe vera y al aceite de caléndula. La película B-E mostró un menor módulo de elasticidad y características propias de elastómeros resultado de la interacción entre el PVA y el bórax dando como resultado una película muy flexible que al momento de la rotura recupera rápidamente su forma original.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Boucard, N. (2007). "The use of Physical Hidrogels of chitosan for skin regeneration following third-degree burns" en *Biomaterials*, No. 28, pp 3478-3488. Consultada en <http://www.ncbi.nih.gov> (fecha de consulta 30-07-2017).
- [2] FERNÁNDEZ, L. (2013). "Desarrollo de apósitos de quitosano para su posible aplicación en la regeneración de tejido epitelial primera parte: caracterización mecánica" en *Revista Colombiana de Materiales*, No. 5, pp 56-63. Consultada en <https://aprendeenlinea.udea.educo.com> (fecha de consulta 01-08-2017).
- [3] Rodríguez, I. "Beneficios del Aloe vera I. (sábila) en las afecciones de la piel" en *Revista Cubana de enfermería*, No.3. Consultada en <http://www.scielo.sld.cu> (fecha de consulta 01-08-2017).
- [4] Madrid, M. (2010). "Efecto de la *Caléndula officinalis* en la proliferación del fibroblasto gingival humano" en *Univ. Odontol.* Consultada en <http://www.dialnet.unirioja.es> (fecha de consulta 01-08-2017).
- [5] Benavides, L. (2010). "Estudio cinético de la degradación térmica de quitina y quitosano de camarón de la especie *Heterocarpus Vicarius* empleando la técnica termogravimétrica en modo dinámico" en *Revista Iberoamericana de Polímeros*. Consultada en <http://scielo.org.com> (fecha de consulta 02-08-2017).
- [6] Ferraro, G. (2009). "Revisión de aloe vera (*Barbadensis Miller*) en la dermatología actual" en *Revista Argentina de dermatología*, No. 4. Consultada en <http://www.scielo.org.ar> (Fecha de consulta 01-08-17).
- [7] Ochiai, H. (1976). "Mechanical and Thermal properties of poly (vinil alcohol) crosslinked by bórax" en *Polymer Journal*, No. 1, pp 131-133. Consultada en <http://www.naturejournalpdf> (fecha de consulta 05-08-17).
- [8] Barrera, J. (2007). "Estudio de la degradación térmica de poli(vinil alcohol) mediante termogravimetría diferencial" en *Ingeniería e Investigación*, No. 2. Consultada en <http://www.scielo.org.com> (fecha de consulta 05-08-2017).
- [9] Muñoz, L. (2012). "Mucilage from chia seeds (*Salvia hispánica*): microestructure, physico.chemical characterization and applications in food industry". Consultada en <http://repositorio.uc.cl> (fecha de consulta 05-08-17).
- [10] Das, K. (2010). "Preparation and Characterization of cross-linked starch/poly (vinil alcohol) Green films with low moisture absorption". Consultada en <http://www.pubs.acs.org> (fecha de consulta 05-08-17).

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE CEPAS CON CAPACIDAD DE BIODEGRADACIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES "COV'S"

Becerra Cervera Jesus¹ y Conde Bajaras Eloy²

RESUMEN

En la actualidad existen diversos procesos industriales que generan gases contaminantes, que al ser de difícil degradación se acumulan en el ambiente, o reaccionan con otras sustancias generando compuestos peligrosos que dañan a este, y provocan a su vez serios daños a la salud de la población que habita en la cercanía. Un problema principal de la generación de gases contaminantes es la emisión de los llamados Compuestos Orgánicos Volátiles (COV's), que son contaminantes tóxicos ambientales prioritarios, debido a su potencial carcinogénico y toxicidad incluso a bajas concentraciones. En México y Guanajuato existen giros artesanales e industriales que utilizan mezclas de COV's o componentes individuales que son difíciles de degradar, es por esto que existen diversas tecnologías para dar tratamiento a las emisiones de estos, una alternativa viable es la biofiltración, esta implica la utilización de microorganismos aplicados en sistemas controlados, donde son utilizadas fases bióticas previamente adaptadas a degradar un contaminante en específico, el cual es utilizado como única fuente de carbono y energía. El presente trabajo abordó la caracterización de consorcios microbianos CRI, CRII y CRIII previamente identificados con capacidad de degradar COV's en específico Benceno, Tolueno, Etilbenceno, Xilenos "BTEX". La caracterización bioquímica se desarrolló utilizando técnicas de microbiología convencional y bioquímicas. La caracterización bioquímica servirá para un desarrollo tecnológico utilizando reactores biológicos denominados "biofiltros" para el tratamiento de COV's en la región centro.

Palabras clave: actividad enzimática, BTEX, consorcios microbianos.

INTRODUCCIÓN

Un método de tratamiento biológico de contaminantes gaseosos como BTEX y con sus características principales es la biofiltración el cual es un proceso para el tratamiento de contaminantes gaseosos orgánicos e inorgánicos. En este proceso el aire contaminado pasa a través del material filtrante (lecho) donde se encuentran adheridos los microorganismos en una biopelícula, el flujo gaseoso es transferido al medio líquido en donde los microorganismos utilizan al contaminante como su fuente de carbón y energía, dando como resultado dióxido de Carbono, agua, sales inorgánicas, biomasa y residuos poliméricos nuevos. Los microorganismos utilizados para la degradación dependen de las características de los contaminantes. La degradación del contaminante se da en la biopelícula formada, después de que se transfiere al medio líquido, ya que los microorganismos no pueden tomarlo directamente de la fase gaseosa (Hernández-Vega P., 2012). En referencia a los microorganismos utilizados en sistemas de biofiltración, estos pueden ser propios del material orgánico filtrante, por ejemplo microorganismos presentes en suelo o compostas (Cox y col, 1993 citado por Conde Barajas, 1999), aunque también se desarrollan consorcios especializados en la degradación de ciertos contaminantes para obtener mayores eficiencias de eliminación del contaminante al tener desde un inicio organismos adaptados y capaces de utilizarlo como fuente de carbono y energía (Hernández-Vega P., 2012, 2002). Los microorganismos elegidos para el tratamiento de COV's deben ser capaces de oxidar los contaminantes en condiciones de no esterilidad, ya que los gases contaminados normalmente no tienen un tratamiento previo como esterilidad, principalmente por cuestiones económicas (Hernández-Vega P., 2012). Para los tratamientos de aire contaminado, sin embargo, la mayoría de los microorganismos presentes en los biofiltros son bacterias y hongos, encontrándose bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Bacillus corynebacterium*, *Sphingomonas*, *Xanthomonas*, *Nocardia*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Chrythobacter*, *Clostridium* y *Enterobacter*. En cuanto al reino fungi se pueden encontrar *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *fusarium*, *Bjerkandera adusta* entre otros (Bedolla R. H.I., 2015). Muchos microorganismos pueden utilizar compuestos aromáticos como única fuente de carbono, la degradación de este tipo de compuestos es muy importante debido a su naturaleza tóxica, los microorganismos capaces de degradarlos previenen la acumulación en el ambiente, impidiendo una seria contaminación de los suelos y agua subterránea, logrando evitar un gran daño ecológico (Bedolla R. H.I., 2015). De lo anterior se hace importante entonces la caracterización microbiológica y bioquímica-enzimática de microorganismos que conforman consorcios microbianos con capacidad de biodegradación e BTEX. Bajo este contexto, el objetivo de este trabajo fue caracterizar por técnicas microbiológicas convencionales y pruebas bioquímicas cepas microbianas pertenecientes a consorcios microbianos previamente adaptados y seleccionados por su capacidad de biodegradar BTEX en fase gas (validados de estudios previos), con la finalidad de integrar un desarrollo tecnológico de degradación de COV's en la región bajo denominados biofiltros.

MÉTODOS Y MATERIALES

Obtención de cepas microbianas. Las cepas microbianas se aislaron de muestras de suelos, el muestreo se realizó al azar, tomándose las muestras a una profundidad de 20 cm, de acuerdo a la norma NOM-021-RECNAT-2000 de SEMARNAT. Se tomaron muestras de suelo de tres zonas del TNM-Instituto Tecnológico Nacional de México – Instituto Tecnológico de Celaya Guanajuato., y muestras de suelo en tres zonas agrícolas del poblado de Acolman en el Estado de México. Las muestras fueron llevadas al laboratorio para ser procesadas

y acondicionadas para obtener los consorcios microbianos. El consorcio 1 (CIR) se obtuvo de las primeras muestras, el consorcio 2 (CIIR) se obtuvo de las muestras de suelo agrícola y el consorcio 3 (CIIR) se elaboró con la mezcla de los dos consorcios anteriores. **Adaptación de cepas microbianas.** Se realizaron una serie de pre-incubaciones aerobias de las muestras de suelo, utilizando frascos de vidrio de un litro, en primera instancia con thinner en una concentración del 2% v/v por espacio de 6 a 8 meses (Hernández-Vega P., 2012), se continuó el proceso de adaptación utilizando una mezcla de tolueno, etilbenceno y xilenos a una concentración del 2% v/v, posteriormente con una mezcla BTEX al 2% v/v y finalmente se disminuyó la concentración de la solución BTEX al 1% v/v. De las muestras de suelo se tomaron 10 g, colocándose nuevamente en frascos de vidrio de un litro, en donde se les ajustó la humedad al 60%, se saturó la atmósfera con BTEX por espacio de 1 mes, posteriormente se hicieron sub-muestreos los cuales se mantuvieron bajo condiciones antes mencionadas. **Preparación de los consorcios.** Este proceso se realizó mediante la técnica de centrifugación fraccionada extrayendo las células de las muestras de suelo saturado con solución BTEX. De las células obtenidas se elaboraron los consorcios, los cuales se mantuvieron en sistemas microcosmos con medio mineral (80 mL) y solución BTEX a una concentración del 1% v/v, con un pH de 7.0, a una temperatura de 30°C, realizando aireaciones semanales para asegurar la no limitación de oxígeno de manera axénica, con un cambio del medio mineral cada 2 semanas. El medio mineral se usó como suplemento de minerales en las etapas de adaptación, selección, preparación de consorcios y en los ajustes de humedad en los sistemas microcosmos durante las dinámicas de degradación de los compuestos BTEX. **Aislamiento, mantenimiento y conservación de las cepas.** De los sistemas microcosmos se tomaron muestras de 1 mL para siembras en cajas Petri con medio agar infusión de cerebro y corazón (BHI), las cajas Petri se mantuvieron en desecadores con una atmósfera saturada de BTEX, utilizando un algodón impregnado de dicha solución, a temperatura ambiente por un mes, en el cual se siguió añadiendo solución BTEX al algodón bajo condiciones estériles. Posterior al procedimiento antes mencionado, las cepas con un mayor crecimiento en el medio agar infusión de cerebro y corazón (BHI), fueron separadas por técnicas convencionales mediante resiembra continua hasta obtener cultivos axénicos. Las cepas axénicas se han mantenido realizando resiembra en medio agar infusión de cerebro y corazón (BHI), y agar Nutritivo. Las cajas Petri se colocaron bajo refrigeración y se han realizado resiembra cada mes y medio, también se llevó a cabo la conservación en sistemas microcosmos con medio mineral (80 mL) adicionado con solución BTEX 1% (v/v) y realizándose la crio-conservación de las cepas en glicerol con solución BTEX (2 µL), estas muestras se mantienen en refrigeración a una temperatura de -20°C. **Caracterización de cepas.** En este procedimiento se observó características morfológicas (microscópicas y macroscópicas), utilizando pruebas bioquímicas de asimilación de sustratos, así como pruebas con medios selectivos y diferenciales (TSI, MacConkey, SIM, EMB) y la técnica de tinción de Gram (Bedolla R. H.I., 2015). Para las pruebas enzimáticas-bioquímicas se utilizó un kit denominado APIZYM® la cual contempla un test de actividad de 19 enzimas relacionadas con diferentes metabolismos de diferentes sustratos orgánicos e inorgánicos. Las determinaciones de las 19 enzimas destacan la familia de las fosfatasa, esterasas, amino peptidasas, proteasas y glicosil hidrolasas. Para su medición por el kit APYZIM® se realizó mediante la obtención de un extracto enzimático con la metodología de Boluda et al. (2014) y por el proveedor bioMérieux. Para la lectura de los valores obtenidos fue mediante la carta de colores establecida por el proveedor bioMérieux.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Morfología colonial. Se reactivaron las cepas axénicas de los diferentes consorcios mediante una serie de resiembra con estría cruzada en medio sólido, agar nutritivo (AN) a temperatura ambiente o a 37 °C por espacio de 24, 48 y 72 horas. Se realizó una reactivación previa a la caracterización morfológica a nivel macroscópico, ya que algunas de las cepas se habían contaminado de sus cultivos originales. Para la verificación de su condición axénica se tomaron muestras en fresco-húmedo de cada cultivo y se observó en un microscopio óptico marca LEYCA en los campos de luz visible 40X y 100X su pureza o condición axénica. De los cultivos axénicos comprobados por microscopía óptica se observaron las características morfológicas o coloniales que a continuación se muestran en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Características Morfológicas de las cepas en estudio.

Cepas-Nombre ID	Forma	Elevación	Margen	Color
CIR-C2	circular	convexa	entero	Crema
CIIR-C1	circular	convexa	Entero	Crema
CIIR-C2	irregular	plana	entero	Amarilla
CIIR-C3	puntiforme	convexa	entero	Crema
CIIR-C4	circular	elevada	entero	Crema
CIIR-C5CH	irregular	convexa	entero	Amarilla
CIIR-C5M	irregular	Plana	entero	Crema
CIIR-C5N	puntiforme	convexa	entero	Amarilla

Morfología celular. Del paso anterior se verificaron los cultivos en medio sólido su morfología celular en un microscopio óptico marca LEYCA en los campos de luz visible 40X y 100X su pureza o condición axénica, así. Se tomó de 200 a 250 microlitros de solución salina al 0.85% p/p estéril, para realizar la suspensión celular en húmedo o fresco. Se toma una asada de cada cultivo axénico de cada uno de los consorcios microbianos en estudio y se realizó la suspensión en portaobjetos de vidrio estériles. Las suspensiones, así como las asadas se realizaron en condiciones estériles en una campana de siembra de flujo laminar. También se verificó su tinción de Gram mediante un kit marca HyCel siguiendo las instrucciones del proveedor. Ver **Tabla 2**.

Tabla 2. Morfología celular y Tinción de Gram.

Cepas-Nombre ID	GRAM	Morfología celular
CIR-C2	+	Bacilos
CIIR-C1	+	Bacilos
CIIR-C2	+	Bacilos
CIIR-C3	-	Cocos
CIIR-C4	+	Bacilos

CIIR-C5CH	-	Cocos
CIIR-C5M	+	Bacilos
CIIR-C5N	-	Cocos

Crecimiento en medios selectivos y diferenciales (pruebas bioquímicas): TSI (triple hierro azúcar). Medio universalmente empleado para la diferenciación de enterobacterias, en base a la fermentación de glucosa, lactosa, sacarosa y a la producción de ácido sulfhídrico. Ver **Tabla 3**.

Tabla 3. Prueba de TSI

Cepas-Nombre ID	PICO/FONDO *	Producción de Gas	Producción de ácido Sulfhídrico
CIR-C2	A/A	-	-
CIIR-C1	K/K	-	-
CIIR-C3	A/A	-	+
CIIR-C4	K/A	-	-
CIIR-C5 CH	A/A	-	-
CIIR-C5 M	A/A	-	-
CIIR-C5 N	K/K	-	-

* *Nota:* 1-Pico alcalino/fondo ácido (pico rojo/fondo amarillo): el microorganismo solamente fermenta la glucosa. 2-Pico ácido/fondo ácido (pico amarillo/fondo amarillo): el microorganismo fermenta glucosa, lactosa y/o sacarosa. 3-Pico alcalino/fondo alcalino (pico rojo/fondo rojo): el microorganismo es no fermentador de azúcares. 4-La presencia de burbujas, o ruptura del medio de cultivo, indica que el microorganismo produce gas. 5-El ennegrecimiento del medio indica que el microorganismo produce ácido sulfhídrico.

Medio SIM. Es un medio semisólido destinado a verificar la movilidad, producción de indol y de sulfuro de hidrógeno en un mismo tubo. Es útil para diferenciar miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. Ver **Tabla 4**.

Tabla 4. SIM

Cepas-Nombre ID	Movilidad	Producción de ácido Sulfhídrico
CIR-C2	+	-
CIIR-C1	+	-
CIIR-C3	+	-
CIIR-C4	+	-
CIIR-C5 CH	+	-
CIIR-C5 M	+	-
CIIR-C5 N	+	-

Nota: **Cepas móviles:** producen turbidez del medio, que se extiende más allá de la línea de siembra. **Cepas inmóviles:** el crecimiento se observa solamente en la línea de siembra. **Cepas SH₂ positivas:** ennegrecimiento a lo largo de la línea de siembra o en todo el medio. **Cepas SH₂ negativas:** el medio permanece sin cambio de color. **Cepas indol positivas:** desarrollo de color rojo luego de agregar el reactivo de Kovac's o de Erlich. **Cepas indol negativas:** sin cambio de color.

Medio EMB. Este medio (también denominado E.A.M.) es utilizado para el aislamiento selectivo de bacilos Gram negativos de rápido desarrollo y escasas exigencias nutricionales. Permite el desarrollo de todas las especies de la familia *Enterobacteriaceae*. Ver **Tabla 5**.

Tabla 5. Medio EMB

Cepas-Nombre ID	EMB
CIR-C2	-
CIIR-C1	-
CIIR-C3	-
CIIR-C4	-
CIIR-C5 CH	-
CIIR-C5 M	-
CIIR-C5 N	-

Medio MaC Conkey.

Este medio se utiliza para el aislamiento de bacilos Gram negativos de fácil desarrollo, aerobios y anaerobios facultativos. Permite diferenciar bacterias que utilizan o no, lactosa en muestras clínicas, de agua y alimentos. Todas las especies de la familia *Enterobacteriaceae* desarrollan en el mismo. Ver **Tabla 6**.

Tabla 6. Medio MaC Conkey

Cepas-Nombre ID	MAC CONKEY
CIR-C2	Blancusca y rosada
CIIR-C1	-
CIIR-C3	-
CIIR-C4	-
CIIR-C5 CH	-
CIIR-C5 M	-
CIIR-C5 N	-

Pruebas Enzimáticas APIZYM.

Finalmente, la tabla 7. se muestran los resultados del APIZYM de cada una de las cepas axénicas aisladas de los consorcios microbianos con capacidad de degradar BTEX. Ver **Tabla 7**.

Tabla 7. APIZYM Test.

Enzimas CLAVE	MICROORGANISMOS								
	CIR-C1	CIR-C2	CIIR-C1	CIIR-C2	CIIR-C3	CIIR-C4	CIIR-C5CH	CIIR-C5M	CIIR-C5N
Control	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FAL	-	-	-	-	-	-	-	-	+
EST	+	+	-	+	-	+	-	+	-
EST-LIP	+	+	+	+	+	-	+	+	-
LIP	-	-	-	-	+	-	-	-	-
LEU-AA	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VAL-AA	+	-	+	-	-	+	-	+	+
CIS-AA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TRIP	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α -QUI	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FAC	-	+	-	-	-	-	-	+	+
n-AS-BI-p	-	-	-	-	-	-	-	-	+
α -GAL	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β -GAL	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β -GRD	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α -GSD	-	-	+	-	+	-	+	-	+
β -GSD	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N-a- β -GSMD	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α -MAN	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α -FUC	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Nota: Actividad enzimática determinada mediante kit APIZYM. FAL: Fosfatasa alcalina; FAC: Fosfatasa ácida; n-AS-BI-p: naphthol-AS-BI-phosphohydrolasa; FHD: Fosfohidrolasa; EST: Esterasa; EST-LIP: Esterasa-lipasa; LIP: Lipasa; LEU-AA: Leucina arilamidasa; VAL-AA: Valina arilamidasa; CIS-AA: Cisteína arilamidasa; TRIP: Tripsina; α -QUI: α -Quimiotripsina; α -GAL: α -Galactosa; β -GAL: β -Galactosidasa; β -GRD: β -Glucoronidasa; α -GSD: α -Glucosidasa; β -GSD: β -Glucosidasa; N-a- β -GSMD: N-Acetil- β -D-Glucosaminidasa; α -MAN: α -Manosa; α -FUC: α -Fucosidasa).

CONCLUSIONES

Las cepas obtenidas son diferentes en base a sus características morfológicas coloniales, pero con una similitud en su morfología celular. Las cepas CIIR-C3, CIIR-C5CH y CIIR-C5N se identificaron como cocos gram negativos y CIR-C2, CIIR-C1, CIIR-C2, CIIR-C4 y CIIR-C5M como bacilos gram positivos. Para la identificación de enterobacterias nos enfocamos en la fermentación de lactosa, glucosa, sacarosa y la producción de ácido sulfhídrico, por lo que estas dieron positivo. Para la identificación de *Enterobacteriaceae* se utilizó el medio SIM para encontrar movilidad por lo cual dio positivo en cada una. Para un aislamiento selectivo se utilizó el medio EMB se observó que todas las cepas dieron negativo. En el medio Mac Conkey solo se obtuvieron resultados en la cepa del consorcio 1 (CIR). En todas las cepas se observó actividad de la enzima Leucina arilamidasa. Las cepas de los consorcios en donde no se observó crecimiento se pasarán a cultivar en otros medios para su crecimiento.

BIBLIOGRAFIA

- Bedolla R. H.I. (2015). Estudio de la Cinética de Biodegradación de COV's en Mezcla o Individualmente. Tesis de Maestría. Departamento de Ing. Bioquímica TNM-Instituto tecnológico de Celaya, Gto., México.
- Boluda, R., Roca- Pérez, L., Iranzo, M., Gil, C., & Mormeneo, S. (2014). Determination of enzymatic activities using a miniaturized system as a rapid method to assess soil quality. European journal of soil science, 65(2), 286-294.
- Conde E. (1999). Evolución de un consorcio microbiano durante la degradación la eliminación de compuestos orgánicos volátiles (COVs) por biofiltración. Tesis de Maestría. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV-IPN. D.F., México.
- Hernández-Vega P. (2012). Biodegradación de una Mezcla Compleja de COV's (Thinner) en Sistemas Microcosmos, Tesis de Licenciatura. Departamento de Ingeniería Ambiental, Instituto Tecnológico de Celaya. Guanajuato, México.

LA ATMÓSFERA DE JÚPITER

J. A. Carreño¹ y M. A. Trinidad²

RESUMEN

En el documento presente se muestran algunos datos sobre la atmósfera de Júpiter, después de haber revisado algunos aspectos de las atmósferas de los planetas que conforman el sistema solar (exceptuando a la Tierra, debido a que el conocimiento de esta está ampliamente extendido y no será parte de este trabajo). Se toma como punto central de trabajo la atmósfera del planeta Júpiter a razón de ser el más estudiado, después de nuestro vecino marciano. El propósito principal de este estudio es reunir información sobre las moléculas presentes en las distintas capas atmosféricas de dicho cuerpo celeste, así como otras propiedades como la temperatura, presión, rotación, traslación, entre otras. Es importante señalar que el alcance de esta investigación no comprende a detalle todas esas propiedades mencionadas sino más bien el inicio para la creación de una base de datos.

ABSTRACT

In the present document some information about the atmosphere of Jupiter is shown, after having reviewed some aspects of the atmospheres of the planets that make up the Solar System (excepting to the Earth, since the knowledge of this one is widely extended and will not be part of this paper). The atmosphere of the planet Jupiter is taken as the central point of work because it is the most studied, after our neighbor, Mars. The main purpose of this study is to gather information about the molecules present in the different atmospheric layers of this celestial body, as well as other properties such as temperature, pressure, rotation, translation, and others. It is important to note that the scope of this research does not comprehend in detail all these properties mentioned but rather the beginning for the creation of a future database.

Palabras Clave: sistema solar, planetas, Júpiter, atmósfera, moléculas

INTRODUCCIÓN

El Sistema Solar es uno de los muchos sistemas planetarios que existe en el universo, donde se encuentra la Tierra y otros siete planetas que orbitan alrededor de la estrella conocida como el Sol, siendo este el único del sistema que emite luz propia proveniente la combustión de reacciones de fusión de H y He que son partículas que componen al astro. De manera análoga, en la superficie y atmósfera de los planetas que conforman el Sistema Solar, así como otros sistemas probablemente, se llevan a cabo distintas interacciones entre partículas dependiendo de las características dadas por la distancia a que se encuentran del Sol.

La cantidad de información que posee un planeta sobre sus componentes atmosféricos varía de ser detallada a no ser concluyente (Berg 1984); esto se debe al interés que el ser humano ha tenido en tal o cual cuerpo celeste dependiendo de la utilidad que se le vea para el desarrollo científico y tecnológico, como el contenido de agua, oxígeno u otra molécula valiosa p.e., y es por eso que conocer las partículas componentes de otros planetas cercanos tiene gran impacto e importancia.

En este caso, los planetas menos detallados en información de sus moléculas atmosféricas son Mercurio (Rasool and McGovern 1966), y Venus (Moroz 1981; Moses et al. 2000 y Kim et al. 2006), por ser muy calientes, y Saturno (Sada et al. 2005), Urano (Marley y McKay 1999), y Neptuno (Marten et al. 1993), por ser muy lejanos (aunque se han enviado suficientes sondas recientemente para conocer un poco más de estos planetas gigantes). Los estudios más detallados hasta la fecha corresponden a nuestros vecinos más cercanos: Marte, y Júpiter y a sus atmósferas de CO₂ e H₂, respectivamente.

Cabe resaltar que, con excepción de Marte (Moroz 1976; Wanke 1991; Jakosky et al. 2015 y 2017; Read y Mullholand 2015), el conocimiento de las moléculas presentes en las atmósferas de los planetas que conforman el Sistema Solar es relativamente pobre. El presente trabajo se centra en la revisión de distintas fuentes bibliográficas para recopilación de datos de algunas moléculas encontradas en la atmósfera de Júpiter, las cuales proporcionan información sobre dicho planeta.

MÉTODOS Y MATERIALES

La estrategia de estudio llevada a cabo en la estancia de verano fue la revisión bibliográfica de artículos que hablan de algunas de las moléculas que han sido encontradas, a través de los años, en distintas zonas y a diversas condiciones en las atmósferas de los planetas que pertenecen a nuestro sistema solar; su concentración en relación al componente más abundante; aquellos que hablan sobre planes a futuro de diversos estudios y los métodos que planean emplear para encontrar partículas así como los métodos que se emplearon en el pasado y los que se emplean contemporáneamente; o los que hablan de cómo algunas moléculas se originaron en el planeta o migraron hacia él y las razones que explican esto; entre otros temas relacionados. Dicha búsqueda se llevó a cabo usando la base de datos más importante de artículos astronómicos, ADS (Astrophysics Data System: http://adsabs.harvard.edu/abstract_service.html).

RESULTADOS

Durante la revisión bibliográfica se tuvo el inconveniente de tiempo insuficiente para la revisión a fondo de las moléculas encontradas en el sistema solar, aún para un sólo planeta es un proyecto bastante ambicioso. Es esta la razón por la que se eligió a Júpiter como cuerpo de estudio, ya que este planeta es uno de los que se tiene un conocimiento más amplio y, por tanto, información más abundante.

Júpiter es el quinto planeta del Sistema Solar y es el más masivo. Además es gaseoso con un diámetro ecuatorial más de diez veces el tamaño de la Tierra, formado principalmente por hidrógeno y helio. Su atmósfera está permanentemente cubierta de nubes que permiten trazar la dinámica atmosférica y muestran un alto grado de turbulencia, sobre todo en la mancha roja (hotspot).

En la Tabla 1 se presentan algunos de los resultados principales de la abundancia molecular de Júpiter. En dicha tabla se muestran algunas propiedades astronómicas de interés del planeta reportadas por Marten et al. (1993). Por su parte, la Tabla 2 muestra la proporción de mezcla (del inglés *mixing ratio*) de algunas moléculas encontradas a través de los años en la atmósfera de Júpiter por Encrenaz (1999), Lellouch et al. (2006), Carrier et al. (2007), y Nixon et al. (2007). Esta proporción se calcula usando la relación (1).

$$\text{Proporción de mezcla} = \frac{\text{Molécula de interés}}{\text{Molécula más abundante en el planeta}} \quad (1)$$

La atmósfera de Júpiter es bastante rica en átomos de H y He, así como hidrocarburos derivados, agua, amoníaco, ácido sulfúrico, monóxido y dióxido de carbono, entre otras; y comparte algunas características con la atmósfera de la Tierra. Para estudiar los parámetros físicos de las diferentes capas de la atmósfera de Júpiter es importante conocer las presiones y temperaturas en diferentes zonas para así entender las dinámicas moleculares y atómicas que se llevan a cabo. En la tropósfera baja, según Encrenaz (1999), el calor se transfiere por convección y la temperatura decrece conforme aumenta la altitud siguiendo un gradiente adiabático, mientras que en la tropopausa, la temperatura alcanza un mínimo de 110 K, donde la presión es de 100 mbar; en cambio, en la tropósfera superior y en la estratósfera, donde la temperatura incrementa con la altura, la energía se transfiere por radiación.

La primera clase de constituyentes en la tropósfera son H₂, He, los gases nobles, CH₄, NH₃, PH₃, CO, GeH₄, AsH₃, H₂O y, en pequeñas cantidades, H₂S. En esta región, algunas especies condensan a condiciones esperadas, por ejemplo, el amoníaco a 0.5 bar, el NH₄SH a 1.5-2 bares y el agua a unos pocos bares como menciona Encrenaz (1999); esta es la razón de encontrar pequeñas cantidades o de no encontrarlas donde se espera.

La segunda clase contiene especies estratosféricas, incluyendo hidrocarburos provenientes de la fotodisociación del metano por los rayos ultravioleta. El satélite ISO (Infrared Space Observatory) descubrió dos nuevos elementos: H₂O y CO₂, como menciona Encrenaz et al. (1999). No se espera encontrar PH₃ a estas alturas ya que tiende a condensar como el NH₃ y no se detecta en Júpiter entre 300 y 800 K y debe ser oxidada por H₂O a P₄O₆ a 10, 5 y 3 m para que fuera plausible encontrarla, según se cree. Por lo anterior, se espera que la velocidad de transporte vertical del PH₃ sea mayor a la oxidación (con explicaciones similares para otras especies fuera de equilibrio encontradas en la tropósfera, como son GeH₄, AsH₃ y CO) y que sea este el motivo por el que no se observa.

Tabla. 1. Parámetros principales de Júpiter

Periodo sidereal	11 años 314.84 días
Velocidad orbital	13.06 km/s
Diámetro ecuatorial	142796 km
Diámetro ecuatorial relativo a la Tierra	11.19
Masa relativa a la Tierra	317.9
Densidad promedio	1.31 g/cm ³
Gravedad superficial	24.8 m/s ²
Gravedad relativa a la Tierra	2.64
Velocidad de escape	59.64 km/s
Rotación sidereal	9 horas 50-56 minutos
Albedo	0.34
Principales componentes atmosféricos	H ₂ (88.8%) He (11%) CH ₄ (0.2%)

De 1995 a 1998, mediante el satélite ISO, se recabaron espectros de Júpiter y Saturno (Encrenaz et al. 1999), en donde se detectó vapor de agua en la tropósfera profunda de Saturno, nuevos hidrocarburos (CH₃C₂H, C₄H₂, C₆H₆, C₃H) en la estratósfera de Saturno y, vapor de agua y CO₂ en las estratósferas de Júpiter y Saturno. Por otro lado, las observaciones de CASINI/CIR en el 2000 encontraron una distribución de HCN y CO₂ en la estratósfera de Júpiter con una resolución y cobertura nunca antes vista. Además, se encontró un área donde el HCN aumenta, posiblemente por la fotólisis de NH₃, debido al impacto del Shoemaker-Levy 9, según Lellouch et al., (2006). Júpiter tiene un mezclado de partículas vertical muy lento en su atmósfera, así que se favorece más el mezclado horizontal y esto es conveniente para las presentes observaciones porque las especies químicamente estables residen en los niveles estratosféricos más altos (0.1-0.5 mbar). Esto quiere decir que las observaciones no son afectadas tan violentamente como en la situación que la dinámica vertical hiciera un poco más complicadas y turbulentas las observaciones y en cambio se tiene un entorno más o menos estable en cuanto

al mezclado de las especies. Para el seguimiento del impacto del Shoemaker-Levy 9, se utilizó como partícula de seguimiento el HCL, debido a que su distribución histórica se da horizontalmente desde su deposición y es una molécula estable, además de que cualquier descomposición sería rápidamente regenerada. La observación de la concentración de dicha molécula después del impacto que el planeta sufrió, se lleva a cabo a través de los años y por encima de 25 mbar, presión que se cree idónea. También se ha llevado un seguimiento de la fotólisis del NH₃ y del CO₂, que aunque no tienen un origen directo del impacto, se cree brindan información sobre la descomposición del agua a diferentes latitudes de la atmósfera; y por lo anterior, las dos moléculas anteriores, son trazas dinámicas.

También se han detectado otras moléculas en menores cantidades y aún bajo estudio, como menciona Atreya et al. (2003), donde se comenta se ha encontrado H₂O con una proporción de mezclado de $(6.0^{+3.9}_{-2.8}) \times 10^{-4}$ a 19 bar en la mancha caliente y tiende a incrementar con la profundidad. Además se ha sugerido el descubrimiento de sodio y también en la estratósfera de Júpiter se ha encontrado benceno “globalmente”. El radical CH₃, precursor de grandes moléculas, ha sido detectado ampliamente, así como hidrocarburos como el acetileno C₂H₂, el etano C₂H₆, los cuales son trazas importantes en la atmósfera de Júpiter, como menciona Nixon et al. (2007). Como el metano es la principal especie encontrada en la atmósfera reducida de Júpiter, en la estratósfera, la producción de acetileno y etano se inicia por la fotólisis del metano a longitudes de onda < 160 nm y la fotólisis de acetileno produce otras moléculas debajo de la homopausa a 170-200 nm. La información anterior, se obtuvo de observaciones del Voyager 1 y 2 en 1979 y en 2000, mediante el Cassini Millennium Flyby of Júpiter usando el instrumento Composite Infrared Spectrometer (CIRS).

Interesantes fenómenos de migración se muestran en las moléculas enlazadas al germano, como muestra Carrier et al. (2007), con la forma GeH_x (x=2-6) y son candidatos plausibles para moléculas organometálicas presentes en las atmósferas de Júpiter y Saturno. Usando espectroscopía de temperatura baja con espectros vibracionales se han observado siete de las moléculas de germano, detectados: GeH₃ (radical germil), Ge₂H₆ (digermano), Ge₂H₅ (radical digermil), H₂GeGeH₂ (digermenio), HGeGeH₃ (digermanolideno), HGeGeH₂ (radical digermanil) y GeH₂Ge (di-μ-hidrogermanio).

Tabla. 2. Distintas propiedades termodinámicas, de posición y proporciones de mezclado de algunas moléculas encontradas en Júpiter

Molécula	Proporción de mezcla	Presión	Temperatura (K)	Altura (km)	Ubicación
Especies mayoritarias					
H ₂	1	-	-	-	-
He	0.157±0.0036	-	-	-	-
Especies Principales Menores					
H ₂ O	(2-10)x10 ⁻⁹ ≤ 10 ⁻⁶ (5.6±2.5)x10 ⁻⁵ (6.0 ^{+3.9} _{-2.8})x10 ⁻⁴	- 4 bar 12 bar 19 bar	-	Estratósfera superior	-
			160	800	Hotspot
			-	-	
			-	-	
CH ₄	(2.1±0.4)x10 ⁻³	-	-	-	-
C ₂ H ₆	(1-5)x10 ⁻⁶	-	-	Estratósfera	-
C ₂ H ₂	(3-10)x10 ⁻⁸ <2.5x10 ⁻⁶	-	-	100-320	-
		1-10 μbar	200-425		
C ₂ H ₄	(7±3)x10 ⁻⁹ 2.5 ⁺² ₋₁ x10 ⁻⁹	-	-	-	Polo norte
		-	-		
C ₃ H ₈	Se detectó en el polo norte	-	-	-	Polo norte
C ₄ H ₂	Detección en el polo norte.	-	-	-	Polo norte
C ₆ H ₆	2.0 ⁺² ₋₁ x10 ⁻⁹	-	-	Estratósfera	Polo norte
NH ₃	(0.2-1)x10 ⁻⁵ (3.3±1.5)x10 ⁻⁴ (8.1±1.16)x10 ⁻⁴ (7.1±3.2)x10 ⁻⁴	0.5-2 bar	~1450	~1500-2000	Hotspot
		4 bar	160	800	
		8 bar	160	800	
		9-12 bar	160	800	Hotspot
H ₂ S	<2.0x10 ⁻⁸ 1x10 ⁻⁷ 7x10 ⁻⁶ (7.7 -0.5)x10 ⁻⁵	<0.7 bar	~200-425	~100-320	Hotspot
		≤4 bar	160	800	
		8.7 bar	160	800	
		8.7 bar	160	800	
Especies que no se encuentran en equilibrio					
PH ₃	(1-2)x10 ⁻⁷ 6x10 ⁻⁷	0.2-0.6 bar	900±40	100-300	-
		>1bar	1450	1500-2000	-
CO	1.6x10 ⁻⁹	-	-	-	-
CO ₂	4x10 ⁻¹⁰ 3x10 ⁻⁹	10 mbar	2000	25	-
		0.1 mbar			
GeH ₄	(7±2)x10 ⁻¹⁰	-	-	-	-
AsH ₃	(2.2±1.1)x10 ⁻¹⁰	-	-	-	-

CONCLUSIONES

Aunque Júpiter se ha explorado ampliamente, aún falta mucho camino por recorrer; así como para esta recopilación de datos sobre las características químicas y termodinámicas y, más lejos, de todos los planetas del sistema solar.

Átomos y moléculas presentes en la atmósfera de un planeta pueden contar la historia de este, pasada y presente en tiempo real; así como la posibilidad de conjeturar sobre su futuro. El conocimiento de las dinámicas de partículas en un planeta tiene un gran impacto en el comportamiento climático del mismo, es un sistema termodinámico complejo que permite (o evita) ciertas reacciones de las moléculas provenientes del mismo o que han “llegado del espacio exterior” y que componen la atmósfera de un planeta y brindan sus características individuales y representativas.

BIBLIOGRAFIA

- ATREYA, S. et al. (2003). “Composition and Origin of the Atmosphere of Jupiter: an Update and implications for the extrasolar giant planets” en *Planetary and Space Science*, Núm. 51, vol. 2, [pp. 105-112].
- BERG, C. (1984). “Molecular Spectroscopy of Planetary Atmospheres” en *Ann. Phys.*, Núm. 9, Vol. 4, [pp. 575-584].
- BOYNTON, W. et al. (2007). “MESSINGER and the Chemistry of Mercury's Surface” en *Space Sci. Rev.*, Núm. 131, [pp. 85-104].
- CARRIER, W. et al. (2007). “Laboratory Investigations on the Infrared Absorptions of Germanium-Bearing Molecules-Directing the Identification of Organo-Germanium Molecules in the Atmospheres of Jupiter and Saturn” en *The Astrophysical Journal*, Núm. 564, Vol. 1, [pp. 687-692].
- ENCRENAZ, T. (1999). “The Planet Jupiter” en *The Astron Astrophys Rev.*, Núm. 9, Vol. 1, [pp. 171-219].
- ENCRENAZ, T. et al. (1999). “The Atmospheric Composition and Structure of Jupiter and Saturn from ISO observations: a preliminary review” en *Planetary and Space Science*, Núm. 47, Vol. 2, [pp. 1225-1242].
- HALEVY, I. and HEAD, J. (2017). “Atmospheric Mass and the Geologic record of Water of Mars” en *Lunar and Planetary Science Conference*.
- JAKOSKY, B. et al. (2015). “The Mars Atmosphere and Volatile Evolution (MAVEN) Mission” en *Space Science Reviews*, Núm 195, [pp. 3-48].
- JAKOSKY, B. et al. (2017). “Mars' Atmospheric History Derived from Upper-Atmosphere Measurements of $^{38}\text{Ar}/^{36}\text{Ar}$ ” en *Science*, Núm. 355, [pp. 1408-1410].
- KIM, J. et al. (2006). “High Resolution Spectroscopy of Saturn at 3 microns: CH_4 , CH_3D , C_2H_2 , C_2H_6 , PH_3 , clouds and haze” en *Icarus*, Núm. 185, Vol. 2, [pp. 476-486].
- LELLOUCH, E. et al. (2006). “On the HCN and CO_2 abundance and distribution in Jupiter's Stratosphere” en *Icarus*, Núm. 184, Vol. 2, [pp. 478-497].
- MARLEY, M. and McKAY, C. (1999). “Thermal Structure of Uranus' Atmosphere” en *Icarus*, Núm. 138, Vol. 2, [pp. 268-286].
- MARTEN, A. et al. (1993). “First Observations of CO and HCN on Neptune and Uranus at Millimeter Wavelengths and their Implications for Atmospheric Chemistry” en *The Astrophysical Journal*, Núm 46, Vol. I, [pp. 285-297].
- MOROZ, V. (1976). “The Atmosphere of Mars” en *Space Science Reviews*, Núm. 19, [pp. 763-843].
- MOROZ, V. (1981). The Atmosphere of Venus. *Space Sci. Rev.*, Núm. 29, [pp. 3-127].
- MOSES, J. et al. (2000). “Photochemistry of Saturn's Atmosphere I. Hydrocarbon Chemistry and Comparisons with ISO Observations” en *Icarus*, Núm. 143, Vol. 2, [pp. 244-298].
- NIXON, C. et al. (2007). “Meridional variations of C_2H_2 and C_2H_6 in Jupiter's Atmosphere from Cassini CIRS Infrared Spectra” en *Icarus*, Núm. 188, Vol. 1, [pp. 47-71].
- PARK, J. et al. (2017). “ $^{20}\text{Ne}/^{22}\text{Ne}$ in the Martian Atmosphere: New Evidence for Martian Meteorites” en *Lunar and Planetary Science Conference*.
- RASOOL, S. H., S. and MCGOVERN, W. (1966). “The Atmosphere of Mercury” en *Space Sci. Rev.*, Núm. 5, [pp. 565-584].
- READ, P. and MULLHOLAND, D. (2015). “The Physics of Martian Weather and Climate: a review” en *Reports on Progress in Physics*, Núm. 78, Vol. 12, [pp. 125-901].
- SADA, P. et al. (2005). “Observations of C_2H_6 and C_2H_2 in the Stratosphere of Saturn” en *Icarus*, Núm. 173, Vol. 2, [pp. 499-507].
- WANKE, H. (1991). “Chemistry, accretion and evolution of Mars” en *Space Science Reviews*, Núm. 56, [pp. 1-8].
- Astrophysics Data System: http://adsabs.harvard.edu/abstract_service.html

HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE UN CONCENTRADO DE PROTEÍNAS DE SUERO DE LECHE Y EVALUACIÓN DE SUS PROPIEDADES TENSOACTIVAS.

Martha Ivonne Muñoz Martínez¹ y Mario Ávila Rodríguez²

RESUMEN

En el presente trabajo se propuso una metodología para la determinación de parámetros fisicoquímicos que permitan caracterizar las propiedades superficiales de las proteínas antes y después del proceso de hidrólisis enzimática a la que se ven sometidas las muestras. Los parámetros evaluados fueron la tensión interfacial, la tensión interfacial dinámica, la concentración, la hidrofobicidad superficial y el punto isoeléctrico medido indirectamente a partir del potencial Zeta.

ABSTRACT

In the present work a methodology is proposed for the determination of physicochemical parameters that will allow to the characterization of the surface properties of the proteins before and after the process of enzymatic hydrolysis to which the samples are submitted. The evaluated parameters were the interfacial tension, dynamic interfacial tension, concentration, surface hydrophobicity and isoelectric point measured indirectly from the Zeta potential.

Palabras clave

Lactosuero, tensoactivos, tensión interfacial, hidrofobicidad.

INTRODUCCION

La industria láctea es una de las más grandes debido a la importancia en la alimentación humana; es por ello que al tener un subproducto que en muchos casos se considera desecho como es el concentrado de suero de leche, se han buscado aplicaciones y usos para sacar provecho con tendencias alimenticias¹.

Las proteínas cuentan con propiedades llamadas tensoactivas, es decir, presentan actividad en las superficies reduciendo la superficie del líquido en el que esta disuelto o bien la tensión superficial de la intercara si es que hubiera otra fase presente. Para que una sustancia sea tensoactivo se requiere que tenga dos grupos: uno polar (hidrófilo) y otro no polar (Hidrófobo). Las propiedades tensoactivas de las proteínas se fundamentan en el poder de disociación del tensoactivo en presencia de un electrolito y de sus propiedades fisicoquímicas.

En esta sección del proyecto se busca establecer una metodología para la determinación de parámetros fisicoquímicos que permitan caracterizar las propiedades superficiales de las proteínas antes y después del proceso de hidrólisis enzimática a las que se ven sometida las muestras como parte de la búsqueda de derivados con propiedades tensoactivas mejoradas.

METODOLOGÍA

1. Materia prima

WPC hidrolizado y purificado al 3 %. (WPC-HP)
WPC microfiltrado al 3% (WPC-P)
WPC-F, WPC filtrado al 3%
WPC-D, WPC desnaturalizado al 3%
B- lactoglobulina hidrolizada y purificada al 3% (β -LG-HyP)
B- lactoglobulina nativa y desnaturalizada al 3% (β -LG-Nat.) y (β -LG-Des)

2. Tensión interfacial instantánea.

La tensión interfacial se midió en un sistema óptico de medida de ángulo de contacto (OCA, Dataphysics) se trabajó a 27°C y una humedad de 15%. Se realizó por triplicado cada experimento para ambas muestras. Se realizó una serie de disoluciones de cada muestra con diferentes concentraciones ascendiendo de 0.005% hasta 3%. Se utilizó la técnica de gota colgante², con un volumen de gota de 8.5 μ L y se tomaba lectura inmediatamente después de formarse la gota.

3. Tensión interfacial dinámica.

Para realizar las mediciones se usó el equipo de ángulo de contacto a 27°C y una humedad de 15%. Cada medición se realizó a la misma gota cada minuto a lo largo de 10 min con la técnica de gota colgante² a las concentraciones para cada muestra 0.005%, 0.1%, 1%

4. Hidrofobicidad.

Para realizar las mediciones se usó el equipo de ángulo de contacto, se trabajó a 27°C y una humedad de 15%. Para este parámetro se utilizó la técnica de medición de ángulo de contacto, con líquidos de diferente polaridad en este caso Agua desionizada, Diyodometano y formamida. Se depositaron las proteínas en membranas de 10KDa por ultrafiltración a 30 psi sin agitación durante 2 horas con celdas Amicon y se secaron.

5. Potencial Z

Las mediciones se realizaron a 25°C, por triplicado para ambas muestras con una concentración de 100 µL en 1 mL de agua desionizada, en un equipo Zetasizer (Malvern Instruments). Se buscó obtener una buena lectura de potencial Zeta y así poder describir el comportamiento de cargas de la mezcla de péptidos a diferente pH para poder relacionar el potencial zeta con el pH y conocer el punto isoeléctrico. Se utilizó 1mL de muestra para la medición se utilizó una celda de inmersión.

RESULTADOS Y DISCUSION

1. Tensión interfacial instantánea.

En la tabla 1 se muestran los resultados de tensión interfacial instantánea de ambas muestras de WPC. El valor de tensión que se presenta es el promedio del triplicado de cada muestra.

Tabla 1. Valores de tensión interfacial instantánea para las muestras de WPC-P y WPC-HP

Muestra	Concentración (%)	Tensión interfacial		Muestra	Concentracion (%)	Tensión interfacial	
		(mN)	Desv Estand			(mN)	Desv Estand
WPC-P	0	71.7766	0.4196	WPC HP	0	71.7766	0.4119
	0.005	71.6333	0.2020		0.005	69.9431	0.3219
	0.01	70.9700	0.1212		0.01	68.1166	0.1823
	0.05	67.9600	1.001		0.05	58.2700	0.3726
	0.1	63.1100	0.5548		0.1	55.6700	0.3051
	0.5	57.8366	0.1792		0.5	54.2766	0.3523
	1	55.4700	0.1282		1	52.6233	0.0680
	3	52.2766	0.3100		3	46.4466	0.1266

Se pudo observar que la tensión disminuye a medida que aumenta la concentración de la muestra, alcanzando sus valores más bajos a una concentración de 3%. Además, se observó que, al comparar los valores de tensión entre las muestras filtrada e hidrolizada se nota una disminución considerable en la tensión para las muestras hidrolizadas.

2. Tensión interfacial dinámica.

En las Figuras 1 y 2 se muestran la relación que existe entre la tensión interfacial con respecto al tiempo y como se mejora esta característica a medida que se aumenta la concentración. La tensión interfacial disminuye considerablemente en la muestra de WPC hidrolizado y purificado. También se comprobó que a medida que aumenta la concentración disminuye la tensión.

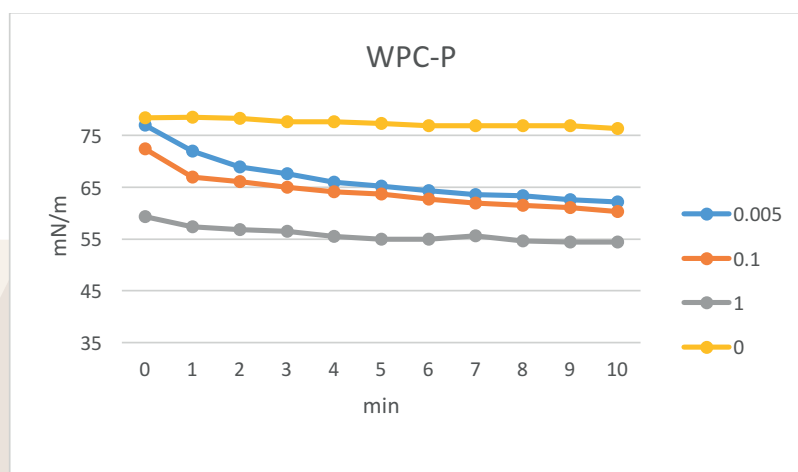


Figura 1. Gráfica del comportamiento de la tensión superficial del WPC-P a través del tiempo.

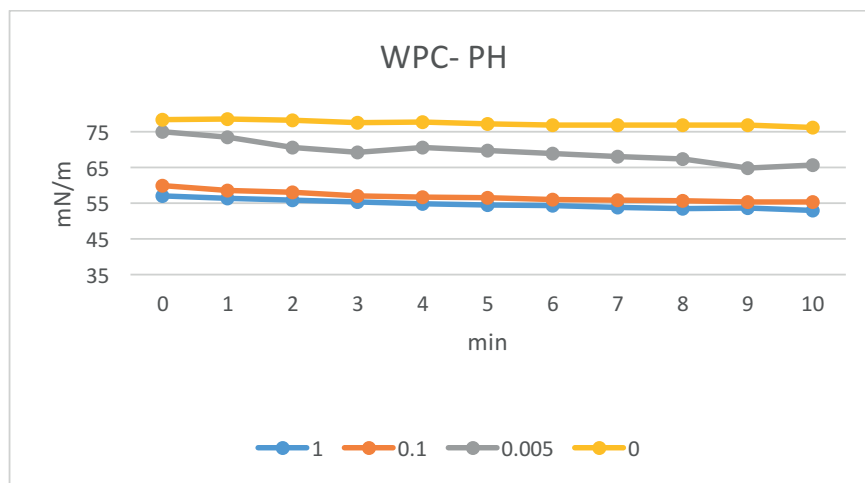


Figura 2. Gráfica del comportamiento de la tensión superficial del WPC-PH a través del tiempo.

3. Hidrofobicidad.

Se realizaron deposiciones de diferentes muestras y concentraciones en el mismo tipo de membrana (10 KDa de celulosa regenerada), de acuerdo con el método propuesto en el protocolo para medición de hidrofobicidad de proteínas³. El objetivo fue ver si mediante esta técnica es posible observar el cambio en hidrofobicidad de las proteínas debido al proceso de desnaturalización térmica.

Para realizar la prueba de hidrofobicidad por la técnica deseada es necesario tener una superficie lo mas lisa y plana posible, pero al hacer deposiciones por filtración en algunos casos se observó que no se obtuvo la superficie ideal para las mediciones ya que no se observó gran variación en los ángulos de contacto. Los resultados se muestran en la Tabla 2, donde se observa que para las muestras de WPC-D y WPC-F se obtiene un aumento en el ángulo de contacto con agua en WPC-D, lo que significa que se trata de una superficie más hidrofóbica. En cuanto a la formamida se tiene una disminución de ángulo con respecto a WPC-D, lo que indica una afinidad hacia esta sustancia. El Diyodometano al ser no polar, presentó un menor ángulo de contacto con la muestra WPC-D. La β -LG-Nat presentó un menor ángulo de contacto con el agua, lo que indica su mayor hidrofiliabilidad respecto a la β -LG-Des, lo que coincide con los ángulos observados para el diyodometano, donde se observó que la β -LG-Nat muestra una menor afinidad en comparación con la β -LG-Des.

Tabla 2. Valores promedio de hidrofobicidad WPC-F Y WPC-D, β -LG-Des, β -LG-Nat.

Muestra	Hidrofobicidad.		
	Agua	Formamida	Diyodometano
Membrana sin proteína.	70.15	75.05	41.18
WPC-F	61.77	69.19	47.69
WPC-D	64.72	37.20	37.68
β -LG-Des	61.43	68.23	40.34
β -LG-Nat.	48.22	67.45	42.66

4. Potencial Zeta.

Se midió el potencial zeta en una escala amplia pero con aumentos pequeños entre cada punto de pH en busca de tener un mayor control y acercamiento al punto de carga cero o punto isoeléctrico. Aunque no se obtuvo experimentalmente el punto isoeléctrico de la β -LG-HyP y WPC-HyP si se obtuvo el rango en el que existe dicho punto, que es entre 4.1 y 5.2, como se observa en las Figuras 5 y 6 respectivamente.

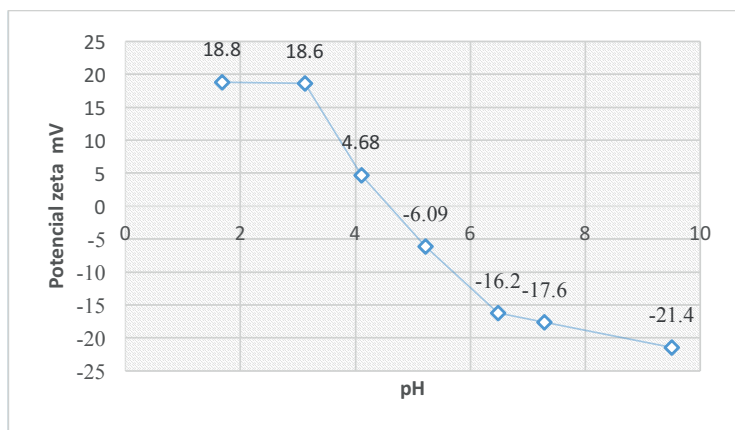


Figura 5. Potencial zeta (mV) de la β -LG-HyP en relación al pH.

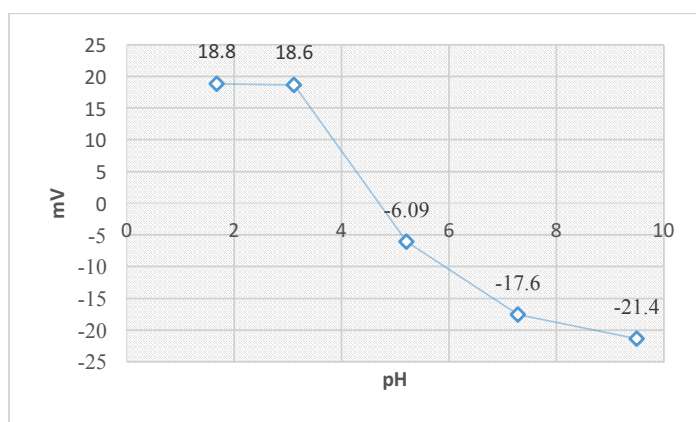


Figura 6. Potencial zeta (mV) de WPC-HP en relación al pH.

CONCLUSIONES

Se cumplió con los objetivos relacionados con la tensión interfacial pues se demostró que las propiedades tensoactivas de una proteína o concentrado aumentan al sufrir algún tipo de proceso, en este caso, hidrólisis. Mientras mayor sea la concentración de proteínas hidrolizadas se tendrá una mayor estabilidad en cuanto al tiempo y los cambios de tensión que sufran dichas muestras.

En la técnica aplicada para medir la hidrofobicidad, es necesario mejorar el procedimiento de secado de membrana para lograr la superficie completamente plana en donde se pueda determinar la el ángulo de contacto utilizando algún equipo óptico. En cuanto a hidrofobicidad se obtuvo que las proteínas desnaturalizadas tienen una afinidad mayor hacia las sustancias no polares, es decir, son más hidrofóbicas; caso contrario de las nativas pues estas eran más afines a las polares.

Respecto al potencial Zeta se observó que es sencillo conocer el punto isoeléctrico con el equipo Zeta Sizer si se hace una relación entre el potencial y el pH. Aunque solo se obtuvo un intervalo donde se tiene la seguridad que existe dicho punto ahora se pueden buscar variaciones aún más controladas de pH para dar con el punto isoeléctrico.

BIBLIOGRAFIA

- ¹Macías, M. (2017). Componentes y propiedades de los alimentos. Universidad Autónoma de Aguascalientes. México.
- ²Fuentes, J., López de Ramos, A. (2001). "Nuevo método para medir la tensión superficial mediante la técnica de la gota colgante" en Centro de información tecnológica, Num 2, Vol. XII, Enero-Diciembre, [pp. 181-188].
- ³Measurement of Protein Hydrophobicity, (2003)current protocols in food analytical chemistry

CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE ENFERMEDADES DÉRMICAS EN ANUROS EN EL ANP LAS MUSAS.

Laviada-Camarena Ingrid Paulina¹, Márquez-Lucio María Azucena¹, Leyte-Manrique Adrián² y Alejo-Iturvide Francisco¹

RESUMEN

En los últimos 20 años, se ha registrado un declive a nivel mundial sobre distintas especies de anfibios, lo cual pone en riesgo a sus poblaciones y permanencia en los ecosistemas en los que se encuentran. El declive de anfibios, se ha documentado en ambientes tanto templados como tropicales del mundo. Siendo una de los principales causas de una baja en las poblaciones y extinción el cambio climático. Éste tiene efectos en los patrones de precipitación y temperatura, y los cuales tienen efectos nocivos en aspectos relacionados a la ecología y biología de los anfibios, como es el caso de los anuros (ranas y sapos), así como en la aparición, propagación y permanencia de agentes patógenos microbianos como son bacterias, hongos y virus. Para determinar la presencia de los patógenos en el estado de Guanajuato, se ha realizado un primer estudio en el Área Natural Protegida (ANP) Las Musas, donde durante los meses de septiembre a enero se han recolectado muestras de un total de 70 individuos, pertenecientes a las especies de *Hyla arenicolor* (24.28%), *Lithobates neovolcanicus* (35.7%), *Incilis occidentalis* (7.14%), *Hyla eximia* (28.57%), y *Anaxyrus compactilis* (4.31%). Del total de los 70 individuos más del 50% han presentado síntomas de algún tipo de enfermedad y donde se han recolectado 4 individuos muertos que representan el 5.7% del total, los cuales han sido llevados al laboratorio para continuar con los estudios microbiológicos correspondientes. Las enfermedades registradas han afectado principalmente a la especie *Lithobates neovolcanicus* y en menor medida a la especie *Anaxyrus compactilis*.

ABSTRACT

In the last 20 years, there has been a worldwide decline in different species of amphibians, which puts their populations at risk and their permanence in the ecosystems in which they are found. The decline of amphibians has been documented in both temperate and tropical environments of the world. Being one of the main causes of a decline in populations and extinction of climate change. This has effects on the precipitation and temperature patterns, which have harmful effects on aspects related to the ecology and biology of amphibians, such as anurans (frogs and toads), as well as on the appearance, propagation and Permanence of microbial pathogens such as bacteria, fungi and viruses. To determine the presence of pathogens in the state of Guanajuato, a first study was carried out in the Natural Protected Area (ANP) Las Musas, where during the months of September to January samples were collected from a total of 70 individuals, belonging To *Hyla arenicolor* species (24.28%), *Lithobates neovolcanicus* (35.7%), *Incilis occidentalis* (7.14%), *Hyla eximia* (28.57%) and *Anaxyrus compactilis* (4.31%). Of the total of the 70 individuals, more than 50% have presented symptoms of some type of disease and where 4 dead individuals have been collected, representing 5.7% of the total, which have been taken to the laboratory to continue with the corresponding microbiological studies. Registered diseases have mainly affected the species *Lithobates neovolcanicus* and to a lesser extent the species *Anaxyrus compactilis*.

Palabras Clave: Anfibios, declive y agentes patógenos.

INTRODUCCIÓN

El ANP “Las Musas” es uno de los más bellos atractivos turísticos del municipio de Manuel Doblado. Los principales problemas que se presentan, son el desmonte por el crecimiento de los asentamientos humanos de las comunidades existentes, debido a la mala planificación, lo que incrementa el cambio de uso de suelo; la erosión y la contaminación del suelo; la tala inmoderada; la cacería ilegal; la presencia de plantas parásitas; la introducción de especies no nativas de flora y de fauna; la contaminación del agua proveniente de la presa Potrerillos y del río Colorado, originada por la ganadería al ubicarse corrales en las márgenes del río Colorado; el deterioro ambiental y la contaminación producida por las actividades recreativas sin regulación y control, así como por el vandalismo acaecido sobre la zona más visitada del río cercana a la comunidad de La Torrecilla. (IEE, 2013). En los meses de septiembre a enero se ha observado a las diferentes especies de anuros que existen en el ANP “Las Musas”, donde están registradas por el Instituto de Ecología del Estado seis especies de anfibios las cuales son: *Lithobates neovolcanicus*, *Hyla eximia*, *Hyla arenicolor*, *Incilis occidentalis*, *Anaxyrus compactilis* y la *Rhinella marina*. Las cuales se han visto amenazadas en los últimos años por diferentes causas pero principalmente por agentes patógenos como bacterias, virus y hongos. Guanajuato es uno de los estados de la República Mexicana menos estudiados en cuanto a anfibios y reptiles se refiere. A pesar de que su sistema de ANP está distribuido plenamente dentro de la entidad, los esfuerzos de estudios herpetofaunísticos se han enfocado a una reserva de la biosfera (Sierra Gorda), un parque ecológico (lago cráter La Joya), un área de restauración ecológica (laguna de Yuriria y su zona de influencia) y tres áreas de uso sustentable (cerros El Culiacán y La Gavia, cerro de los Amoles, cerro de Arandas); esto es, sólo seis ANP de 22 establecidas, lo que representa únicamente 27% del total (CONABIO, 2012).

MARCO TEORICO

El término anfibio se deriva de la palabra griega *amphibios*, que significa “entre, o en dos vidas”. (Leyte-Manrique & Domínguez-Laso, 2014). También se refiere a los organismos que pasan una parte de su vida en ambientes acuáticos y otra en terrestres. Los anfibios (Clase Amphibia) son vertebrados que conforman tres grupos muy diferentes uno de otro: Ranas y sapos (orden Anura) presentan extremidades posteriores alargadas especializadas para saltar, cuerpos cortos, sin cola, cabeza y ojos grandes; salamandras y tritones (Orden Caudata), tienen cuerpo alargado, con extremidades anteriores y posteriores pequeñas aproximadamente del mismo tamaño y cola larga; cecilias (Orden Gymnophiona), presentan cuerpo alargado, carecen de extremidades y tienen ojos muy reducidos, por lo que son

organismos especializados para una vida subterránea. En general, son organismos de talla pequeña, y solo algunas especies de ranas y salamandras alcanzan grandes tamaños (Canseco & Gutiérrez, 2010).

En general, los anfibios requieren de cuerpos de agua para reproducirse. En especial, los anuros que poseen etapas larvarias estrictamente acuáticas (renacuajos). Estos cuerpos de agua pueden ser permanentes (ríos, lagunas, presas, etc.), así como temporales (arroyos, charcas); sin embargo, no es raro encontrar renacuajos en charcos temporales. Algunos anfibios y reptiles toleran las condiciones de áreas agrícolas o ganaderas, y sus poblaciones se han mantenido estables a pesar de las alteraciones ambientales o incluso se han incrementado en algunas zonas. Otros anfibios y reptiles no resisten la transformación de los ambientes naturales, sobre todo cuando ésta implica la destrucción del estrato arbóreo y la contaminación de los cuerpos de agua, como sucede frecuentemente. Las poblaciones de estas especies se encuentran en franca y alarmante disminución. Entre las especies que requieren de vegetación relativamente conservada para subsistir (Navarrete, 2006).

De acuerdo a la NOM-070-SEMARNAT-2010, el estado resguarda 18 especies amenazadas y 30 en protección especial, resultando un total de 47% del total de las especies. Existen seis especies exóticas en la entidad, aparentemente de reciente introducción. (Quintero-Díaz *et al.* 2012) mencionan cinco de ellas y su problemática. Aunado a ello, recientemente fue reportada la presencia de un ejemplar del sapo gigante *Rhinella marina* en Sierra Gorda (Campos-Rodríguez *et al.*, 2009), una de las especies invasivas más dañinas que existen, pero no solo en la Sierra Gorda sino también en el ANP “Las Musas” puesto que también se encuentra dentro de las especies reportadas que habitan ahí. Las diferentes especies de anuros que existen en el ANP “Las Musas”, que están registradas por el Instituto de Ecología del Estado (IEE) seis especies de anfibios las cuales son: *Lithobates neovolcanicus*, *Hyla eximia*, *Hyla arenicolor*, *Incilus occidentalis*, *Anaxyrus compactilis* y la *Rhinella marina* (DNR, 2014).

Los anfibios están sufriendo una declinación mundial debido a la destrucción del hábitat principalmente. Se han descubierto efectos del cambio climático global sobre todo en la declinación de las poblaciones de anfibios, el que ha influido sobre la dispersión de enfermedades emergentes con resultados catastróficos en las poblaciones naturales (Lips *et al.*, 2005). Algunas de estas enfermedades que presentan los anfibios son: *Trichodiniasis*, Enfermedad de la mancha Blanca, Enfermedad de las ampollas de gas, Indigestión, Enfermedad de la pata y vientre roja, Parálisis, Enfermedad de la Piel pálida y Descomposición Intestinal.

MÉTODOS Y MATERIALES

Descripción del sitio de estudio. El área natural protegida “Las Musas”, de competencia estatal y con categoría de Área de Uso Sustentable, tiene una superficie de 3,174.764 hectáreas; se ubica en el municipio de Manuel Doblado y es uno de los más bellos atractivos turísticos del municipio por su característica zona arbolada al lado del río Colorado. La zona de “Las Musas” se caracteriza por la existencia de un bosque de galería compuesto principalmente por ahuehuetes (*Taxodium moctezumae*) en diferentes etapas de desarrollo y con buen grado de conservación, encontrando también sabinos, fresnos y sauces; asimismo el ecosistema acuático cuenta con una alta diversidad de especies. (IEE, 2013) Para la realización del proyecto se ha realizado hasta el mes de enero, tres muestreos en seis puntos diferentes del ANP, donde se han capturado, medido, muestreado y liberado cada uno de los individuos a excepción de aquellos que se han encontrado muertos.

Muestreo. La captura de los anuros se realiza por métodos estándares como son los transectos nocturnos y diurnos, este consiste en caminar lentamente en tramos buscando ranas y sapos que se encuentren en el suelo, sobre las ramas u hojas. Luego de que son capturadas inmediatamente se debe de registrar en una bitácora la especie, temperatura cloacal, el sexo, edad, longitud, tipo de microhábitat, temperatura ambiental y del microhábitat, también fecha y hora en que fue capturado, tipo de vegetación donde fue encontrado, coordenadas geográficas, tipo de clima y donde se encontró, y a su vez con ayuda de un hisopo de algodón estéril se le toma una muestra a una parte de la piel de la zona cloacal para su análisis posterior.

Los análisis están siendo realizados en el laboratorio de Microbiología del Instituto Tecnológico Superior de Irapuato (ITESI), ubicado en la ciudad de Irapuato, Guanajuato. Los aislados de cada una de las muestras recolectadas durante los muestreos son incubados en medio líquido TG (1% Triptona, 0.3% glucosa) a una temperatura de 23°C y de ahí son traspasados a un medio sólido que es el agar TGH (1.6% Triptona, 4% gelatina hidrolizada, 0.5% lactosa, 1% agar) para así tener colonias definidas de cada una de las muestras.

RESULTADOS

En la Tabla 1 se muestran las especies de anuros así como el número de individuos recolectados, muestreados y liberados de septiembre de 2016 a enero de 2017 en el ANP “Las Musas”, siendo la especie de *Lithobates neovolcanicus* la que más se ha encontrado en esta ANP, seguida de la *Hyla eximia*. Se puede observar también que a pesar que esta reportada como parte del ANP “Las Musas” la especie de *Rhinella marina* no se ha encontrado hasta el momento, en el sitio de estudio. El total de individuos registrados en los muestreos fue de 70, con diferentes ejemplares por cada especie, como se muestra en la Tabla 1. Del total registrado, *Lithobates neovolcanicus* representó el 35.7 %, seguido de *Hyla eximia* con el 28.57%. En contraste, *Anaxyrus compactilis* fue la especie menos representada con apenas el 4.31%

Tabla 1. Número de individuos recolectados de septiembre a enero en el ANP “Las Musas”

ESPECIE	NUMERO DE INDIVIDUOS RECOLECTADOS	% DEL TOTAL
<i>Lithobates neovolcanicus</i>	25	35.7%
<i>Hyla eximia</i>	20	28.57%
<i>Hyla arenicolor</i>	17	24.28%
<i>Incilus occidentalis</i>	5	7.14%

¹Instituto Tecnológico Superior de Irapuato, Departamento de Ingeniería Bioquímica; Carretera Irapuato-Silao Km 12.5, C.P. 36821, Irapuato, Gto., México ip.laviada@gmail.com

² Instituto Tecnológico Superior de Salvatierra, Depto. Innovación Agrícola Sustentable; aleyte@itesa.edu.mx

<i>Anaxyrus compactilis</i>	3	4.31%
<i>Rhinella marina</i>	0	0%
TOTAL	70	100%

En las siguientes Figuras 1, 2, 3, 4 y 5 se muestran las diferentes especies de anuros que existen en el ANP “Las Musas”.



Figura 1. *Lithobates neovolcanicus*



Figura 2. *Hyla eximia*



Figura 3. *Hyla arenicolor*



Figura 4. *Incilus occidentalis* (ANP “Las Musas”. Fotografía de Adrián Leyte Manrique)



Figura 5. *Anaxyrus compactilis* (ANP “Las Musas”. Fotografía de Adrián Leyte Manrique)

En la Tabla 2 se muestra el número de individuos enfermos encontrados en los meses de septiembre de 2016 a enero de 2017 en el ANP “Las Musas”. Las especies con mayor presencia de sintomatología de alguna enfermedad son *Lithobates neovolcanicus* con el 25.71%, *Hyla eximia* con 14.29%, *Hyla arenicolor* con 11.43%, *Incilus occidentalis* con 2.86% y siendo la menos afectada *Anaxyrus compactilis* con 1.42% debido a que ha sido la menos representada en este tiempo en el ANP. Además, en la Tabla 3 se muestra que el porcentaje de individuos encontrados muertos es de 5.7%. Aún falta por realizar pruebas adicionales de laboratorio para determinar la causa de la muerte de los individuos, por lo que fueron recolectados para posteriores estudios.

Tabla 2. Número de Individuos enfermos de cada especie y porcentaje que representa de un total de 70 individuos recolectados.

ESPECIE	NUMERO DE INDIVIDUOS ENFERMOS	% DE UN TOTAL DE 70
<i>Lithobates neovolcanicus</i>	18	25.71%
<i>Hyla eximia</i>	10	14.29%
<i>Hyla arenicolor</i>	8	11.43%
<i>Incilus occidentalis</i>	2	2.86%
<i>Anaxyrus compactilis</i>	1	1.42%
<i>Rhinella marina</i>	0	0%
TOTAL	39	55.71%

Tabla 3. Número de Individuos encontrados muertos de cada especie y porcentaje que representa de un total de 70 individuos recolectados.

ESPECIE	NUMERO DE INDIVIDUOS ENCONTRADOS MUERTOS	% DE UN TOTAL DE 70
<i>Lithobates neovolcanicus</i>	1	1.43%
<i>Hyla eximia</i>	3	4.28%
<i>Hyla arenicolor</i>	0	0%
<i>Incilus occidentalis</i>	0	0%
<i>Anaxyrus compactilis</i>	0	0%
<i>Rhinella marina</i>	0	0%
TOTAL	4	5.71%

Las siguientes Figuras 6, 7, 8 y 9 muestran las partes afectadas en algunos individuos que han presentado síntomas de alguna enfermedad. Por los síntomas presentados en el ejemplar de *H. eximia* mostrado en la Figura 7, el agente causal presuntivo es la bacteria *Aeromonas hydrophila*, mientras que en los demás ejemplares de las Figuras 6, 8 y 9, considerando las lesiones observadas, el agente causal presuntivo es el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis*, aunque se hace énfasis en la necesidad de estudios microbianos adicionales que complementen y descarten o confirmen la presencia de esos como los microorganismos como agentes causales de las patologías mencionadas.

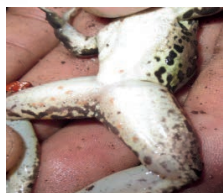


Figura 6. *Lithobates neovolcanicus*.
Se puede observar que tiene pequeños puntos de color rojo en la zona cloacal

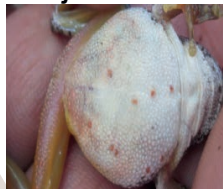


Figura 8. *Hyla arenicolor*
Se observa que en la zona del vientre contiene pequeños puntos de color rojo así como una coloración violácea en la parte baja del vientre.



Figura 7. *Hyla eximia*
Se observa que tiene en las patas delanteras una inflamación en color rojo intenso.

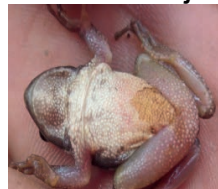


Figura 9. *Hyla eximia*
Se observa que en la zona del vientre contiene una coloración de color café que baja hasta la zona cloacal.

CONCLUSIONES

Es importante tener un conocimiento completo de las especies de anuros que existen en el ANP “Las Musas” y así mismo en el estado de Guanajuato, con la finalidad de conocer a profundidad a estas especies y su declive debido ya sea a la contaminación hecha por el ser humano al alterar su hábitat o de algún agente patógeno causante de aquellas enfermedades que van debilitando a los cuerpos de las diferentes especies que existen en esta ANP. Es importante mantener vigilados a estos pequeños organismos ya que son parte importante para el ecosistema y para mantener el equilibrio en este. Por otro lado se debe de seguir estudiando a fondo a los agentes patógenos causantes de las enfermedades de los anuros para tener un registro detallado y reportar con exactitud aquellas enfermedades que se pueden encontrar en el ANP “Las Musas”.

BIBLIOGRAFÍA

1. Adrián Leyte Manrique & Matías Domínguez Laso. (2014) Guía de los Anfibios y Reptiles de Charco Azul, Xichú, Guanajuato. Instituto Tecnológico Superior de Irapuato, con apoyo de la Sociedad Herpetológica Mexicana A.C. Distrito Federal. Primera edición
2. Dirección de Recursos Naturales (DNR). 2014. Inventario de fauna silvestre de las Áreas Naturales Protegidas en Guanajuato. Gobierno del Estado de Guanajuato: Instituto de Ecología del Estado. Guanajuato, México
3. Instituto de Ecología del Estado (IEE). (28 de Junio de 2013). Programa Manejo del Área Natural Protegida denominada “Las Musas”, en la Categoría de Área de Uso Sustentable. Recuperado el 01 de Abril de 2017, de : http://uai.guanajuato.gob.mx/biblioteca_digital/docart10/200804301705380.13.-Decla.Las%20Musas.pdf
4. Jorge Brambila Navarrete. (2006). “Métodos y Técnicas de Manejo y Conservación para Anfibios y Reptiles en campo: análisis, evaluación y aprovechamiento sustentable en México”. Manual de Anfibios y Reptiles.
5. Lips, k. R., p. A. Burrowes, J. R. Mendelson , & G. Parra-Olea. 2005. Amphibian declines in Latin America: widespread population declines, extinctions, and impacts. Biotropica
6. Luis Canseco Márquez & María Guadalupe Gutiérrez Mayén. (2010). Anfibios Y Reptiles Del Valle De Tehuacanucatlán. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). Primera Edición.
7. Quintero-Díaz, G.E., J.A. Berlín-Diosdado y L.A. López- Carreón. 2012. “Anfibios y reptiles exóticos en Guanajuato”, en *La Biodiversidad en Guanajuato: Estudio de Estado*. México. CONABIO/IEE.
8. Santos Barrera, G. 2004. Enfermedades infecciosas y su papel en la declinación mundial de las poblaciones de anfibios. CONABIO. Biodiversitas.

EVALUACIÓN CUANTITATIVA DE LA PRODUCCIÓN DE AMILASAS EN HONGOS AISLADOS DE LOS AZUFRES, MICHOACÁN

Ana Guadalupe Salazar Suárez¹ y Divanery Rodríguez Gómez²

RESUMEN

Las amilasas son enzimas que catalizan las reacciones hidrolíticas del almidón, dando origen a diversos productos que poseen una gran relevancia para algunas operaciones y procesos industriales. Las amilasas son comúnmente halladas en animales y en plantas, sin embargo, para fines industriales, las más utilizadas son aquellas de origen bacteriano o fúngico. En esta investigación se cuantificó la producción de amilasas de tres hongos aislados de los Azufres, Michoacán. Inicialmente se comparó la producción en medio sólido y en medio líquido usando como base el salvado de trigo, posteriormente se comparó la producción en medio sólido de la cepa 252 (que resultó la mayor productora en el análisis inicial) utilizando 3 medios de cultivo, uno con cáscara de papa, otros dos con cebada. Cabe mencionar que los medios de cultivo se complementaron con un buffer de fosfato 0.1M y pH 6. Las muestras se analizaron de acuerdo al método Street-Close, método Pichen para amilasas y método Bradford para proteínas. Las mayores actividades correspondieron a 3.48 USC/ g materia seca inicial correspondiente a 27 UA/g materia seca inicial para la cepa 252 en el medio con salvado de trigo. Lo que correspondió en proteína a 0.1 g/g materia seca inicial. Se sugiere posteriores estudios hacia la combinación de sustratos para el mejoramiento de la actividad.

ABSTRACT

Amylases are enzymes that catalyze the hydrolytic reactions of starch, giving rise to diverse products that have a great relevance for some operations and industrial processes. Amylases are commonly found in animals and plants, however, for industrial purposes, the most used are those of bacterial or fungal origin. In this research the production of amylases of three fungi isolated from “Los Azufres”, Michoacán, was quantified. Initially the production in solid medium and liquid medium was compared using wheat bran as the basis, then the production in solid medium of strain 252 (which was the largest producer in the initial analysis) was compared using 3 culture medium, one with potato peel, two others with barley. It should be mentioned that the culture media were supplemented with a 0.1M phosphate buffer and pH 6. Samples were analyzed according to the Street- Close and Pichén methods for amylases and Bradford for protein quantification. The highest activities were obtained for strain 252 in were bran, it was 3.48 SCU g dry mass correspondent to 27 AU/g dry matter to 0.1 g of protein/g dry matter. Media combinations in order to increase activity are suggested.

Palabras clave: Amilasas, proteína, cultivo en medio sólido.

INTRODUCCIÓN

Las enzimas son catalizadores biológicos en su mayoría de origen proteico que actúan sobre un sustrato en el que llevan a cabo una acción catalítica. Son de gran importancia en la industria tanto farmacéutica, textiles, cuero, alimentos y detergentes (Castaño & López, 2016). En esta familia se encuentran: α -amilasa (E.C. 3.2.1.1; α -1,4-glucan-4-glucanohidrolasa), conocida también en el comercio y el ámbito científico como glucogenasa y endoamilasa. Esta endoenzima, libera dextrinas formadas por 7 unidades de glucosa, se la denomina enzima dextrinizante o licuante, debido a la capacidad para disminuir la viscosidad de las soluciones de almidón (Kunamneni & Singh, 2005, Chon & Liu, 2009) y glucoamilasa (E.C.3.2.1.3) se conoce como amiloglucosidasa y es una α -1,4-D-glucano glucohidrolasa. Esta enzima hidroliza los enlaces α -1,4-D-glucosa, desde el extremo no reductor de la molécula de almidón y los enlaces α -1,6-glucosídicos a menor velocidad, por lo cual, el producto final de la acción hidrolítica sobre el almidón es glucosa. Estas enzimas tienen gran aplicación en la industria alimentaria en la hidrólisis del almidón para la obtención de jarabe de glucosa, maltodextrinas y almidones modificados. En el proceso de panificación, la adición de amilasas tiene por objeto aumentar el valor “panificador” de las harinas, generando un adecuado desprendimiento de CO₂ (Ghavidel & Davoodi, 2011, Raimi y otros, 2012). En la obtención de cervezas de bajo contenido calórico, las cuales degradan todo el almidón a azúcares fermentables que se convierten en alcohol y CO₂, por las levaduras, de esta manera, no se encuentran azúcares libres que aumentan las calorías del producto. En la obtención de alcohol, las amilasas hidrolizan el almidón proveniente de maíz, papas, cebada, yuca, etc., a fin de producir su licuación y sacarificación, antes del proceso de fermentación con las levaduras. Las amilasas se emplean en los detergentes para eliminar las manchas que contienen almidón. Las amilasas provocan la coagulación del almidón al hidrolizarlo. Se adhieren a las superficies textiles y actúan como pegamento para los compuestos de almidón (Enzimas).

Las cepas aisladas de los Azufres, Michoacán tienen relevancia debido a las altas temperaturas a las que se desarrollan. Por tal motivo se determina cuantitativamente la producción de amilasas en 3 cepas de hongos aislados de los Azufres, Michoacán a partir de la cantidad de sustrato consumido así como la determinación cuantitativa de proteína.

MATERIALES Y METODOLOGÍA

Los hongos en estudio fueron aislados de la zona de los Azufres, Michoacán, (Quiñones, Morales, & López, 2016) se usaron las cepas 252, 9A y 10A debido a estudios previos, de selección de cepas productoras de amilasas (González Quevedo et al., 2017). Los hongos fueron crecidos en Agar Papa Dextrosa por 7 días a 28°C. Los medios de cultivo usados en la medición inicial fueron: Para el medio líquido, 25 ml de caldo de salvado de trigo al 4%, con pH 6 y 25 ml de solución de almidón al 2 %. Para el medio sólido, 10 g de salvado de trigo, 1 g de rastrojo de maíz, 7.5 ml de buffer Fosfato y 7.5 ml de solución de almidón al 2%. Otro medio de cultivo sólido llevaba 20 g de cáscara de papa y 7.5 ml de buffer fosfato; 20 g de cebada y 23 ml buffer fosfato 0.1 M; 64 g de cebada hervida y 8 ml de buffer fosfato. Se ajustó el pH de los medios a 6 y se esterilizaron en autoclave a 121°C por 15 min. Los medios se inocularon con 6 círculos de 5 mm de diámetro en cada matraz. Para el medio líquido se dejaron incubar a 33°C y 150 rpm por 7 días y para los medios sólidos se incuban a 28°C por 7 días.

Las muestras de medio sólido fueron tomadas a 72 h de cultivo y suspendidas en 10 ml de buffer fosfato 0.1 M, pH 6. Todas las muestra se centrifugaron por 15 min, el sobrenadante se separó y guardó en refrigeración hasta su uso. Se prepararon las muestras para la medición de amilasas de acuerdo al método Street-Close (Lozada, 2015), método de Pichén (2008) y proteína por el método de Bradford (Ramírez, y otros, 2014). Se hicieron curvas patrón usando soluciones con concentración conocida de almidón soluble y albúmina sérica bovina para medir amilasas y proteína, respectivamente. Se determinó la humedad de los medios de cultivo sólidos con una termobalanza y el contenido de esporas del inóculo por conteo con Cámara de Neubauer.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los datos de la tabla 1 muestran una comparación de la cantidad de proteína y amilasas producidas por las tres cepas en estudio en medio sólido y líquido, según la formulación referida para salvado de trigo. Se observó que se obtuvo mayor producción de proteína en el medio sólido respecto al líquido de las cepas 252 y 9A. Mientras que en la actividad enzimática por los métodos de Street-Close se encontró mayor actividad en la cepa 252 y 10A que en líquido. Usando el método de Pichén los perfiles fueron similares en los dos sistemas de cultivo.

Se usaron dos métodos para determinar la enzima, en los cuales se encontraron inconsistencias en los resultados, ya que por el método de Pichén las actividades encontradas en medio sólido y líquido fueron similares y la cepa 10A obtuvo mayor actividad, por otra parte usando el método Street-Close la mayor actividad fue en medio sólido y con la cepa 252. Para tener mayor certeza se usó el dato de proteína, el cual tiene tendencia similar al método Street-Close.

Tabla. 1. Comparación de producción de proteína y amilasas en cultivo en medio sólido (CMS) y en cultivo en medio líquido (CML)

	Cepa	g proteína / gMS	USC/ gMS	UA/ gMS
CMS	252	0.11 ± 0.01	3.48 ± 1.5	27.01 ± 0.0
	9A	0.08 ± 0.0	0.47 ± 0.55	25.53 ± 0.0
	10A	0.05 ± 0.05	0.91 ± 0.4	37.18 ± 11.4
CML	252	0.05 ± 0.02	0.47 ± 0.03	28.25 ± 0.22
	9A	0.03 ± 0.01	0.50 ± 0.6	27.28 ± 1.78
	10A	0.06 ± 0.02	0.00 ± 0.0	30.05 ± 1.12

De acuerdo al método de inoculación empleado, no es posible realizar una comparación estricta de las 3 cepas, ya que las cepas 9A y 10A no presentaban suficiente esporulación al cabo del cultivo para la producción de inóculo. Se midió la concentración de esporas que se inoculó pero no fue idéntica para todas las cepas. Por lo que se procedió a usar la cepa 252 en los experimentos sucesivos, además de presentar la mayor actividad usando el método Street-Close, su fisiología de producción de esporas facilita la estandarización de los cultivos para experimentos posteriores.

Se realizaron experimentos adicionales en medios de cultivo sólidos de la cepa 252. Los resultados se muestran en la tabla 2, en la cual se observa una comparación de la cantidad de proteína y amilasas producidas en 4 diferentes medios de cultivo en el sistema sólido, las unidades que se presentan es de unidades enzimáticas respecto a los gramos de materia seca del medio cultivo. Se compararon dos métodos de evaluación de amilasas, en los cuales se encuentra el mismo comportamiento, mayor producción en medio conteniendo salvado de trigo, seguido de cáscara de papa y los medios de menor producción son los que contenían cebada, tanto cruda como hervida. En cuanto a la producción de proteína, el salvado de trigo tiene una mayor producción.

Se presenta también la actividad específica, es decir la actividad enzimática por gramo de proteína, siendo mayor en salvado de trigo que en los demás medios, en correspondencia al perfil obtenido de amilasas.

Tabla. 2. Comparación de producción de proteína y amilasas en cultivo en medio sólido para la cepa 252

Medio de cultivo	g proteína / gMS	USC/ gMS	UA/ gMS	USC/ gproteína
Salvado de trigo	0.10 ± 0.012	3.48 ± 1.5	27.01 ± 1.5	95.2
Cáscara de papa	0.02 ± 0.015	2.16 ± 1.17	25.64 ± 2.57	14.1
Cebada	0.02 ± 0	0.32 ± 0.3	6.44 ± 0.79	18.2
Cebada hervida	0.01 ± 0.002	0.17 ± 0.044	4.13 ± 0.25	33

En comparación con la literatura, Olivares de la Cruz, et al., (2012) encontraron una producción de amilasas de 0.4-0.5 USC/ml usando *Aspergillus niger* en medio conteniendo salvado de trigo, al hacer la conversión de unidades se encuentra que la actividad amilasa registrada en el presente estudio corresponde a 0.9 USC/ ml en medio de salvado de trigo. Por lo que la actividad se encuentra en el rango de medición. De manera positiva, en todos los medios de producción la actividad está por encima de la referencia.

Además se midió la humedad relativa del cultivo en medio sólido usando la termobalanza. Los resultados se muestran en la tabla 3. La formulación de los medios trató de ajustarse a 70% de humedad, sin embargo debido a factores relacionados con el pretratamiento del sustrato, no se logró. Este sería un factor a tener en cuenta en experimentos posteriores para poder realizar una mejor comparación de los sustratos. La humedad relativa puede haber influido en el crecimiento del hongo y su producción de enzima.

Tabla. 3. Humedad relativa (%) de los medios de cultivo en sistema sólido

Medio de cultivo	HR (%)
Salvado de trigo	57.75
Cáscara de papa	88.62
Cebada	66.4
Cebada hervida	46.34

CONCLUSIONES

La mayor producción de amilasas se encontró en la cepa 252 y en medio de salvado de trigo adicionado con almidón. Se continuará trabajando hacia el ajuste de la humedad en el medio de cultivo y la combinación de sustratos como puede ser salvado de trigo con cáscaras de papa.

AGRADECIMIENTOS

A ITESI y PRODEP por el financiamiento del proyecto.

BIBLIOGRAFÍA

CASTAÑO, G., & LÓPEZ, J. (1 de Marzo de 2016). *Aplicación de las enzimas para la industria de detergentes*. Obtenido de Aplicación de las enzimas para la industria de detergentes: http://www.colmayor.edu.co/archivos/25_aplicacin_de_las_enzimas_pa_qxueb.pdf (fecha de consulta 21-07-2017)

CHUNG, H. J., & LIU, Q. (2009). Impact of molecular structure of amylopectin and amylose on amylose chain association during cooling. *Carbohydrate Polymers*, 77(4), 807-815.

Enzimas. (s.f.). Obtenido de Enzimas: <https://tuylaquimica.files.wordpress.com/2011/03/enzimas.pdf> (fecha de consulta 21-07-2017)

GHAVIDEL, R. A., & DAVOODI, M. G. (2011). Evaluation of changes in phytase, α -amylase and protease activities of some legume seeds during germination. In *International Conference on Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics IPCBEE* (Vol. 5).

GONZÁLEZ QUEVEDO D.C., SALAZAR SUAREZ A.G, GONZÁLEZ PONCE M. DEL R., RODRÍGUEZ GÓMEZ D. Evaluación cualitativa de la producción de amilasas y proteasas en cepas de hongos aislados de suelo de diferentes ambientes. Memorias del XVII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. 25 al 30 de Junio de 2017.

KUNAMNENI, A., & SINGH, S. (2005). Response surface optimization of enzymatic hydrolysis of maize starch for higher glucose production. *Biochemical Engineering Journal*, 27(2), 179-190.

LOZADA, M. (7 de Julio de 2015). *Determinación de los parámetros cinéticos de una enzima*. Obtenido de Determinación de los parámetros cinéticos de una enzima: <https://myslide.es/documents/determina-559bf583f32f2.html> (fecha de consulta 21-07-2017)

PICHÉN, L. (2008). *Efecto de la variación del pH en un medio de cultivo a base de salvado de trigo para la producción de amilasa por Paecilomyces lilacinus* (Doctoral dissertation, Tesis de Bachiller en Ciencias Biológicas. Perú: Universidad Nacional de Trujillo).

QUIÑONES, I., MORALES, A., & LÓPEZ, V. (2016). Aislamiento y caracterización de hongos y levaduras provenientes de la región geotérmica de “los Azufres”, Michoacán. *Jóvenes en la ciencia*, vol 2, núm 1, 180-187.

RAIMI, O. G., OLAITAN, S. N., FAJANA, O. O., & SANI, J. O. (2012). Effect of germination time on fat and protein contents, and α -amylase activity of Guinea Corn (*Sorghum vulgare*). *Pakistan Journal of Food Sciences*, 22(2), 86-89.

RAMÍREZ, F., CUERVO, F. D., MERÁZ, M., TEXIER, A., TOMASINI, A., & VOLKE, T. (Noviembre de 2014). *Manual de prácticas de laboratorio Ingeniería Bioquímica*. Obtenido de Manual de prácticas de laboratorio Ingeniería Bioquímica: <http://www.izt.uam.mx/ceu/publicaciones/MIBQ.pdf> (fecha de consulta 21-07-2017)

DIVERSIDAD DE LÍQUENES FOLIOSOS Y FRUTICOSOS DE LA SIERRA GORDA DEL ESTADO DE GUANAJUATO

Antonio Isaac Ramírez Rojas¹ y Varinia López Ramírez²

RESUMEN

Los líquenes son organismos simbióticos conformados por un hongo, un alga y una levadura. Por su morfología los líquenes se pueden clasificar en crustosos, foliosos y fruticosos. Los líquenes son considerados biomonitores ambientales, ya que algunas especies tienen la capacidad de tolerar contaminantes, mientras que otras abaten su número frente a altas concentraciones de CO₂. Evaluar la distribución de especies líquénicas tolerantes o sensibles a contaminación permitirá determinar si una zona está o no impactada ambientalmente. En este trabajo, nos propusimos determinar la diversidad de líquenes foliosos y fruticosos localizados en un área natural protegida del estado de Guanajuato, con el fin de determinar la diversidad presente en un área no impactada. A partir del análisis de su morfología y respuesta química con KOH (10%), NaClO y sus combinaciones, HNO₃ (50%) y Lugol, encontramos 12 especies diferentes de líquenes foliosos y fruticosos, dentro de estos grupos destacan los géneros *Punctelia*, *Parmelia* y *Usnea*. La extracción de ADN de las muestras colectadas permitirá la caracterización molecular por medio de la amplificación de la región ITS, con el fin de obtener un catálogo molecular de especies distribuidas en Guanajuato.

ABSTRACT

The lichens are symbiotic organisms from by a fungus, an algae and a yeast. According lichens' morphology they can be classified in crustose, foliose and fruticose. Lichens are considered as biomonitors, due to some species have the ability to tolerate pollutants, while others tolerate high concentrations of CO₂. Evaluate lichen species distribution as tolerant or sensitive to contamination would determine whether or not an area is impacted. In this work, we determined the diversity of foliose and fruticose lichens located in a protected natural area of the state of Guanajuato, to determinate the diversity present in a non-impacted area. Through morphological analysis and chemical response with KOH (10%), NaClO and their combinations, HNO₃ (50%) and Lugol. We found 12 different species of foliose and fruticose lichens, of the genera *Punctelia*, *Parmelia* and *Usnea*. The DNA amplification of ITS region allow their molecular characterization, in order to obtain a molecular catalog of species found in Guanajuato.

Palabras clave: Diversidad de especies líquénicas. simbiosis, micobionte, fotobionte, caracterización molecular

INTRODUCCIÓN

Los líquenes son una asociación simbiótica entre un hongo denominado micobionte y un alga o cianobacteria, denominada fotobionte y una levadura (Spribille *et al.*, 2016). En esta asociación el hongo es el encargado del soporte al líquen formando un cuerpo vegetativo constituido en su mayoría por hifas, que protegen al fotobionte. La organización interna del talo líquénico se diferencia por como el fotobionte está distribuido en el micobionte, si se ubica a lo largo del talo líquénico se le conoce como homómero y si se encuentra el fotobionte agrupado en los márgenes del líquen se le llama heterómero (Hale, 1969).

Los líquenes se clasifican de acuerdo a la morfología del talo líquénico y por su asociación con el sustrato como: crustoso, este tipo de líquen crece unido íntimamente al sustrato, por lo general en las piedras y es muy difícil removerlo de las mismas; talo folioso, en este líquen el talo está solo unido en la superficie inferior por rizinas principalmente y presenta apariencia de hoja pequeña con lóbulos; talo fruticoso, donde el líquen presenta una especie de ramificaciones alargadas externas y el talo líquénico solo está unido por un pequeño segmento al sustrato (Thomas H. Nash, 2008).

MÉTODOS Y MATERIALES

Colecta de líquenes

Se realizó una colecta de líquenes foliosos y fruticosos en "Charco Azul" en el municipio de Xichú Guanajuato, tomando con una navaja una sección de 3 cm² aproximadamente del líquen, y se depositó en sobres de papel manila, etiquetándose con la clave AIRR de acuerdo a las letras iniciales de quien lo recolectó y enumerándolos por orden de muestreo. En cada caso se registraron las coordenadas correspondientes al sitio de colecta.

Identificación química de las especies

La identificación de las muestras colectadas procedió a partir de la descripción de sus características morfológicas y su reactividad ante diferentes sustancias químicas. Los líquenes pueden ser identificados con mayor facilidad ya que sintetizan metabolitos que al reaccionar con algunas soluciones, provocan un cambio sustancial de color y es posible su diferenciación, utilizando guías dicotómicas. Para las pruebas químicas se tomó un trozo de muestra y se colocó en una placa de porcelana horadada y se evaluó su reacción con hipoclorito de sodio (NaClO), hidróxido de potasio al 10% (KOH) y sus combinaciones, Lugol al 10% y ácido nítrico al 50%.

Extracción de ADN

Se realizó la extracción del ADN de acuerdo a la metodología usada por Park y col., (2014) con las siguientes modificaciones. En tubos eppendorf con perlas de vidrio se depositó un pedazo de líquen de 0.5 cm y se congeló a -20°C hasta su procesamiento. La lisis celular se llevó a cabo con la adición de 600 μL de solución reguladora de cloruro de potasio (100 mM de Tris HCl pH 8, 10 mM de EDTA pH 8 y 1 M KCl). Una vez realizada la lisis celular se le adicionaron 180 μL de cloroformo, mezclándose vigorosamente, posteriormente se centrifugó por 2 min. a 12000 rpm para separar las fases. La fase acuosa se recuperó en un tubo eppendorf nuevo y estéril, para posteriormente precipitar el ADN con una solución de isopropanol dejándola incubar a temperatura ambiente por 5 min., para posteriormente ser centrifugada por 2 min. a 12000 rpm. Finalmente, la pastilla obtenida se lavó tres veces consecutivas con etanol al 70% frío, centrifugándose cada vez 2 min. a 12000 rpm. La pastilla obtenida se dejó secar y re suspendió en solución TE 1X (10 mM de Tris HCl pH 8, 1 mM de EDTA pH 8). Las muestras de ADN se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa.

RESULTADOS

Se recolectaron un total de 83 muestras de líquenes foliosos y fruticosos en “Charco Azul” en Xichú (Figura 1).

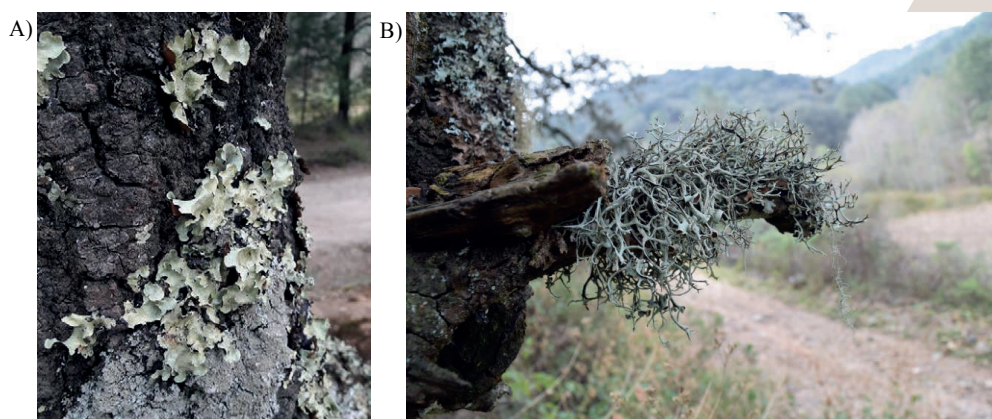


Figura 1. Especies de líquenes colectadas en “Charco Azul” en Xichú Guanajuato. A. Muestra de *Parmelia sulcata* en corteza de encino; B. Muestra de *Pseudoevernia furfuracea* sobre corteza de encino.

La colecta de las muestras abarcó puntos aledaños a la zona de recreo de “Charco Azul”, Figura 2.

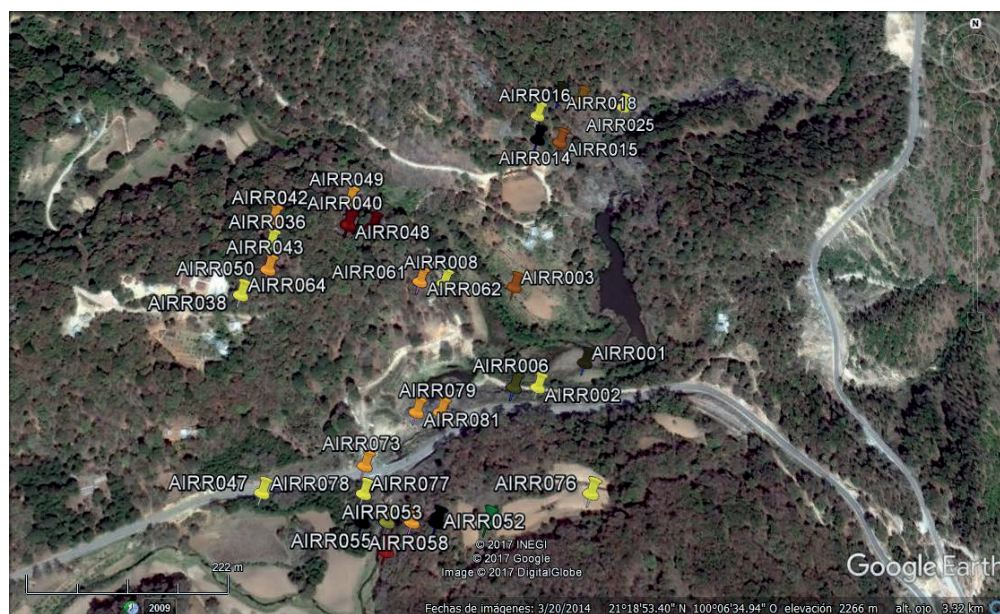


Figura 2. Mapa de distribución de los sitios de colecta de líquenes en “Charco Azul”

Para determinar la identidad de las especies colectadas, analizamos las características morfológicas de las muestras, así como la presencia y ubicación de estructuras reproductivas a lo largo de los talos líquénicos, además de evaluar su reactividad química. Los géneros identificados de indican en la Tabla 1, así como el número de muestras obtenidas por cada género, esto otorga un panorama de la diversidad líquénica presente en “Charco Azul”, ya que encontramos especies diversas con morfologías totalmente entre ellas, esto nos demostraría la calidad del aire en el lugar, ya que se considera como biomonitor a las especies pertenecientes que de acuerdo a sus funciones vitales en relación con el medio ambiente donde habitan presentan un cambio de color en el talo líquénico o en sus estructuras reproductivas (David *et al.*, 2005),

Tabla 1. Género de muestras de líquenes y número de cada una de ellas.

Especie	Número de muestras obtenidas	Tipo de talo
<i>Parmelia sulcata</i>	5	Folioso
<i>Parmelina pastillifera</i>	5	Folioso
<i>Pseudevernia furfuracea</i>	13	Fruticoso
<i>Punctelia borreri</i>	14	Folioso
<i>Punctelia reddenda</i>	6	Folioso
<i>Usnea subfloridana</i>	6	Fruticoso

Para obtener una identificación más precisa de las especies colectadas, se procedió a su caracterización molecular a partir de la extracción de ADN (Figura 3) y posterior amplificación y secuenciación de la región ITS.

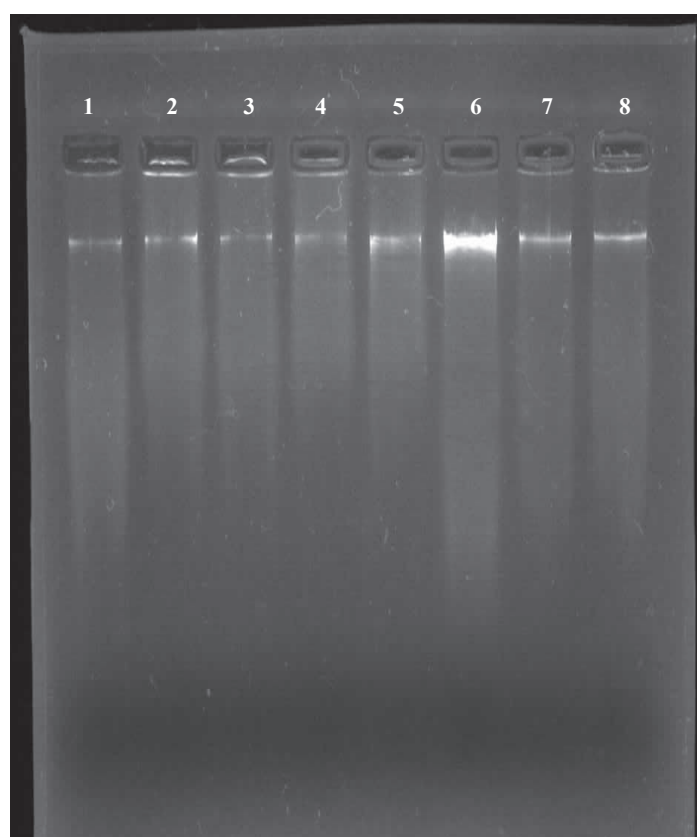


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa de muestras de ADN de las especies de líquenes colectadas, 1. *Punctelia reddenda* (AIRR018), 2. *Parmelia sulcata* (AIRR019), 3. *Punctelia borreri* (AIRR036), 4. *Usnea subfloridana* (AIRR037), 5. *Punctelia reddenda* (AIRR059), 6. *Punctelia borreri* (AIRR064), 7. *Parmelia pastillifera* (AIRR068), 8. *Parmelia pastillifera* (AIRR075)

CONCLUSIONES

La diversidad de líquenes foliosos y fruticosos encontrada en “Charco Azul” en el municipio de Xichú en Guanajuato es amplia gracias a las condiciones ambientales, la vegetación y características de la zona. Se observó que existen una mayor presencia de líquenes foliosos que fruticosos siendo una diferencia de cuatro géneros de líquenes foliosos y dos para fruticosos incluidos en este estudio. Las especies identificadas como *Parmelia*, *Punctelia*, *Usnea* mostraron que los líquenes foliosos y fruticosos son predominantes en la zona donde se colectaron las muestras, y estos ejemplares presentan diferencias morfológicas, fisiológicas y destacan por el potencial biotecnológico de sus metabolitos. A partir de este trabajo se sugiere realizar un catálogo de especies de líquenes distribuidos en áreas naturales protegidas del Estado de Guanajuato y comparar las especies presentes en las mismas, a fin de determinar aquellas especies que podrían ser empleadas en Guanajuato como biomonitores ambientales.

BIBLIOGRAFIA

- David L. Hawksworth, Teresa Iturriaga y Ana Crespo. (2005). Líquenes como bioindicadores inmediatos de contaminación y cambios medio-ambientales en los trópicos. *Iberoam Micol*, 22: 71-82
- Hale, M. E. (1969). *How to know the lichens* (first). USA: Wm. C. Brown Company Publishers.
- Park, S. Y., Jang, S. H., Oh, S. O., Kim, J. A., & Hur, J. S. (2014). An easy, rapid, and cost-effective method for DNA extraction from various lichen taxa and specimens suitable for analysis of fungal and algal strains. *Mycobiology*, 42(4), 311–316.
- Spribille Toby, Tuovinen Veera, Resl Philipp, Vanderpool Dan, Wolinski Heimo, Aime Catherin M., Scheider Kevin, Stabentheiner Edith, Toome-Heller Merje, Thor Göran, Mayrhofer Helmut, Johannesson Hanna, McCutcheon Jhon P. (2016). Basidiomycete yeasts in the cortex of ascomycete macrolichens. *Science*.
- Thomas H. Nash. (2008). *Lichen Biology* (second). Arizona: Cambridge University Press.

EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DE MOHOS Y LEVADURAS EN PRODUCTOS ACIDIFICADOS

Daniela Carolina González Quevedo¹ y Claudia Armas Garfías².

RESUMEN

En el presente trabajo se examinaron diferentes tipos de alimentos acidificados de estilo condimento para ensaladas con la finalidad de evaluar el crecimiento de mohos y levaduras y determinar la inocuidad de dichos productos respecto a estos parámetros. Para esto se hizo uso de la normatividad mexicana que rige la preparación y dilución de alimentos para su uso microbiológico y la normatividad mexicana que nos brinda la metodología para la cuenta del crecimiento de mohos y levaduras en alimentos; todo esto para evaluar la inocuidad y la relación de ella con su proceso productivo. Los resultados mostraron que los alimentos acidificados no derivados de mayonesa y lácteos se apegan más a los límites permisibles por la normatividad mexicana mientras que los derivados de mayonesa y lácteos no, concluyendo que pueda deberse a algún ingrediente que favorezca el crecimiento de los microorganismos.

ABSTRACT

In the present work, we examined different types of acidified foods in the condiment style for salads in order to evaluate the growth of molds and yeasts and to determine the safety of these products with respect to these parameters. For this, the Mexican regulations governing the preparation and dilution of food for microbiological use and the Mexican regulations that the methodology for the growth of molds and yeasts in food were used, all this to evaluate the innocuity and the relation of her with its productive process. The results showed that acidified foods not derived from mayonnaise and dairy conform more to the limits allowed by Mexican regulations, while the mayonnaise and dairy products do not, concluding that it may be due to some ingredient that favors the growth of microorganisms.

PALABRAS CLAVE

Mohos, levaduras, aderezos, vinagretas.

INTRODUCCIÓN

La contaminación fúngica de los alimentos es de gran interés, ya que gracias a esta actividad los alimentos se deterioran, se pudren y dañan a una gran cantidad de materia prima para la industria, incluso en algunos casos tienen la capacidad de producir micotoxinas, que son dañinas provocando infecciones, o reacciones alérgicas al ser vivo que lo consume. Debido a esto, es recomendable realizar evaluaciones microbiológicas periódicamente y de este modo conocer la calidad del producto y si estos se encuentran dentro de los parámetros de la normativa que los rige para su posterior consumo.

“Los mohos y levaduras están ampliamente distribuidos en la naturaleza y se pueden encontrar formando parte de la flora normal de un alimento, o como agentes contaminantes y en los equipos sanitizados inadecuadamente, provocando el deterioro fisicoquímico de éstos, debido a la utilización en su metabolismo de los carbohidratos, ácidos orgánicos, proteínas y lípidos originando mal olor, alterando el sabor y el color en la superficie de los productos contaminados. Además, los mohos y levaduras pueden sintetizar metabolitos tóxicos termo-resistentes, capaces de soportar algunas sustancias químicas, así como la irradiación y presentan capacidad para alterar sustratos desfavorables, permitiendo el crecimiento de bacterias patógenas. Es de gran importancia cuantificar los mohos y levaduras en los alimentos, puesto que, al establecer la cuenta de estos microorganismos, permite su utilización como un indicador de prácticas sanitarias inadecuadas durante la producción y el almacenamiento de los productos, así como el uso de materia prima inadecuada.” (NOM-111-SSA1-1994).

Los mohos y levaduras pertenecen al mismo grupo taxonómico (fungi), sin embargo, tienen aspectos totalmente distintos. Son microorganismos de gran importancia para el ser humano, ya que tienen la capacidad de dañar los alimentos descomponiéndolos rápidamente o perjudicar la salud de quien los consume, pero también pueden ser aprovechados para la industria de productos fermentados.

La contaminación de los alimentos por mohos y levaduras es un problema grave para la industria, debido a que prosigue la aparición de productos de baja calidad inaceptables para continuar con el proceso de producción. Dicha problemática es de gran escala debido a la pérdida económica que trae consigo dicha contaminación microbiana.

En el proceso de contaminación participan los hongos filamentosos, levaduras y bacterias, sin embargo, las levaduras juegan el papel secundario en el proceso de contaminación y descomposición de los alimentos, debido a esto se conoce que a ciertas condiciones se favorece el crecimiento de las levaduras que podrían llegar a ser dañinas después de su consumo.

En alimentos ácidos y en los de baja actividad de agua, los hongos filamentosos y las levaduras crecen con mayor rapidez que las bacterias provocando importantes pérdidas por alteración de frutas frescas, vegetales, quesos, productos derivados de los cereales, alimentos salazonados y encurtidos, así como en los alimentos congelados y en los deshidratados cuyo almacenamiento se realiza en condiciones inadecuadas. En alimentos no ácidos que conservan humedad, los hongos filamentosos y las levaduras crecen más lentamente que las bacterias y por ello pocas veces determinan problemas en tales alimentos. En los alimentos frescos y en los congelados, pueden encontrarse números reducidos de esporas y levaduras, pero su presencia en estos alimentos es de escaso significado. Las levaduras crecen más rápidamente que los hongos filamentosos, pero con frecuencia junto a ellos. Mientras que los hongos filamentosos son casi siempre aerobios estrictos las levaduras crecen tanto en presencia como en ausencia de oxígeno (González y Rodríguez, 1998).

Debido a esto, se puede prever que el crecimiento de hongos y levaduras en los alimentos acidificados de estilo condimento para ensaladas sea positivo, ya que estos son los productos en los que el crecimiento de dichos microorganismos se ve favorecido.

Es importante mencionar que el grupo de levaduras presentes en los alimentos que son capaces de dañar la salud es muy reducido. Sin embargo, la contaminación por levaduras es capaz de presentarse en alimentos y bebidas procesadas y almacenadas aun teniendo el buen manejo de la normatividad que beneficia dichas producciones.

Por tal motivo que nos es de gran interés evaluar el crecimiento de mohos y levaduras en los productos acidificados, de este modo pudiendo determinar la calidad de estos productos con respecto a la contaminación y si dichos productos son adecuados para el consumo humano. Incluso es importante realizar adecuadamente el método de cuenta en placa, el número de mohos y levaduras viables presentes en los alimentos acidificados de estilo condimento para ensaladas.

METODOLOGÍA

El procedimiento y material o equipo que se necesitó para la evaluación del crecimiento de mohos y levaduras en productos acidificados se llevó a cabo con base en las normas: NOM-110-SSA1-1994 Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico, NOM-111-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos y la Norma Mexicana NMX-f-341-NORMEX-2006 Especificaciones y métodos de prueba de alimentos y aderezos de mayonesa.

RESULTADOS

Se analizaron un total de 62 diferentes muestras de las cuales 19 son productos derivados de mayonesa y lácteos y 43 son productos no derivados de mayonesa y lácteos.

Es importante destacar que la norma que se utilizó como referencia para la evaluación de alimentos acidificados de estilo condimento para ensaladas es la Norma Mexicana NMX-f-341-NORMEX-2006 en la cual se describe que el límite máximo de presencia de levaduras es de 50 UFC/ml y para presencia de hongos el límite es de 20 UFC/ml.

Teniendo un total de 19 diferentes muestras de productos derivados de mayonesa y lácteos, de las que, para la evaluación de levaduras, 18 están fuera de los límites permisibles por la norma y sólo 1 muestra cumple con dichos límites, mientras que, para la evaluación de hongos, 16 están dentro del rango permisible y solo 3 muestras no cumplen con la norma.

Para el análisis de productos no derivados de mayonesa y lácteos se trabajó con 43 muestras de las que, para la evaluación de levaduras, 36 muestras resultaron cumplir con la norma correctamente y 7 muestras sobrepasan el límite que permite la norma, mientras que, para la evaluación de hongos, 42 muestras cumplen con los rangos permisibles y solo 1 muestra sale del rango que marca la norma.

DISCUSION

Como bien sabemos, los mohos y levaduras son microorganismos que podemos ver fácilmente creciendo en un pedazo de pan que olvidamos en la alacena o incluso utilizándolos para generar productos como la levadura para la producción de la cerveza, sin embargo, el crecimiento de estos microorganismos puede ser muy dañino para el ser humano; en este trabajo se evaluó el crecimiento de dichos microorganismos, se pudo visualizar y saber si los aderezos y vinagretas que analizamos cumplen con la normatividad mexicana que los rige.

En el caso de los productos no derivados de mayonesa y lácteos se obtuvieron resultados favorables, ya que muy pocas muestras son las que salieron del rango permitido por las normas. Puede pensarse que esto tiene relación con el método de conservación de alimentos llamado escabechado el cual se conservan los alimentos por medio de un concentrado de vinagre en el cual se propone un medio de pH bajo que detiene el crecimiento de microorganismos indeseables en el alimento. Como bien sabemos el principal ingrediente de los productos no derivados de mayonesa y lácteos, es el vinagre. Por lo tanto, puede entenderse que el vinagre es el principal agente que detiene el crecimiento de mohos y levaduras en algunos de estos productos.

Por otro lado, los productos derivados de mayonesa y lácteos tuvieron mayor número de muestras en las que crecieron mohos y levaduras, en este caso podemos pensar que se debe a la preparación y a los ingredientes que estos productos requieren. Algunos productos derivados de mayonesa y lácteos contienen emulsiones de huevo, mayonesa y/o productos lácteos, en los cuales el crecimiento de microorganismos se ve beneficiado, ya que, en el almacenaje de dichos productos, no llevan refrigeración ni algún tratamiento térmico en su preparación que brinde conservación prolongada al producto, lo cual permite el crecimiento exponencial de microorganismos.

Sin embargo, así como en los productos no derivados de mayonesa y lácteos el vinagre ayuda a su conservación, también en estos productos existen especias como la sal o algún tipo de aditivo o modificación de empaquetado que en dichos productos acidificados pueden ayudar a evitar el crecimiento de mohos y levaduras y así brindar mayor calidad al producto.

CONCLUSIÓN

Es de gran importancia la continuación de la evaluación de productos alimenticios con respecto a crecimientos de mohos y levaduras debido al daño que pueden causar al ser humano después de ser consumidos.

Como resultado de la investigación presente, es posible concluir que el crecimiento de mohos y levaduras en productos derivados de mayonesa y lácteos es mucho mayor a comparación del crecimiento que hubo en el análisis de los productos no derivados de mayonesa y lácteos.

Podemos saber que dicha contaminación pueda derivarse de su método de preparación, ya que productos son solo emulsiones sin un proceso térmico que respalde la esterilidad del producto, incluso el almacenaje y manipulación pueden poner en riesgo el producto si no se tienen los cuidados que estos requieren.

Por tal motivo es esencial darle seguimiento con este tipo evaluaciones a los productos que consumimos y verificar que tanto se apega la industria productora a la normatividad mexicana que los rige, para su posterior venta al consumidor.

BIBLIOGRAFÍA

NOM-110-SSA1-1994 Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

NOM-111-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.

NMX-f-341-NORMEX-2006 Especificaciones y métodos de prueba de alimentos y aderezos de mayonesa.

Óscar González Benito y Luis Rodríguez Domínguez. (1998). “Recuento de Hongos Filamentosos y Levaduras Apartados de este ejercicio”. de Fundación general de la Universidad de Salamanca. Consultada en http://coli.usal.es/web/demo_alteracion/RtoHongosLev/RtoHongosLev.html (Fecha de consulta 05-07-17)

HUMEDALES ARTIFICIALES PARA EL TRATAMIENTO DE AGUAS CONTAMINADAS CON FIPRONIL.

González Cendejas Diego Armando¹ y Cisneros Almazán Rodolfo²

RESUMEN

En el presente documento se analizó el trabajo de remoción de dos humedales artificiales de flujo sub-superficial compuesto de dos etapas con un sustrato primario diferente en cada humedal, ubicado en forma horizontal ya que esto nos permitirá un mayor tiempo de contacto y es la forma más eficaz de remover contaminantes. La etapa primaria constituida por zeolita y escoria respectivamente como sustrato y la etapa secundaria con un medio poroso a base de carbón activado comercial como sustrato. Para aumentar el tiempo de residencia y contacto del agua residual con los componentes del humedal, se introdujo una recirculación que abarca ambas etapas del humedal, todo esto con el objetivo de remover contaminantes emergentes presentes en aguas residuales tales como el Fipronil, obteniéndose como resultado un porcentaje de adsorción de 77.76% y escoria con un porcentaje de adsorción 42.16%.

ABSTRACT

This paper analyzed the work of removal of two sub-surface artificial wetlands composed of two stages with a different primary substrate in each wetland, located horizontally as this will allow a longer contact time and is the form More effective to remove contaminants. The primary stage consisting of zeolite and slag respectively as substrate and the secondary step with porous medium based on commercial activated carbon as substrate, to increase the residence time and contact of the waste water with the components of the Wetland, a recirculation was introduced that encompasses both stages of the wetland, all with the objective of removing emerging contaminants present in wastewater such as Fipronil. As a result, a percentage of adsorption of 77.76% and slag with a percentage of adsorption 42.16% was obtained.

Palabras clave: Humedal, Fipronil, Sustratos.

INTRODUCCIÓN

Los humedales son áreas que se encuentran saturadas por aguas superficiales o subterráneas con una frecuencia y duración tales, que sean suficientes para mantener condiciones saturadas. Suelen tener aguas con profundidades inferiores a 60 cm con plantas emergentes como espadañas, carrizos y juncos. La vegetación proporciona superficies para la formación de películas bacterianas, facilita la filtración y la adsorción de los constituyentes del agua residual, permite la transferencia de oxígeno a la columna de agua y controla el crecimiento de algas al limitar la penetración de luz solar. (Roig, 2016)

Se ha estudiado la remoción de contaminantes en filtros con arcillas (Eguía, 1998), gravas y posteriormente se han ido sumando distintos tipos de medios filtrantes a los estudios tales como cáscara de coco, grava, aserrín, arena, carbón vegetal, carbón activado, entre otros. Los cuales alcanzaron variados niveles de eficiencia removiendo sulfuros, arsenito, entre otros contaminantes dependiendo del medio estudiado (Elizondo & Herrera, 2012) (Daus, Wennrich, & Weiss, 2004). El compuesto Fipronil es un insecticida perteneciente a la familia de los fenilpirazoles sintetizado por la compañía Rhône-Poulenc en 1987 e introducido en 1993 en el mercado europeo (The British Crop Protection, 2000) y registrado en Estados Unidos de América en 1996 (Ware, 2000). En países como México han aprobado formulaciones de Fipronil como termiticidas de elección. el uso de este insecticida se da para el combate contra la plaga de la langosta (Tingle et. al., 2000).

Fipronil puede ser formulado en distintas composiciones como sólido (ej. Cebo para insecto; White, 1998), aerosol líquido o como producto granular (ej. aplicación en césped; U.S. EPA, 1996). La importancia de la composición radica en la influencia del destino ambiental del compuesto, esto lo sustenta Ngim y Crosby (2001) que encontraron que el producto granular de Fipronil fue más persistente que otras formulaciones en agua, con un tiempo de vida media de 125 h y en suelo de 438 h. El amplio espectro de Fipronil contra diferentes plagas permite utilizarlo en el ámbito urbano y agrícola. En México es utilizado para la protección de diversos cultivos agrícolas contra la plaga conocida como langosta, esto en base a estudios de (SAGARPA) y del (INIFAP) que evaluaron la efectividad de diversos insecticidas empleados contra dicha plaga valorando: el intervalo de seguridad y toxicidad

Se ha reportado que en el medio ambiente Fipronil se degrada a cuatro compuestos: Fipronil sulfona, Fipronil sulfuro, Fipronil desulfínil y Fipronil amida. Los productos de degradación presentan características diferentes al compuesto inicial por ejemplo F. sulfona, F. sulfuro y F. desulfínil tienen un Koc de 4209, 2719 y 1290 mL/g respectivamente y son clasificados como moderadamente adsorbidos al suelo por lo que es poco probable encontrarlo en aguas subterráneas. Por otro lado, F. amida presenta un Koc de 166 mL/g y se encuentra como débilmente adsorbido al suelo. (FAO/WHO, 2001).

En el presente estudio se propone la remoción del plaguicida fipronil en agua a través de un humedal artificial compuesto por un sustrato de zeolita y escoria metalúrgica como etapa primaria y llevándose el flujo de agua a una etapa secundaria compuesta por carbón activado comercial. El fipronil fue sometido a un cambio que consiste en dejarlo reposar en agua desionizada por dos horas con cuarenta minutos para provocar que este se convierta en un compuesto que se puede encontrar con más facilidad y comúnmente en la naturaleza como fipronil amida que es lo que esperamos encontrar al final del proceso de filtrado. El carbón activado comercial a su vez fue sometido a diversas pruebas químicas para conocer su punto de carga cero con el objeto de que la suma de los pH sea igual a cero y la cantidad de sitios activos básicos y ácidos para conocer su afinidad para la remoción de cationes y aniones presentes en el agua contaminada.

MÉTODOS Y MATERIALES

En la elaboración del humedal se valoraron las condiciones presentes en nuestro sistema como es el tiempo de retención del agua en el humedal, la concentración del contaminante emergente en el agua, ubicación y diseño de nuestro humedal para la obtención de mejores resultados, se utilizó una tina de plástico grueso con las siguientes medidas: 82.5 cm de ancho, 60 cm de largo y 32.5 de altura con una pendiente del 1 %, se puso sustrato hasta una medida de 13.5 cm para asegurar un flujo sub-superficial y con esto el contacto adecuado con los elementos del humedal. La construcción del humedal comenzó con la elaboración del sistema de tubería que nos daría el efluente sobre el sustrato en la tina logrando así una mejor distribución del líquido, posteriormente se le adaptó una llave de salida que nos sirve para la toma de muestra y a su vez el paso del fluido hacia nuestro tratamiento secundario a base carbón activado, de igual manera se adaptó una tubería de salida hacia un balde de retención de agua donde esta se recirculó hacia la tubería de entrada del líquido al sistema. La elección de los sustratos se hizo en base a estudios realizados con anterioridad en humedales del mismo laboratorio. La zeolita y la escoria metalúrgica fueron seleccionados y sometidos a prueba de componentes que consiste en dejar reposar 50g de los materiales en agua desionizada y a la vez en agua de grifo durante un lapso de 24 horas para así tener un punto de comparación, pasadas las 24 horas se tomaron 10 ml de cada muestra y se pasó a realizar el estudio en un espectrofotómetro de luz infrarroja, determinándose así que elementos componían nuestros sustratos con el fin de conocer si algún elemento pudiera intervenir con nuestros resultados (*Cuadro 1 y 2*). Se realizaron dos estudios específicos al carbón activado, el primero llamado punto de carga cero que consiste en verter 100ml. de agua desionizada en un vaso de precipitado de 250ml y calentar por 20 minutos para retirar el dióxido de carbono presente en la solución, se pesaron .5 g de carbón activado comercial y se colocó en el agua desionizada previamente calentada y se sometió a un proceso de agitación durante 48 horas continuas a temperatura ambiente y se midió el PH y se obtuvo de 7.25. La segunda prueba realizada al sustrato del tratamiento secundario es la prueba de sitios activos que consiste en pesar 1g. de carbón activado comercial y colocarlo en tubo falcón aforando hasta 50 ml. con HNO_3 1 M y dejar reposar durante 5 días a una temperatura ambiente, se hizo lo mismo para sitios ácidos pero esta vez aforando a 50ml. en el tubo falcón con NOH .1 M y en consiguiente se realizó la titulación monitoreando los cambios de PH y se determinaron la cantidad de sitios activos ácidos y básicos que conforman al carbón activado comercial utilizando la herramienta Excel de office se realiza una gráfica con los resultados de la titulación graficando ml contra PH de cada sustancia, de estos datos se obtuvo la primera y segunda derivada y de igual manera se grafican estos datos contra los ml., de la gráfica de la segunda derivada se toma el valor del eje de las x por donde pasa la variación más grande y esta se introduce en la formula con los datos ya señalados con anterioridad. (figura 3 y 4). Posteriormente, se añadieron 30 litros de agua de grifo a cada humedal respectivamente; El fipronil comercial se encuentra a una concentración de 200 g/L que es lo mismo a 200,000 ppm, por motivos de lectura del espectrofotómetro de luz uv visible se tuvo que utilizar una concentración mayor a 100 ppm ya que esa es la mínima cantidad de concentración a la que mide el espectrofotómetro. se preparó una solución a 250 ppm lo que nos dio un total de 37.5 ml de fipronil aforado en 1 L de agua previamente basificada con hidróxido de sodio para obtener un ph básico mayor a 12 para acelerar el proceso de transformación a fipronil amida y con el objeto de obtener las ppm deseadas para los 30 L., se le agregó 500 ml. de esta sustancia contaminante preparada a cada humedal teniendo una concentración final de 125 ppm en cada humedal de la sustancia contaminante; El flujo es libre hacia el tratamiento secundario a base de medio litro de carbón activado comercial teniendo un tiempo de residencia de 5 días, para evaluar las condiciones de remoción obtenidos, se obtuvo la línea base y de acuerdo con ella se realizó una curva de calibración (Figura 5) con diluciones de 5,10,15,20 y 25 ppm a partir de la solución preparada a 125 ppm (control),posteriormente se midieron las muestras del efluente del humedal de los 3 y 5 días (cuadros 3 y 4), obteniéndose así el porcentaje de adsorción de cada sustrato.

RESULTADOS

Las siguientes figuras (figura 1 y 2) muestran el funcionamiento y diseño de los humedales artificiales de flujo sub-superficial compuestos por sustratos (zeolita y escoria metalúrgica) , tuberías y una recirculación a base de una bomba sumergible en el punto final del proceso.



Figura 1. Humedal con Zeolita como sustrato.



Figura 2 Humedal con Escoria como sustrato.

(*Cuadro 1 y 2*). Los resultados de las pruebas de componentes realizadas a los sustratos son las siguientes:

Cuadro 1. Componentes de la Zeolita

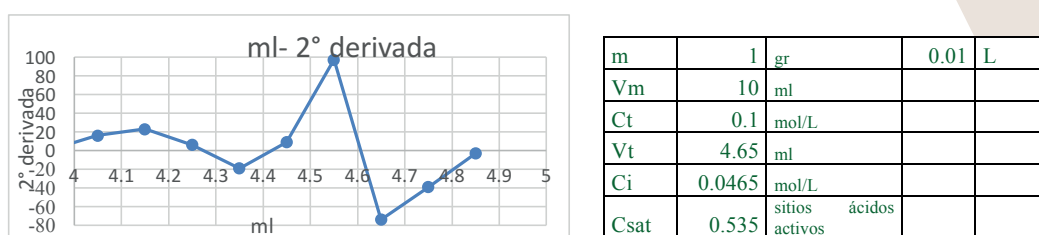
Agua Desionizada

Cuadro 2. Componentes de la Escoria metalúrgica.

Elemento	Resultados	Grifo	Desionizada	Grifo
Arsénico	1.53 mg/L	Resultados	Elemento	Resultados
Aluminio	.104 mg/L	.487mg/L	Arsénico	0.004 mg/L
Carbón orgánico	64 mg/L	.034 mg/L	Aluminio	-0.006 mg/L
Cadmio,Ditizona	19.3 mg/L	27 mg/L	Carbón orgánico	13 mg/L
DQO, RA	486 mg/L	46 mg/L	Cadmio,Ditizona	-0.7mg/L
Dureza, Ca	1.33 mg/L	124 mg/L	DQO, RA	-10mg/L
Manganeso,RA	2.9 mg/L	0.64 mg/L	Dureza, Ca	-0.05 mg/L
N total, RA	81 mg/L	1.3 mg/L	Manganeso,RA	-0.1 mg/L
Oxígeno,dis, RA	23 mg/L	39 mg/L	N total, RA	-3 mg/L
Potasio	19 mg/L	1.3 mg/L	Oxígeno,dis, RA	-0.1 mg/L
Sulfato	13 mg/L	1.3 mg/L	Potasio	0 mg/L
Cloro	0.32 mg/L	7 mg/L	Sulfato	0 mg/L
		0.08 mg/L	Cloro	-0.02 mg/L

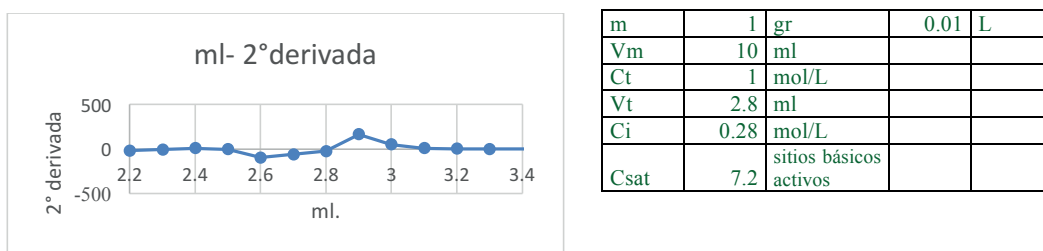
Los resultados arrojados por las pruebas de sitios activos ácidos presentes en el carbón, nos indican la presencia de estos sitios que muestran una afinidad por cationes.

Figura 3. Sitios ácidos, usando 1 M NaOH



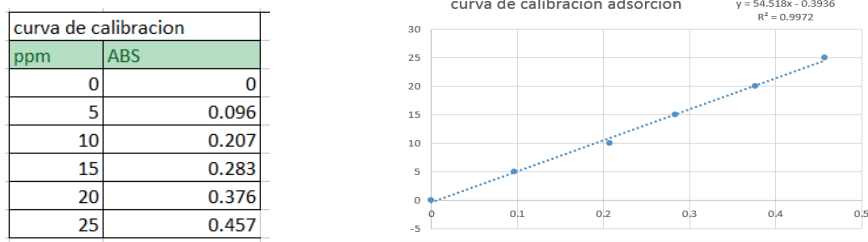
Los resultados arrojados por las pruebas de sitios activos básicos presentes en el carbón, nos dieron por resultado la presencia de estos sitios lo que nos indica que existe una afinidad por aniones.

Figura 4. Sitios básicos, usando base 1 M HCL



La curva de calibración se hizo con el objeto de interpolar los resultados obtenidos de las muestras tomadas de los días 3 y 5.

Figura 5. Curva de calibración



Las mediciones realizadas en el tercer y quinto día nos dieron por resultado una buena remoción del contaminante por parte del sustrato Zeolita y una en menor cantidad por parte del sustrato Escoria metalúrgica, lo que nos da un punto clave en próximos estudios.

Cuadro 3. Resultados medición al tercer día.

ppm	blanco	escoria	zeolita
	0.178	0.13	0.444
ppm curva	9.310604	6.69374	23.81239
ppm reales	93.10604	66.9374 (1:10)	23.81239
% remoción	100%	28.10%	74.42%

Cuadro 4. Resultados medición al quinto día

ppm	escoria	zeolita
	0.106	0.387
ppm curva	5.385308	20.70487
ppm reales	53.85308 (1:10)	20.70487
% remoción	42.16%	77.76%

CONCLUSIONES

Indicar de Los humedales artificiales fueron contruidos con éxito y como resultado obtuvimos un índice de remoción del contaminante emergente del 77.76% por parte de la Zeolita y un 42.26% (1:10) de remoción por parte de la escoria metalúrgica lo que nos da pauta para estudios posteriores añadiendo otros elementos al humedal como son las plantas y teniendo en cuenta que estos niveles de remoción pueden estar sujetos a cambios por los niveles de saturación de los sustratos.

BIBLIOGRAFIA

1. DAUS, B., WENNRICH, R., & WEISS, H. (2004). Sorption materials for arsenic removal from water: a comparative study. *Water research*, 12(38), 2948-2954
2. EGUÍA. (1998). Uso de arcillas en la eliminación de iones metálicos por filtración. Monterrey: universidad autónoma de nuevo león.
3. ELIZONDO, A., & HERRERA, E. (2012). Evaluación de medios filtrantes para la reducción de Sulfuro de hidrógeno en el mejoramiento de la calidad del biogás. Honduras: Departamento de ambiente y desarrollo.
4. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA) (1996). New pesticide fact sheet –fipronil. Epa 737-f-96-005. Office of prevention, pesticides and toxic substances, washington d.c.
5. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION/ WORLD HEALTH ORGANIZATION (FAO/WHO). (2001). Pesticide residues in food. Report of the 2001 joint fao/who meeting on pesticides residues, geneva.
6. NGIM, K., Y CROSBY, D. (2001). Abiotic processes influencing fipronil and desthiofipronil dissipation in california, usa, rice fields. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20, 972-977.
7. ROIG (2016). Eliminación de contaminantes emergentes mediante Humedales Artificiales como sistema alternativo o complementario a un tratamiento de aguas convencional. Artículo recuperado de <http://www.ingenieria.com>
8. THE BRITISH CROP PROTECTION. (2000). The pesticide manual. Surrey, u.k.: c. D. S. Tomlin.
9. TINGLE, C., ROTHER, J., DEWHURST, C., LAUER, S., & KING, W. (2000). Health and environmental effects of fipronil. Recuperado el 5 de julio del 2017, de pesticides network uk: <http://www.pan-uk.org/publications/briefing/fipronil.pdf>
10. WARE, G. W. (2000). The pesticide book. (5 ed.). Fresno, ca: thomson publications
11. WHITE, G. L. (1998). Control of the leaf-cutting ant *acromyrmex octospinosus* (reich.) And *atta cephalotes* (l.) (formicidae, attini) with a bait of citrus meal and fipronil. *Int. J. Pest. Manag.*, 44, 115-117.

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE AISLADOS BACTERIANOS DE GUANAJUATO.

Elizabeth Mendoza Bravo¹ y Juan Gualberto Colli Mull².

RESUMEN

Una gran diversidad de rizobacterias, entre las cuales encontramos PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria), las brindan efectos benéficos a las plantas en su desarrollo. El objetivo del proyecto, es explorar la diversidad de rizobacterias y realizar pruebas bioquímicas y moleculares, para poder determinar los microorganismos que puedan pertenecer al grupo de PGPR, y de este modo poder ser aprovechadas. Los análisis se hicieron con aislados provenientes del área natural protegida Xichú y Sierra de Lobos, Gto. Los análisis bioquímicos realizados fueron la producción de auxinas y la solubilización de fosfatos, los cuales nos mostraron 15 organismos positivos para ambas pruebas. Posteriormente se realizaron análisis moleculares, de los cuales se llevaron a cabo las técnicas de PCR y ARDRA, para obtener un dendograma con las relaciones filogenéticas, lo que muestra la relación que existe entre los microorganismos analizados.

ABSTRACT

A great diversity of rhizobacteria, among which we find PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria), offer beneficial effects to the plants in their development. The objective of the project is to explore the diversity of rhizobacteria and to perform biochemical and molecular tests to determine the microorganisms that may belong to the PGPR group and thus be exploited. The analyzes were made with isolates from the protected natural area xichu and sierra de lobos, gto. The biochemical analyzes were the production of auxins and the solubilization of phosphates, which showed us 15 positive organisms for both tests. Subsequently, molecular analyzes including PCR and ARDRA techniques were performed to obtain a dendogram with phylogenetic relationships, which shows the relationship between the analyzed microorganisms.

Palabras clave: PGPR, producción de auxinas, solubilización de fosfatos, PCR, ARDRA.

INTRODUCCIÓN

Los ecosistemas terrestres han sido, el sustento y abrigo de diferentes especies a lo largo del tiempo, formando una gran diversidad, asociada también a las condiciones climáticas y topográficas (Elvira, 2006 y SEMARNAT, 2009; Trucíos et al, 2011). El estado de Guanajuato cuenta con condiciones naturales privilegiadas, como su localización, relieve y clima, lo cual contribuye a presentar una gran diversidad biológica, la cual integra los ecosistemas, sostienen su funcionamiento y contribuyendo a la variabilidad genética (CONABIO y IEE, 2015). En este estado se encuentran la Sierra de Lobos, situada al norte de León Gto., presenta clima templado subhúmedo con lluvias en verano, con precipitación media anual de 700 mm y temperatura media anual de 16- 18°C, con una vegetación de bosque de encino, encino-pino y matorral xerófilo (SEMARNAT, 2001; Vázquez et al, 2004). Dentro de este estado también se localiza Xichú el cual, se encuentra dentro de sierra gorda, siendo un terreno montañoso, presenta un clima subtropical a templado, una precipitación de 617 mm anuales, temperatura media de 18°C, la flora está integrada por bosque de encino y pino, matorral y nopalera (INAFED, 2015).

El suelo cuenta con una gran diversidad de microorganismos, estos son un factor importante en la formación del suelo (Kloepper et al., 1978; Glick, 1995; Glick, 1999; Gómez et al, 2012). La rizósfera de las plantas es la zona con mayor actividad microbiana, algunas bacterias habitan esta zona, las cuales son conocidas como rizobacterias (Walker et al, 2003; Ángeles y Cruz, 2015). Las rizobacterias, Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR), proporcionan efectos benéficos sobre el desarrollo de la planta y pueden afectar benéficamente su crecimiento (Dardanelli et al, 2011; Atieno et al, 2012; Ángeles y Cruz, 2015). Las PGPR participan en la transformación de compuestos orgánicos y minerales, e influyen en el contenido y la movilidad de los macro y microelementos, así como en su balance y asimilación por las plantas (Morell y Hernández, 2008; Soto et al, 2012); ayudan al desarrollo de las plantas (Wolfe y Klinomoros, 2005); estimulan la germinación de las semillas y el enraizamiento; y protegen a las plantas del estrés hídrico y abiótico (Acuña et al, 2006; Soto et al, 2012); estas bacterias pueden contribuir en esas funciones de las plantas ya que (i) producen o cambian la concentración de reguladores de crecimiento (Arshad y Frankenberger, 1993; Ahmad et al, 2008), (ii) fijan asimbióticamente el N₂ (Boddey y Dobereiner, 1995; Ahmad et al, 2008), (iii) presentan antagonismo contra microorganismos fitopatógenos (Scher y Baker, 1982; Ahmad et al, 2008) o antibióticos (Shanahan et al., 1992) (iv) solubilizan fosfatos minerales y otros nutrientes (De Freitas et al., 1997, Gaur, 1990; Ahmad et al, 2008). Por lo cual el objetivo del presente proyecto, es explorar la diversidad microbiana del suelo y realizar pruebas bioquímicas y moleculares, para poder determinar los microorganismos que puedan pertenecer al grupo de PGPR, y de este modo poder ser aprovechadas.

MÉTODOS Y MATERIALES

Se seleccionaron 32 aislados del cepario perteneciente al ITESI (Instituto Tecnológico Superior de Irapuato), otorgados por el Dr. Juan Gualberto Colli Mull, de los cuales se tomaron 18 aislados provenientes de Xichú, Gto. pertenecientes a la rizósfera de helechos (Ori 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18), originarios de Sierra de Lobos, Gto., 6 de matorral (444, 445, 446, 447 448, 449) y 8 de pino (465, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475).

Reactivación de los aislados.

Se inocularon 100 µL de las bacterias en medio líquido LB (Luria Bertani). Se incubaron a 37°C por 48 horas, con una agitación de 120 rpm. Posteriormente se tomaron 1.5 µL de medio LB inoculado, se centrifugo a 5000 rpm/ 5 min, se

decantó, y se repitieron los tres pasos anteriores., se agregaron 500 µL PBS 1x, se centrifugo a 5000 rpm/ 5 min, se decantó y se resuspendió la pastilla en 200 µL de PBS 1x.

Producción de auxinas.

Las auxinas son fitohormonas que inducen el alargamiento y enraizamiento de las plantas, ya que promueven la división celular (Franhenberger y Arshad, 1995; Castillo et al, 2007). Se preparó un medio líquido el cual contenía glucosa, extracto de levadura, triptófano y H₂O, en el cual se colocaron 10 µL de las muestras por cada 100 µL de medio, se incubaron a 37 °C en un lugar oscuro por una semana. Para el revelado de las auxinas se agregó una solución de ácido perclórico 35% y FeCl₃ (1:1).

Solubilización de fosfatos.

El fósforo (P) es un macronutriente fundamental para el crecimiento de las plantas. La mayoría de las reservas en el suelo son insolubles (Kauwenbergh, 2010; Restrepo et al, 2015). Se elaboró el medio Pikouskaya utilizando como fuente de fósforo fosfato tricálcico (Ca₃(PO₄)₂), en el cual se colocaron 10µL de muestra y se incubaron a 37 °C.

Extracción de ADN genómico.

La extracción de ADN es un proceso por el cual hay una separación del DNA de los demás elementos celulares. Los pasos necesarios para una correcta extracción y purificación del ADN, son la lisis de las células, degradación de la fracción proteica asociada al ADN y la purificación (Microbial, 2009). La extracción de ADN se realizó mediante la técnica de lisis alcalina. Se tomaron 1.5 µL del medio LB inoculado, se centrifugo a 10000 rpm/ 3 min, para la formación de una pastilla. Se añadió 300 µL de solución de lisis (Buffer Tris HCl pH8 1 M y Buffer EDTA 0.1 M) y se resuspendió. Se agregó SDS al 1% y de nuevo se homogenizaron en tubos con perlas. Para realizar la digestión del RNA se añadió 1 µL de RNAasa al lisado celular, se mezcló y se incubó a 37°C por 10 min, se homogeneizó. Después para la desnaturalización se añadieron 200 µL de Acetato de sodio, se centrifugo a 10000 rpm/ 5 min, se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo. Se añadió un volumen de fenol-cloroformo-isomilico (fenol 25 ml/ cloroformo 24 ml/ isomilico 1 ml). Se centrifugo a 10000 rpm/ 10 minutos, se colectó la parte orgánica y se colocó en otro tubo. A lo que se recuperó se le agregaron 2 volúmenes de Etanol absoluto, se centrifugo nuevamente a 12000 rpm durante 30 min, se decantó, se añade 1 ml de Etanol al 75%. Se volvió a centrifugar a 12000 rpm por 10 minutos, se decanta. Se dejó secar a temperatura ambiente por 10 minutos. Por último se agregan 30 µL de agua Mili-Q, para la hidratación de DNA y se almacena a -20°C hasta su uso.

PCR.

La reacción en cadena de la polimerasa, es una reacción enzimática amplifica millones de veces una secuencia de ADN durante varios ciclos, con una enzima conocida como ADN polimerasa (Tamay et al, 2013). Para esta técnica cada tubo Eppendorf de 1 ml debe contener una mezcla de 25 µL, los cuales son 2.5 µL de Supermix (polimerasa, buffer, cofactor MgCl₂, dNTP'S), 1 µL de Oligo directo F27, 1 µL de Oligo reverso I492, 1 µL de extracción de ADN y 19.5 µL de agua Mili-Q. Después los tubos se dejaron en un termociclador. Con el programa 16 bacteria, el cual consistió en 105 °C para calentar la tapa, 1 ciclo a 95°C para la desnaturalización inicial, 35 ciclos a 94°C, 53°C, 72°C y por último un ciclo a 72°C, para que la Taq termine de sintetizar todos los fragmentos, el proceso tiene una duración de 3 horas y media. Los productos fueron separados en una electroforesis de agarosa al 1%.

ARDRA.

El análisis de restricción del DNA ribosomal 16S amplificado (ARDRA), es una técnica molecular basada en la prueba de polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción del gen 16S ribosomal amplificado (Mendoza et al, 2008). Para la restricción cada tubo Eppendorf de 1.5 ml debe contener una mezcla de 20 µL, el cual contiene 10 µL de producto de PCR, 0.3 µL de RSA I, 0.3 µL de Hind II, 2 µL de Buffer Tango 10x y 7.4 µL de agua Mili-Q. Se incubaron a 37 °C por 3 horas, después de dejaron por 10 minutos a 65°C, para que la enzima dejara de cortar. Se preparó gel de agarosa al 2.5 % con TAE 1X (base tris, ácido acético y EDTA), por 3 horas a 90 Voltios.

RESULTADOS

El proyecto se comenzó con 33 aislados, dado que algunos aislados no crecieron en el medio LB, los análisis se realizaron con 27 aislados, 14 de helechos (ori 2, 3, 4, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18), 5 de matorral (444, 445, 446, 448, 449) y 8 de pino (465, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475). Con los cuales se realizaron las pruebas bioquímicas y moleculares. En la tabla 1, se observan los resultados de las pruebas bioquímicas, en la cual se encuentran 15 organismos (55.55%) positivos para ambas pruebas, 11 microorganismos (40.74%) positivos solo para alguna de las actividades y solo 1 (3.7%) negativo para ambas.

Tabla 1. Resultados de las pruebas de la producción de auxinas (poco x, medio xx, mucho xxx, nada -) y de la solubilización de fosfatos (✓).

# Bacteria.	Positivo	Negativo
444	✓ x	
445	✓ -	
446	✓ x	
448	✓ -	
449	✓ x	
465		✓ xx
469	✓ x	

470		$\sqrt{x}$
471	$\sqrt{x}$	
472	$\sqrt{-}$	
473	$\sqrt{x}$	
475	$\sqrt{xx}$	
479	$\sqrt{-}$	
Ori 2	$\sqrt{-}$	
Ori 3	$\sqrt{x}$	
Ori 4	$\sqrt{-}$	
Ori 7	$\sqrt{x}$	
Ori 8	$\sqrt{x}$	
Ori 10		$\sqrt{-}$
Ori 11	$\sqrt{-}$	
Ori 12	$\sqrt{x}$	
Ori 13	$\sqrt{-}$	
Ori 14	$\sqrt{x}$	
Ori 15	$\sqrt{x}$	
Ori 16	$\sqrt{xx}$	
Ori 17	$\sqrt{x}$	
Ori 18		$\sqrt{x}$

El gel de agarosa se observó en un transluminador con base de luz azul, del cual se obtuvieron imágenes. Las fotografías se leyeron con el programa llamado CLIQS 1D Pro. La finalidad del programa es detectar los carriles y las bandas, dando como resultado un dendograma. En la figura 1 se observa el resultado de la digestión, en el cual se pueden apreciar distintas bandas relacionadas con los fragmentos de DNA y su peso molecular, algunas bandas son menos visibles, puesto que no fueron digeridas correctamente. En cuanto a la figura 2 se muestra la relación filogenética que existe entre los aislados.

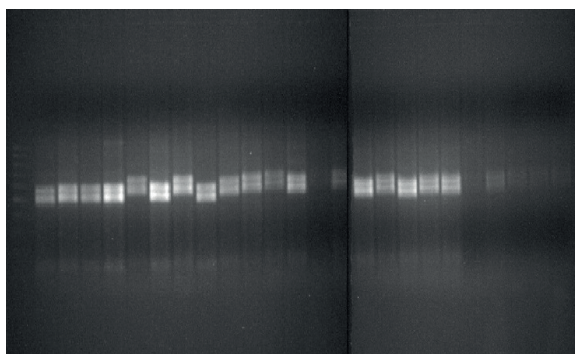


Figura 1. Análisis de restricción en gel agarosa al 2.5%.

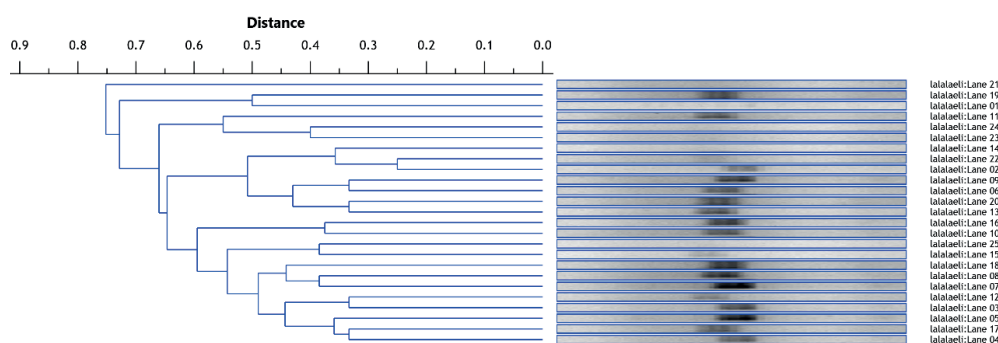


Figura 2. Análisis de restricción representa en dendograma.

CONCLUSIONES

Los análisis bioquímicos son técnicas muy útiles e importantes, ya que nos ayudaron a determinar las posibles PGPR. Con base en los análisis hay 15 (55.55%), los cuales fueron positivos para la producción de auxinas y la solubilización de fosfato, aunque 11 (40.74%) fue positiva para alguna de las actividades y solo el 1 (3.7%) fue negativo para ambas. Lo cual refleja que los lugares de donde provienen los aislados son lugares con abundantes PGPR.

Las técnicas moleculares como el PCR y el ARDRA, son técnicas muy útiles e importantes, ya que por medio de estas podemos ver la relación filogenética y ser mostrado en un dendograma.

BIBLIOGRAFÍA

- AHMAD FARAH, AHMAD IQBAL, KHAN M.S. (2008). *Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities*. Microbiological Research, 163, 173—181.
- ANGELES-NÚÑEZ JUAN GABRIEL Y CRUZ-ACOSTA TERESA. (2015). *Aislamiento, caracterización molecular y evaluación de cepas fijadoras de nitrógeno en la promoción del crecimiento de frijol*. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 6, 929-942.
- INAFED. (2015). *Estado de Guanajuato, Xichú*. Enciclopedia de los municipios y delegaciones de México.
- CASTILLO GROLAMYS, ORTEGA GRISEL, CARABEO VIVIANA, DELGADO GRIZEL, MICHELENA GEORGINA. (2007). *Determinación cualitativa de giberelinas y auxinas por cromatografía de capa fina*. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar. 1, pp. 12-17.
- COMISIÓN NACIONAL PARA EL CONOCIMIENTO Y USO DE LA BIODIVERSIDAD (CONABIO) E INSTITUTO DE ECOLOGÍA DEL ESTADO DE GUANAJUATO (IEE). 2015. *Estrategia para la Conservación y el uso Sustentable de la Biodiversidad del Estado de Guanajuato*. CONABIO/IEE. México.
- GÓMEZ-LUNA, BLANCA ESTELA; HERNÁNDEZ-MORALES, ALEJANDRO; HERRERA-MÉNDEZ, CARLOS HERNÁN; ARROYO-FIGUEROA, GABRIELA; VARGAS-RODRÍGUEZ, LORENA; OLALDE-PORTUGAL, VÍCTOR. 2012. *Aislamiento de bacterias promotoras del crecimiento de la rizósfera de plantas de guayaba (Psidium guajava)*. Ra Ximhai, 3, 97-102.
- LODISH HARVEY, BERK ARNOLD, MATSUDAIRA PAUL, KAISER CHRIS, KRIEGER MONTY, SCOTT MATTHEW, ZIPURSKY LAWRENCE, DARNELL JAMES. (2004). *Biología celular y molecular*. Argentina: Panamericana.
- MENDOZA-ESPINOZA Alfredo, KOGA Ysabel y ZAVALA Amparo I. (2008). *Amplified 16S Ribosomal DNA Restriction Analysis for Identification of Avibacterium paragallinarum*. Avian Diseases. 52, 54-58.
- MICROBIAL. (2009). *La extracción y purificación del ADN para el análisis por PCR*. Mitos y realidades. Newsletter Microbial, 3, 1-2.
- RESTREPO-FRANCO GLORIA MARÍA, MARULANDA-MORENO SANDRA, DE LA FE-PÉREZ YEISED, DÍAZ -DE LA OSA ACELA, LUCIA-BALDANI VERA, HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ ANNIA. (2015). *Bacterias solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica* Revista CENIC. Ciencias Biológicas, 46, 1, pp. 63-76.
- SOTO-AQUINO, HILDA VENTURA; ZAVALA-HURTADO, JOSÉ ALEJANDRO; PÉREZ-MORENO, JESÚS; CAMARGO-RICALDE, SARA LUCÍA. (2012). *Estacionalidad de bacterias y hongos en la rizósfera de dos especies de plantas en el Valle semiárido de Zapotitlán, Puebla*. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 6, 1231-1245.
- TRUCÍOS-CACIANO, RAMÓN; ESTRADA-ÁVALOS, JUAN; CERANO-PAREDES, JULIÁN; RIVERA-GONZÁLEZ, MIGUEL. (2011). *Interpretación del cambio en vegetación y uso de suelo*. Terra Latinoamericana, 29, 359-367.
- TAMAY DE DIOS L, IBARRA C, VELASQUILLO C. (2013). *Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real*. Investigaciones en discapacidad. 2, 70-78.
- VÁZQUEZ-SILVA, LUIS; TAMARIT-URIAS, JUAN CARLOS; QUINTANAR-OLGUÍN, JUAN; VARELA-FREGOSO, LUCÍA. (2014). *Caracterización de la declinación de bosques de encinos en Sierra de Lobos Guanajuato, México*. Polibotánica, 17, 1-14.

AGRADECIMIENTOS

Dr. Juan Gualberto Colli Mull.
Comité organizador del verano regional.

SINTESIS Y CARACTERIZACION DE COMPUESTOS TIPO JAROSITA CON SUSTITUCIONES DE Cu Y Zn PARA ESTUDIOS DE CINÉTICA QUÍMICA HETERÓGENEA

Pérez Ortega, H.E.¹; Reyes Domínguez, I.A.²

¹Instituto Tecnológico Superior de Irapuato, Ingeniería Bioquímica; Carretera Irapuato-Silao Km 12.5, El copal, C.P: 36821, Irapuato, Guanajuato; heber.uriel35@gmail.com; ²Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Catedrático CONACYT-Instituto de Metalurgia; Av. Sierra Leona 550, Lomas 2a sección, C.P: 78210, San Luis Potosí, San Luis Potosí; iareyesdo@conacyt.mx

RESUMEN

En el presente estudio fueron sintetizadas jarositas de sodio-plata por el método hidrotermal en presencia de diferentes concentraciones de Cu y Zn. Para la caracterización de los precipitados obtenidos, se utilizaron diferentes técnicas instrumentales como espectroscopia de absorción atómica (EAA), difracción de rayos X (DRX), fluorescencia de rayos X (FRX) para conocer su composición química; y microscopía electrónica de barrido con microanálisis de energía dispersiva de rayos X (MEB-EDS) para analizar su morfología. Con los resultados obtenidos fueron calculadas las fórmulas estequiométricas aproximadas de las jarositas sintetizadas. Los resultados de MEB indican que todos los precipitados obtenidos están conformados por partículas con tendencia esférica con una estructura cristalina compacta, siendo estas características deseables para la realización de estudios de cinética química heterogénea.

ABSTRACT

In the present study were synthesized sodium-silver jarosites by the hydrothermal method in the presence of several Cu and Zn concentrations. For the characterization of the obtained solids were used different instrumentals methods such as atomic absorption spectroscopy (AAS), X-ray diffraction (XRF), X-ray fluorescence (XRF) to know its chemical composition; and scanning electron microscopy with an energy dispersive X-ray analysis (SEM-EDS) for morphology analysis. With the results the approximate chemical formulae of the obtained jarosites were calculated. Results of SEM indicates that all of the obtained precipitates are formed by spherical-shaped particles with a compact crystalline structure, being those desirable properties for developing of a heterogeneous chemical kinetic studies.

Palabras clave: Jarosita, Caracterización, Síntesis.

INTRODUCCIÓN

La primera referencia en la literatura científica a la jarosita procede del prestigioso mineralogista sajón Johann Friederich August Breithaupt. (Breithaupt, 1852) Fue descubierta en 1852 en un barranco localizado en España, llamado “El Jaroso”, un paraje situado en sierra Almagrera (Almería), que es precisamente la localidad tipo de este mineral a nivel mundial. Tiene un color amarillo-pardo y es un mineral poco considerado por los coleccionistas porque su forma más frecuente es que se presente en masas granulares, pulverulento o terroso.

El grupo de minerales tipo jarosita pertenece al grupo de minerales tipo alunita que este a su vez pertenece al supergrupo de las alunitas, cuya fórmula general de este último es: $MY_3(ZO_4)_2(OH)_6$, donde $M = Na^+, K^+, Ag^+, Rb^+, H_3O^+, Ti^+, NH_4^+, \frac{1}{2} Hg^{2+}, \frac{1}{2} Pb^{2+}$; $Y = Fe, Al, Cr^{3+}, Cd^{2+}, Zn^{2+}$; y $Z = S(VI), Cr(VI), As(V), o P(V)$ (Jambor, 1999).

La precipitación de jarositas es un medio conveniente de remoción de hierro no deseado, iones metálicos y iones sulfato de soluciones de procesamiento hidrometalúrgicas, principalmente en la obtención de zinc. Uno de los avances de este tipo de precipitación es la relativa facilidad de filtración de la jarosita resultante (Dutrizac 1982). La obtención de un material tipo jarosita tiene lugar mediante el calentamiento de las disoluciones de lixiviación en presencia de agentes complejantes como $FeSO_4$. Bajo estas condiciones, se obtiene un precipitado cristalino con elevada densidad más fácil de decantar y filtrar (Arregui, 1979).

La producción mundial de zinc involucra la generación de grandes cantidades de compuestos tipo jarosita (jarosita de amonio y jarosita de sodio principalmente debido al bajo costo de las sales) para el control de hierro, los cuales son enviados a los depósitos de residuos. Los residuos acumulados causan serios problemas ambientales por el incremento en masa de residuos de hierro y la presencia de elementos tóxicos. Al mismo tiempo, existen cantidades importantes de valores económicos en los residuos (principalmente plata). Consecuentemente, por la reducción del grado de estos valores metálicos en las minas, la recuperación de metales de los residuos ha sido desarrollada en la industria del zinc

para reducir problemas ambientales y al mismo tiempo crear un nuevo recurso (Lutandala y Maloba, 2012). Por esta razón se han encaminado esfuerzos de investigación para desarrollar procesos para tratar residuos de la industria hidrometalúrgica del zinc, destacando en algunos casos el reaprovechamiento de compuestos tipo jarosita. La finalidad del presente estudio es poder sintetizar y caracterizar compuestos tipo jarosita de sodio (principal álcali utilizado en la precipitación de jarositas a nivel industrial) con sustituciones de elementos con valor económico presentes comúnmente en residuos producto de la actividad hidrometalúrgica, como lo es la plata, el zinc y el cobre. Los compuestos obtenidos serán útiles para un estudio de cinética química heterogénea que permitirá obtener las condiciones para una recuperación eficiente de metales con valor económico de residuos metalúrgicos.

METODOLOGIA

Reactivos y solventes

Para la síntesis de los compuestos tipo jarosita son utilizados los siguientes reactivos: nitrato de plata, sulfato de hierro n-hidratado, sulfato de sodio anhidro, nitrato cúprico, nitrato de zinc, ácido clorhídrico; todos en grado reactivo. Para el análisis químico son utilizados estándares de Fe, Na, Cu y Zn de PerkinElmer Pure. Todos los experimentos fueron realizados con agua ultrapura desionizada con una resistividad de $\approx 18.0 \text{ M}\Omega \text{ cm}$.

Síntesis y caracterización de los compuestos tipo Jarosita

Las muestras de las jarositas de Ag-Na-Fe, Ag-Na-Fe-Zn, Ag-Na-Fe-Cu, Ag-Na-Fe-Zn-Cu, fueron sintetizadas de acuerdo a un método similar descrito por Dutrizac, y col. (1987). En medio litro de solución fue puesta una mezcla controlada de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot n\text{H}_2\text{O} / \text{M}_2\text{SO}_4 / \text{Y}(\text{NO}_3)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O} / \text{H}_2\text{SO}_4$ donde $\text{M} = \text{Na}^+$ o Ag^+ y $\text{Y} = \text{Cu}^{2+}$ o Zn^{2+} , de acuerdo a la Tabla 1. La solución fue colocada en un reactor de vidrio forrado con aluminio para evitar la precipitación de la plata con la luz y con un condensador de espiral acoplado sobre una parrilla de calentamiento con control automático de temperatura (Super-Nuova/Barnstead-Thermoline) y agitación mecánica con una propela de cuatro aspas. La solución fue mantenida a temperatura constante de 93.0°C (366.0 K) y ajustando el pH para cada solución entre 1.2 y 1.6, ya que este es el pH óptimo de precipitación, con una velocidad de agitación de 400 min^{-1} por 18 h para cada síntesis. El precipitado obtenido fue filtrado y lavado varias veces con agua desionizada para eliminar el exceso de Fe y secado en una estufa por 24 h. El arreglo del equipo utilizado es mostrado en la Figura 1.

Equipo utilizado:

1. Parrilla de calentamiento con agitación magnética
2. Reactor de vidrio de 1L.
3. Tubo refrigerante
4. Motor de agitación
5. Sensor de temperatura de la parrilla
6. Propela de agitación

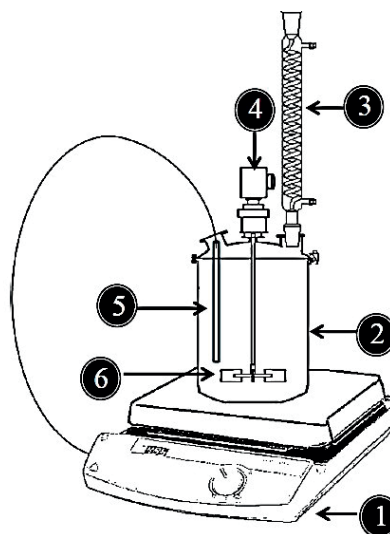


Figura 1. Esquema del arreglo de equipo utilizado para la síntesis de la jarosita de sodio-plata con incorporaciones de cobre y zinc.

Para el análisis químico fue necesario disolver una muestra de cada síntesis obtenida (0.05 g) en una solución de 1:1 de agua-ácido clorhídrico concentrado. La solución fue mantenida en una parrilla con un calentamiento de 80°C (423°K) hasta que no se observaron productos sólidos. Esta solución fue llevada a un volumen de 50 mL y el análisis se realizó mediante un espectrofotómetro de absorción atómica (PerkinElmer PinAAcle 500), utilizando la técnica de flama para la determinación Ag, Fe, Na, Zn y Cu. Los productos obtenidos también fueron analizado por difracción y fluorescencia de rayos X, (D8 ADVANCE BRUKER y S2 PUMA BRUKER respectivamente) utilizando el software

DIFFRAC.EVA V4.2.1 para determinar la composición mineralógica. La morfología de los sólidos fue examinada con un microscopio electrónico de barrido MEB (JEOL JSM-661OLV).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Síntesis y análisis químico

En la Tabla 1 se presentan las condiciones iniciales de reacción y los resultados del análisis químico elemental de cada jarosita de sodio-plata sintetizada. Todos los elementos se determinaron por FRX y EAA. Aunque el contenido de Ag en cada compuesto es posible determinarlo por EAA, se consideró el resultado obtenido por FRX dado que existe la precipitación de Ag como AgCl en la disolución de la muestra, lo que puede llevar a resultados erráticos por EAA.

Tabla 1. Condiciones de síntesis de Na-Ag jarosita y resultado de análisis químico

Condiciones iniciales (mol L ⁻¹)						Análisis elemental (wt.%)					
Síntesis	AgNO ₃	Fe ₂ (SO ₄) ₃	Na ₂ SO ₄	Zn(NO ₃) ₂	Cu(NO ₃) ₂	Ag ^a	Fe ^b	Na ^b	Zn ^b	Cu ^b	S/SO ₄ ^a
S1	0.035	0.3	0.2	-	-	3.85	33.84	3.9	-	-	13.48/40.44
S2	0.035	0.2	0.3	0.2	-	3.70	32.24	3.9	1.9	-	14.31/42.93
S3	0.035	0.2	0.3	-	0.2	3.81	32.63	3.9	-	6.72	13.35/40.05
S4	0.035	0.15	0.3	0.15	0.1	3.59	31.61	3.9	3.5	6.28	13.00/39.00

Determinado por: ^a FRX, ^b EAA

Todos los sólidos obtenidos exhiben un color amarillo-pardo el cual es típico en los compuestos tipo jarosita naturales y sintéticos. Las fórmulas aproximadas presentadas en la Tabla 2 fueron obtenidas de los resultados del análisis elemental y considerando las relaciones molares Na + Ag = 1, Fe + Zn + Cu = 3 y OH = 1 + 3Fe + 2Zn + 2Cu - 2(SO₄). Así mismo en la Tabla 2 se presentan los rendimientos de cada una de las síntesis realizadas.

Tabla 2. Formulas aproximadas de las jarositas de sodio-plata sintetizadas

Síntesis	Fórmula aproximada	Rendimiento (g)
S1	(Na _{0.82} Ag _{0.18})Fe _{2.93} (SO ₄) _{2.04} (OH) _{5.75}	26.34
S2	(Na _{0.83} Ag _{0.17})Fe _{2.98} Zn _{0.02} (SO ₄) _{2.16} (OH) _{5.66}	18.86
S3	(Na _{0.83} Ag _{0.17})Fe _{2.88} Cu _{0.12} (SO ₄) ₂ (OH) _{5.88}	18.51
S4	(Na _{0.84} Ag _{0.16})Fe _{2.29} Cu _{0.45} Zn _{0.26} (SO ₄) _{1.96} (OH) _{5.37}	15.84

FRX

En los resultados de fluorescencia de rayos X (S2 PUMA BRUKER), se obtuvo como resultado un espectro (Figura 2). Por ejemplo para S4 se puede observar los picos característicos de elementos que conforman la jarosita de sodio-plata sintetizada: Ag, Fe, Zn y Cu. Los espectros para las síntesis S1, S2 y S3 presentan un comportamiento similar.

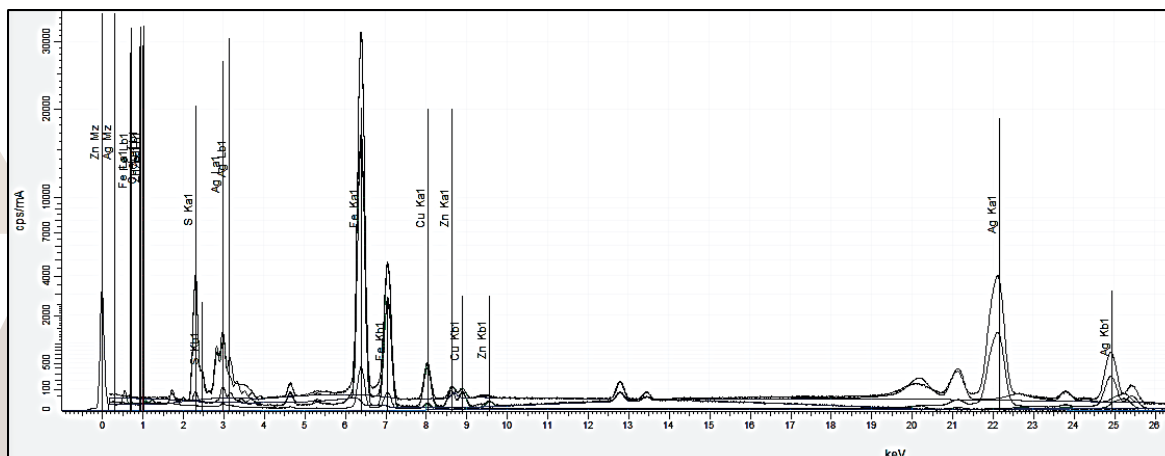


Figura 2. Espectro de fluorescencia de rayos x (S4)

MEB

Las jarositas de sodio-plata sintetizadas fueron analizadas por la técnica de microscopía electrónica de barrido, utilizando un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-6610LV con el objetivo de estudiar las morfologías y la distribución de tamaño de partícula de las jarositas. La Figura 2a corresponde a una imagen general de las partículas de la jarosita de sodio y plata sintetizada, donde es posible apreciar la distribución de tamaños de partícula con un tamaño de entre (10 - 60 μm) de diámetro. También es posible observar que las partículas tienen una geometría con una tendencia esférica. En la figura 2b se puede observar una imagen a detalle de una partícula de jarosita sintetizada, constituida por microcristales de tipo romboédrico con textura euhedral. También se muestra el espectro de EDS revelando los picos característicos que conforman las especies en las jarositas de sodio-plata por lo cual junto con los resultados obtenidos por difracción de rayos X, se confirma que el producto sintetizado es jarosita de sodio y plata. Todas las síntesis mostraron un comportamiento similar.

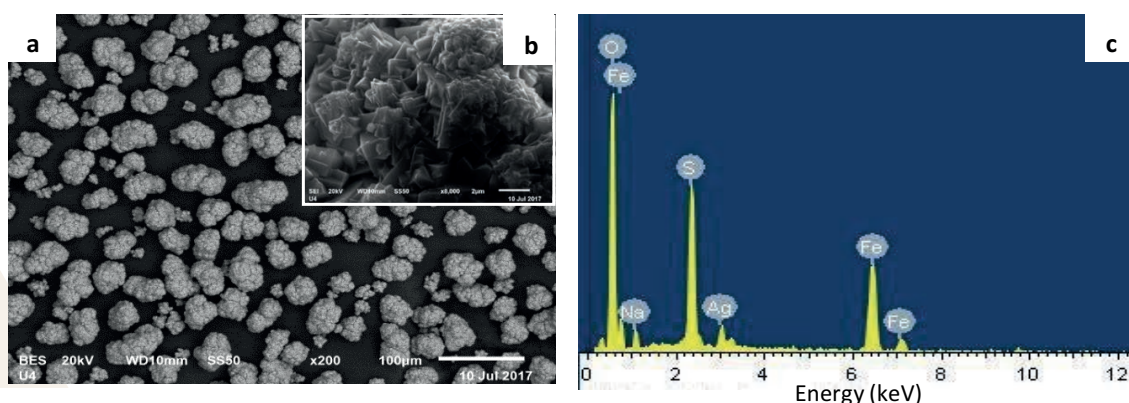


Figura 3. Imágenes de MEB: (a) imagen general de tamaños de partícula de la jarosita de plata (s4); (b) detalle de una partícula con tendencia esférica de la jarosita de plata sintetizada, constituida por microcristales de tipo romboédrico con textura euhedral. SEM.; (c); Espectro de EDS obtenido de la jarosita de sodio-plata (S1).

DRX

La Figura 4 muestra los patrones de difracción correspondientes a las 4 síntesis realizadas, las cuales fueron identificadas como compuestos tipo jarosita. La base de datos utilizada para comparar los patrones obtenidos fue la *International Center for Diffraction Data Powder- Powder Diffraction Files* utilizando el software DIFFRAC.EVA V4.2.1. De acuerdo a esta base de datos, S1, S2, S3 y S4 son soluciones sólidas entre la jarosita de sodio $\text{NaFe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$ (PDF: 00-036-0425) y la jarosita de plata $\text{AgFe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$ (PDF: 00.025-1327). En la figura 4

es posible observar por medio de un acercamiento realizado a las principales señales de difracción de S3 la presencia de una solución sólida. El ligero desplazamiento entre los patrones de la jarosita de sodio y la jarosita de plata indican una solución sólida en vez de una mezcla de dos fases distintas, ya que en el caso de una mezcla, diferentes grupos de picos de cada fase estarían presentes; y la intensidad de estos picos sería función de la fracción presente de cada fase en la mezcla. La ausencia de picos sin identificar indica que no hay otras fases cristalinas a niveles detectables en cada una de las síntesis realizadas.

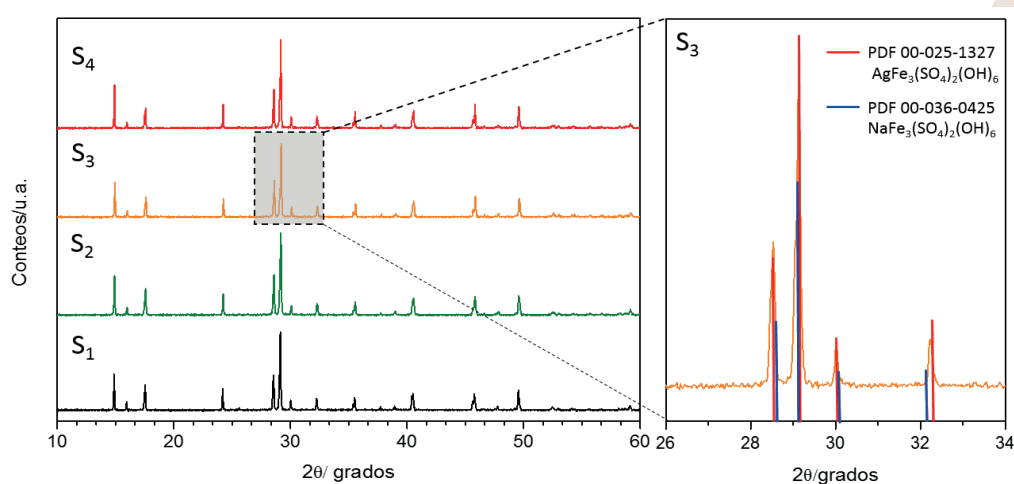


Figura 4. Patrones de difracción obtenidos de las jarositas de sodio-plata (S1- S4)

CONCLUSIONES

Se logró realizar satisfactoriamente la síntesis y caracterización de las jarositas de sodio-plata con sustituciones de cobre y zinc. La geometría esférica y estructura compacta de las partículas que conforman los compuestos tipo jarosita obtenidos son condiciones deseables en un estudio de cinética química heterogénea. Este estudio permitirá encontrar el modelo cinético y etapa controlante que describa el proceso de disolución de los compuestos tipo jarosita en medio H_2SO_4 y $NaOH$ para poder obtener una recuperación eficiente de plata de los residuos producto de la industria hidrometalúrgica.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Instituto de Metalurgia de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí por las facilidades otorgadas para realizar este trabajo. Así mismo, también se reconoce el invaluable tiempo y asistencia de la M.I.M.M Rosalinda Tovar, al M.I.M Francisco Galindo y a la p.I.M.M Mary Carmen Nolasco Cuenca.

BIBLIOGRAFIA

- ARREGUI, V.; GORDON, A. R.; STEINTVEIT, G. (1979). The jarosite process-past, present and future, in lead-zinc, *Tin 80, TMS-AIME*, 97-123.
- BREITHAUPT, A (1852). Beschreibung der zum Teil neuen Gang-Mineral des Barranco Jaroso in der Sierra Almagrera, *Berghüttenmänn Z*, 11, 65-69.
- DUTRIZAC, J., (1982). Jarosite -type compounds and their application in the metallurgical industry, *J. Metals* 35 A70.
- DUTRIZAC, J. E; JAMBOR J. L(1987). The behavior of arsenic during jarosite precipitation; Arsenic precipitation at 97 °C from sulphate and chloride media, *Canadian Metallurgical Quarterly*, 26:2, 91-107.
- JAMBOR, J. L. (1999). Nomenclature of the alunite supergroup, *The Canadian Mineralogist*, 37, 1323-134.
- LUTANDULA, M.S., MALOBA, B. (2013). Recovery of cobalt and copper through reprocessing of tailings from flotation of oxidized ores. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 1, 1085–1090.

PARTICIPACIÓN DE LACASAS Y OXIDASAS SOBRE LA BIODEGRADACIÓN DE COLORANTES TEXTILES.

Martínez Martínez, L.A.¹ y Cervantes González, E.²

RESUMEN

Este estudio reporta el monitoreo de la producción de enzimas durante la biodegradación aerobia de los colorantes rojo congo y rojo de metilo, ambos de tipo azo utilizados en la industria textil. La biodegradación se llevó a cabo a través de dos consorcios previamente aislados; uno procedente de la pluma de pollo y el otro de una planta tratadora de agua residual. El proceso de biodegradación se llevó a cabo en sistemas en lote utilizando cada colorante a 50 mg/L, los resultados mostraron que el consorcio de la planta de tratamiento decoloró en un 95% el colorante rojo de metilo en 24 h, mientras que el rojo congo se decoloró en un 90% en 48 h con el consorcio procedente de pluma. Las actividades de PPO y LiP aparentemente tienen una intervención durante la biodegradación de ambos colorantes, ya que su actividad se vio incrementada.

ABSTRACT

This study reports the monitoring of enzymes production during aerobic biodegradation of dyes, congo red and methyl red, both azo type used in the textile industry. The biodegradation was conducted through two consortia previously isolated; one from the chicken feathers and the other of a residual water treatment plant. The biodegradation process was carried out in batch systems using each dye to 50 mg/L. The results showed that the consortium from treatment plant decolorized 95% the methyl red in 24 h, while the congo red was decolorized 48% in 90 h using the consortium from chicken feathers. The activities of PPO and LiP apparently have an intervention during the biodegradation of both dyes, due to its activity is increased.

Palabras Clave: Biodegradación aerobia, colorantes azo, consorcio microbiano.

INTRODUCCIÓN

Los colorantes azoicos, se caracterizan por la presencia de uno o más grupos azo ($-N=N-$) (Waghmode et al., 2011). Cada año se fabrican 7 x105 toneladas de colorantes azoicos, estos tintes son utilizados en diferentes industrias debido a su alta estabilidad, bajo costo y su amplia gama de colores. De estos, 2.8x105 toneladas son descargados anualmente en todo el mundo por industrias principalmente textiles a los efluentes más cercanos, provocando efectos nocivos a los ecosistemas (Singh et al., 2015). La característica común de los colorantes sintéticos es su baja degradabilidad. Por ello, la decoloración de las aguas residuales coloreadas es importante, no sólo por el efecto de color, sino también porque se cree que muchos tintes son tóxicos y carcinógenos (Kariminiaae et al., 2007). Cabe mencionar que el indicador más visible de la contaminación del agua se debe en gran parte a los residuos obtenidos en industrias textiles ya que algunos de sus colorantes son visibles en concentraciones tan bajas como 0.005 mg/l (Singh et al., 2015). Por lo tanto, los efluentes industriales que contienen tinte azoico deben ser tratados antes de ser descargados al medio ambiente, existiendo una necesidad urgente de métodos técnicamente viables y rentables (Li et al., 2013). Existen métodos físicos y químicos que se utilizan en procesos de degradación de colorantes; los primeros implican el uso de adsorbentes como el carbón activado y la zeolita; coagulantes y técnicas de filtración. Sin embargo, las limitantes de estos métodos se presentan en la eliminación de los adsorbentes sólidos después del tratamiento, puesto que contienen residuos tóxicos en su superficie (Imran et al., 2015; Jafari, et al., 2014). Por otro lado, el uso de métodos químicos como la ozonación, oxidación de Fenton, oxidación electroquímica, oxidación química por ultrasonidos e irradiación tiene una aplicación limitada en el tratamiento de aguas residuales coloreadas debido al alto costo de la radiación, la electricidad y el ozono (Imran et al., 2015; Singh et al., 2015; Jafari, et al., 2014). Pero en el escenario actual los métodos de tratamiento biológico son los más adecuados y ampliamente utilizados debido a su rentabilidad, capacidad de producir menos lodo y naturaleza ecológica. Diferentes grupos taxonómicos tales como bacterias, hongos, levaduras y algas son capaces de degradar los colorantes azo en condiciones anaeróbicas y aeróbicas (Singh et al., 2015; Jafari, et al. 2014; Senan et al., 2004). Sin embargo, a excepción de las bacterias, muchos microorganismos tienen algunas desventajas, incluyendo un pH bajo requerido para una biodegradación óptima o un largo periodo de tiempo para una decoloración completa (Ng et al., 2014).

¹Instituto Tecnológico Superior de Irapuato, Carretera Irapuato - Silao km 12.5 Colonia El Copal, C.P. 36821, Irapuato, Guanajuato., MÉXICO 17arm.mtz@gmail.com

²Coordinación Académica Regional Altiplano, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Carretera a Cedral km 5+600, Ejido San José de las Trojes, C.P. 78700 Matehuala, S.L.P., MÉXICO, elsa.cervantes@uaslp.mx

Como producto del rompimiento del enlace azo se forman aminas incoloras potencialmente tóxicas, mutagénicas y carcinogénicas (Khan et al., 2013). Una combinación de procesos aeróbicos y anaeróbicos, resultan en productos no tóxicos, dando así un enfoque potencial para las aguas residuales contaminadas con colorante azo. El Rojo congo (RC), es un colorante azoico tóxico y carcinógeno, recalcitrante y contaminante en la industria textil (figura 1). Varios estudios han reportado que *Bacillus* y *Pseudomonas* degradan RC en concentraciones de 100 a 3000 mg/l en 50 y 100 h, respectivamente (Ng et al., 2014); mientras, que el rojo de metilo (RM) es derivado de azobenceno con dos anillos de fenilo separados por un grupo azo (figura 2); considerándose un colorante mutagénico en la naturaleza. En investigaciones anteriores se estudió la decoloración del RM bajo condiciones de agitación por la levadura *Sphingomonas paucimobilis*, y se observó que el 99.63% del RM se decoloró de una concentración de 750 mg/l en 10 h. Del mismo modo, otra cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 463 decoloró eficazmente 100 mg /l de RM en 17 min con una biomasa celular inicial de 20 g/L y en presencia de glucosa al 5%. En comparación, la bacteria *Enterobacter agglomerans* con una biomasa 1 g/L fue capaz de decolorar completamente 100 mg/L RM en un tiempo de 6 h de incubación (Zhao et al., 2014).

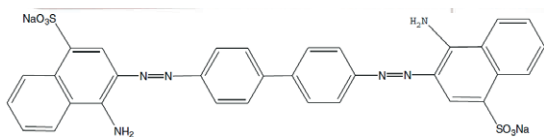


Figura 1 Estructura del colorante rojo congo.

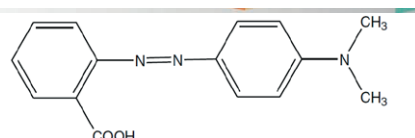


Figura 2 Estructura del colorante rojo de metilo.

El presente estudio reporta el monitoreo de la producción de enzimas durante la biodegradación de los colorantes RC y RM, ambos de tipo azo, a través del uso de consorcios previamente aislados de la pluma de pollo y de una planta tratadora de agua residual

MÉTODOS Y MATERIALES

Colorantes. Los colorantes utilizados en este estudio fueron RM (Hycel de México) tal colorante pertenece a la especie mono-azo con una máxima longitud de onda de 430 nm. El colorante RC (Hycel de México) de la especie di-azo con una máxima longitud de onda de 492 nm.

Microorganismos utilizados. Se trabajó con dos consorcios microbianos previamente aislados, uno con características queratinolítico proveniente de pluma de pollo y otro aislado de una planta de tratamiento de agua residual (PTAR), ambos consorcios se cultivaron en caldo nutritivo a 30°C en condiciones aerobias, el cultivo queratinolítico se utilizó en la degradación del colorante RC, mientras que el consorcio PTAR se utilizó para la degradación del colorante RM.

Ensayo cualitativo de decoloración. Se realizó un primer ensayo en botellas serológicas con 25 ml de medio mineral (MM) y 0.2 mL de inóculo, en donde se le adicionó el colorante en una concentración de 50 mg/L como única fuente de carbono, éste se incubó a 25°C durante 7 días. El MM se preparó en g/L: KNO₃ (0.3), FeCl₃ (0.02), MgSO₄·7H₂O (0.2), CaCl₂ (0.1), K₂HPO₄ (1).

Ensayo de decoloración con fuente adicional de carbono. Los sistemas se prepararon con 100 mL de MM descrito anteriormente, enriquecido con peptona de caseína al 1% como fuente de carbono adicional y 0.5 mL de inóculo, estos se incubaron a 35°C. El sistema RM se monitoreo cada 3 h durante un total de 27 h, mientras que el sistema con RC cada 6 h durante 60 h, en estos tiempos se tomaron alícuotas, las cuales se centrifugaron a 13,000 rpm durante 5 min, los sobrenadantes fueron analizados en cuanto a su decoloración y sus actividades enzimáticas. La decoloración se midió espectrofotométricamente, se utilizó un espectro UV-visible (Genesys 10s Thermo Scientific) ajustando un intervalo de lectura de 200 nm a 900 nm, detectando la máxima absorbancia a 424 nm para el RM y 492 nm para RC. El porcentaje de decoloración se calculó con la ecuación 1.

$$\% \text{ de decoloración} = \frac{Abs_{inicial} - Abs_{final}}{Abs_{inicial}} \times 100 \quad (1)$$

Ensayo enzimático La actividad lacasa se determinó espectrofotométricamente mediante la oxidación de ABTS [2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)], la reacción se realizó con 0.5 mL de solución buffer de acetato de sodio (pH 5) 100 mM que contenía el ABTS en una concentración de 0.5 mM, la actividad enzimática se determinó midiendo la absorbancia a 420 nm después de un periodo de incubación de 30 min a 30°C. Las mediciones se realizaron con un blanco preparado con los componentes de la reacción a la misma concentración sin incubación. El coeficiente de extinción del ABTS es de 36000 M⁻¹cm⁻¹. una unidad de lacasa se define como la cantidad de enzima requerida para transformar un μM de ABTS por min. La determinación de la actividad enzimática Mn peroxidasa (MnP) se realizó a 25°C con un periodo de incubación de 30 min midiendo espectrofotométricamente la formación del complejo malonato-manganico dependiente del peróxido a 270 nm. La mezcla de reacción consistió en 0.5 mL de solución malonato (0.1M de malonato de sodio y 0.1 M de sulfato manganoso), 0.1 mL de sobrenadante enzimático crudo, la reacción comenzó cuando se le agrego 0.5 mL de H₂O₂ 0.1M. Se utilizó un coeficiente de extinción de 11590 M⁻¹cm⁻¹. Una unidad de Mn P se define como la cantidad de enzima requerida para la transformación un μM de malonato por min. La determinación de lignin peroxidasa (LiP) se llevó a cabo en una mezcla de reacción que contenía 1.34 mL de solución buffer ácido cítrico /citrato de sodio pH 4.4, 1 mL del extracto enzimático crudo previamente centrifugado, 0.33 mL de H₂O₂ al 30% y 0.33 mL de alcohol veratrílico 2mM, la lectura se realizó a una longitud de onda de 310 nm. La actividad enzimática se calculó con un coeficiente de extinción de 9300 M⁻¹cm⁻¹. Una unidad de Li P se define como la cantidad de enzima requerida para la oxidación de μM de alcohol veratrílico por min. La cuantificación de polifenol oxidasa (PPO) se llevó a cabo utilizando 1.5 mL de extracto acuoso previamente centrifugado, 0.5 mL de catecol 0.2M disuelto en una solución tampón de fosfato 0.01M, pH 6.32. La actividad se monitoreo después de 120 min de incubación a 25°C mediante la dimerización de 1,2-hidroxibenceno a benzoquinona a una longitud de onda de 420 nm con un coeficiente de extinción molar de 1300 M⁻¹cm⁻¹. Una unidad de PPO se define como un la cantidad de enzima requerida para la transformación de un μM de 1,2-hidroxibencenodimerizado/min.

RESULTADOS

Como se mencionó en la metodología, se realizó un primer estudio cualitativo utilizando MM y el colorante como única fuente de carbono. La decoloración no fue evidente de forma cualitativa durante los siete días evaluados, posiblemente debido a la incapacidad de los microorganismos de degradar el sustrato como única fuente de carbono. De acuerdo a Senan et al., (2004), la biodegradación de los colorantes sin ningún suplemento es muy difícil, sólo aquellos microorganismos que son capaces de romper los enlaces azo, pueden utilizar las aminas aromáticas como fuente de carbono y energía para su crecimiento, algunos otros requieren fuentes adicionales de carbono para co-metabolizar el colorante. De tal manera se procedió a suplementar el medio con peptona de caseína y la decoloración fue monitoreada mediante el análisis espectrofotométrico UV-Vis, la Figura 3 muestra el espectro del proceso de decoloración del RM durante 27 h de monitoreo, como pudo observarse, la máxima absorbancia detectada a 424 nm disminuyó hasta alcanzar una máxima decoloración de 95% en 24 h de incubación (Tabla 1), mostrando la mayor decoloración en el intervalo de 9 h a 12 h. Además, se observa una disminución en la señal de la región ultravioleta causada posiblemente a la biodegradación de estructuras aromáticas, quienes absorben en esta región.

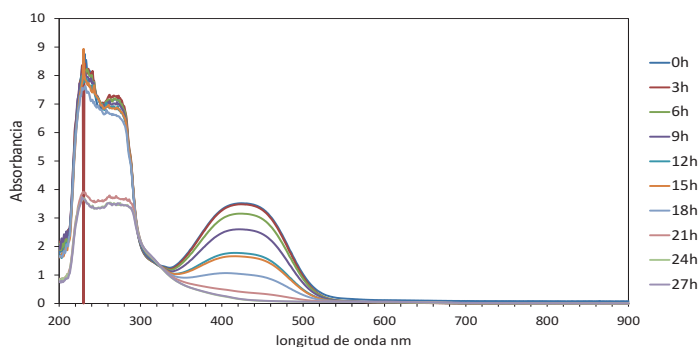


Figura 3. Espectro UV-visible durante el proceso de decoloración de RM

Tabla. 1 Porcentaje de decoloración de RM utilizando el consorcio PTAR.

Tiempo (h)	pH	Decoloración (%)
0	7.28	0.00
3	7.33	1.08
6	7.24	10.39
9	7.29	26.08
12	7.28	49.71
15	7.33	53.12
18	7.44	70.62
21	7.48	88.38
24	7.75	95.85
27	7.89	95.56

La Figura 4 muestra el proceso de decoloración de RC en el intervalo de 0-60 h de incubación, se puede apreciar una disminución considerable del pico de absorbancia en 484 nm después de 12h de ser inoculado, mostrando después de las 48 h de incubación la máxima decoloración (Tabla 2). De la misma forma que el RM, aparentemente existe biodegradación de compuestos que absorben en la región ultravioleta. La eliminación aeróbica de colorantes azoicos por bacterias y hongos, particularmente por hongos de la pudrición blanca, está mediada en su mayor parte por una variedad de enzimas oxidativas tales como MnP, lacasas y LiP, logrando hasta una eliminación completa. En el presente estudio, las actividades enzimáticas monitoreadas durante la biodegradación de RM mostraron diferentes comportamientos; se mostró una constante actividad de MnP, manteniéndose alrededor de 4 U/mL (Figura 5); mientras que la enzima lacasa presentó una tendencia a disminuir de 0.35 U/mL a 0.005 (Figura 6). Estos resultados indican una muy baja participación de estas enzimas durante el proceso de biodegradación, mientras que las actividades de PPO y LiP aparentemente tienen una intervención durante la biodegradación ya que su actividad se vio incrementada; PPO de 2 a 6 U/mL en 27 h (Figura 7), en tanto LiP de 390 a 460 U/mL también en un tiempo de 27 h (Figura 8). Es importante resaltar que estas enzimas se han reportado en la degradación de colorantes como el RM, tal es el caso de Zhao et al (2004), quienes reportan la degradación de RM utilizando una cepa del hongo *Trametes villosa*, destacando la participación de la lacasa en la intervención para modificar moléculas de colorantes azo, destruyendo su estructura cromófora. Así mismo la actividad de LiP ha sido detectada en lodos de una planta de tratamiento de aguas residuales mostrando alta eficiencia en el tratamiento de efluentes textiles (Alam et al., 2009).

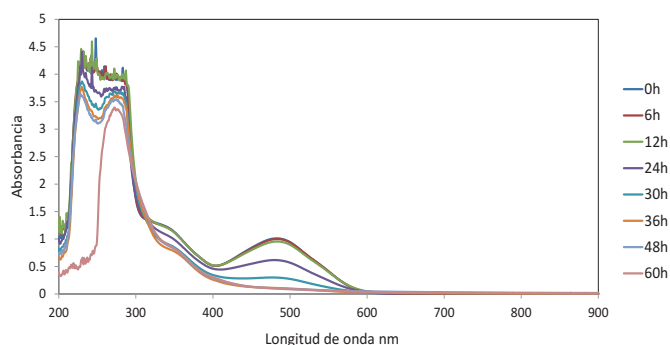


Figura 4. Espectro UV-Vis durante el proceso de decoloración de RC.

Tabla. 2 Porcentaje de decoloración del colorante RC utilizando un consorcio queratinolítico.

Tiempo (h)	pH	Decoloración (%)
0	7.270	0.00
6	7.250	1.18
12	7.220	5.63
24	7.660	39.22
30	7.820	70.65
36	7.990	89.32
48	8.050	90.02
60	8.050	90.51

La actividad de PPO al igual que las enzimas anteriores ha sido reportada en la biodegradación de colorantes, Jadhav et al. (2011), reportaron la degradación de rojo directo 5B y azul directo GGL utilizando PPO purificada de pulpa de banana, encontrando resultados de 90 % de decoloración de rojo directo 5B durante las primeras 48 h y de hasta un 85% de azul directo GGL en 90 h.

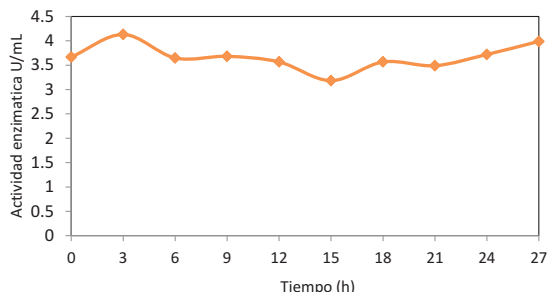


Figura 5. Actividad enzimática de MnP durante el proceso de biodegradación de RM.

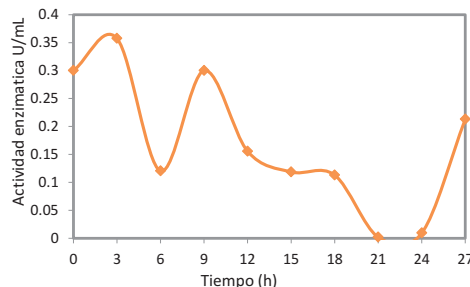
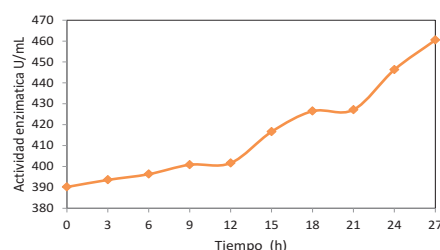
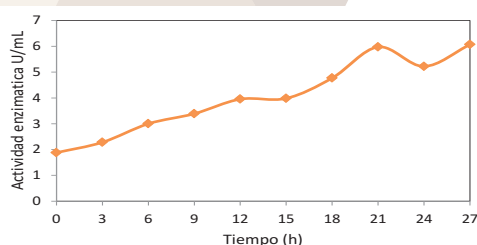


Figura 6. Actividad enzimática de lacasa durante el proceso de biodegradación de RM.



proceso de biodegradación de RM.

Respecto a la degradación del RC, se observa que la actividad enzimática de PPO se expresó durante el proceso mostrando un incremento de 2 a 6 U/mL (Figura 8), lo cual indica su posible participación; por otro lado, la actividad de MnP se mantuvo prácticamente constante durante el proceso (3 a 4 U/mL), con excepción a las 30 h, donde disminuyó por situaciones no explicadas (Figura 9). La degradación del colorante RC ha sido reportada utilizando una cepa de *Shewanella xiamenensis* BC01 en un sistema con concentraciones de 0- 5mM MnSO₄ para la inducción de MnP demostrando que el porcentaje de actividad relativa se favoreció hasta en 211.8% en las primeras 4 h al adicionar 5mM de MnSO₄, demostrando su participación en la decoloración de RC después 24h de incubación (Ng et al., 2013).

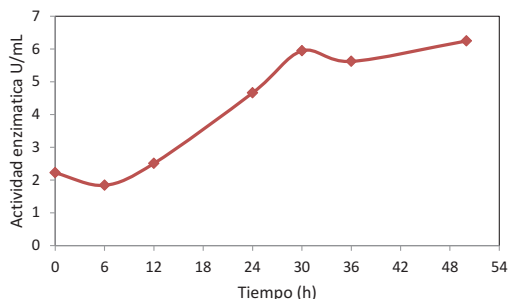


Figura 8. Actividad enzimática de PPO durante el proceso de biodegradación de RC

proceso de biodegradación de RM

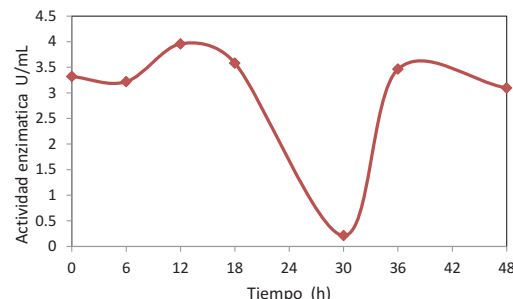


Figura 9. Actividad enzimática de MnP durante el proceso de biodegradación de RC.

CONCLUSIONES

Se demostró la capacidad de biodegradar en condiciones aerobias los colorantes azoicos RM y RC cada colorante a 50 mg/L, utilizando dos consorcios previamente aislados de una planta tratadora de agua residuales y de la pluma de pollo, el consorcio PTAR mostro una eficiente decoloración de 95 % para RM después de 24 h de incubación, mientras que el consorcio aislado de la pluma de pollo decoloro un 90 % de RC en 48 h. El análisis enzimático del medio inoculado con PTAR indico la participación de la LiP y PPO en la biodegradación del RM, mientras que la MnP permaneció constante durante el proceso de decoloración. En ambos colorantes se observó una disminución en la señal de la región ultravioleta causada posiblemente por la biodegradación de estructuras aromáticas, quienes absorben en esta región. Además, la actividad de PPO mostró un incremento en la decoloración del RC indicando su posible participación en el proceso de biodegradación.

BIBLIOGRAFIA

- ALAM, M.Z., MANSOR, M.F. & JALAL, K.C.A., (2009). Optimization of decolorization of Methylene Blue by lignin peroxidase enzyme produced from sewage sludge with *Phanerocheate chrysosporium*. *J. Hazard. Mater.* 162, 708-715.
- IMRAN, M., CROWLEY, D. E., KHALID, A., HUSSAIN, S., MUMTAZ, M. W., & ARSHAD, M. (2015). Microbial biotechnology for decolorization of textile wastewaters. *Reviews in Environmental Science and BioTechnology*, 14(1), 73-92.
- JADHAV, U.U., DAWKAR, V.V., JADHAV, M.U. & GOVINDWAR, S.P., (2011). Decolorization of the textiles dyes using purified banana pulp polyphenol oxidase. *Int. J. Phytoremediation* 13, 357-372.
- JAFARI, N., SOUDI, M. R., & KASRA-KERMANSHAH, R. (2014). Biodegradation perspectives of azo dyes by yeasts. *Microbiology*, 83(5), 484-497.
- KARIMINIAAE-HAMEDANI, H. R., SAKURAI, A., & SAKAKIBARA, M. (2007). Decolorization of synthetic dyes by a new manganese peroxidase-producing white rot fungus. *Dyes and Pigments*, 72(2), 157-162.
- KHAN, R., BHAWANA, P., & FULEKAR, M. H. (2013). Microbial decolorization and degradation of synthetic dyes: a review. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 1-23.
- LI, X., ZHANG, J., JIANG, Y., HU, M., LI, S., & ZHAI, Q. (2013). Highly efficient biodecolorization/degradation of congo red and alizarin yellow R by chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago*: catalytic mechanism and degradation pathway. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 52(38), 13572-13579.
- NG, I. S., CHEN, T., LIN, R., ZHANG, X., NI, C., & SUN, D. (2014). Decolorization of textile azo dye and Congo red by an isolated strain of the dissimilatory manganese-reducing bacterium *Shewanella xiamenensis* BC01. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(5), 2297-2308.
- SENAN, R. C., & ABRAHAM, T. E. (2004). Bioremediation of textile azo dyes by aerobic bacterial consortium aerobic degradation of selected azo dyes by bacterial consortium. *Biodegradation*, 15(4), 275-280.
- SINGH, R. L., SINGH, P. K., & SINGH, R. P. (2015). Enzymatic decolorization and degradation of azo dyes—A review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 104, 21-31.
- WAGHMODE TR, KURADE MB, & GOVINDWAR SP (2011). Time dependent degradation of mixture of structurally different azo and non azo dyes by using *Galactomyces geotrichum*. *Int Biodeterior Biodegrad* 65:479-486
- ZHAO, M., SUN, P. F., DU, L. N., WANG, G., JIA, X. M., & ZHAO, Y. H. (2014). Biodegradation of methyl red by *Bacillus* sp. strain UN2: decolorization capacity, metabolites characterization, and enzyme analysis. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(9), 6136-6145.

ESTUDIO DE LA MICROFLORA DE LA CAVIDAD ORAL Y CLOACAL EN REPTILES EN LA CUENCA BAJA DEL RÍO TEMASCATIO

María Fernanda Rodríguez-Gutiérrez¹, Adrián Leyte-Manrique² María Azucena Márquez Lucio³ y Francisco Alejo Iturvide⁴

RESUMEN

En Guanajuato los estudios microbiológicos enfocados en reptiles son inexistentes, por tanto en el presente trabajo se planteó caracterizar la microflora bacteriana en la comunidad de reptiles de la Cuenca Baja del Río Temascalio. Se tomaron muestras de cavidad oral y cloacal para la identificación de bacterias entéricas, mismas que fueron determinadas por medio de pruebas bioquímicas. Se registró un total de 12 organismos de seis especies de reptiles las cuales fueron: *Kinosternon hirtipes*, *Aspidoscelis gularis*, *Sceloporus horridus*, *Thamnophis cyrtopsis*, *Leptophis diplotropis* y *Crotalus aquilus*. El total de aislados bacterianos fue 64, de estos el 37.5% se identificó a nivel de especie. Las enterobacterias predominantes fueron: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella typhimurium*, todas pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae.

ABSTRACT

In Guanajuato microbiological studies focused on reptiles are non-existent. Therefore, in the present work, it was proposed to characterize the bacterial microflora in the reptile's community of the Cuenca Baja del Río Temascalio. Oral and cloacal cavity samples were taken for the identification of enteric bacteria, which were determined by biochemical tests. Was registered a total of 12 organisms from 6 reptile species; which were: *Kinosternon hirtipes*, *Aspidoscelis gularis*, *Sceloporus horridus*, *Thamnophis cyrtopsis*, *Leptophis diplotropis* y *Crotalus aquilus*. The total bacterial isolates were 64, from this 37.5% was identified to species level. The predominant bacteria were: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella typhimurium*, All these belonging to the Enterobacteriaceae family.

Palabras clave: microbiología, Enterobacteriaceae, reptiles, Temascalio, Guanajuato.

INTRODUCCIÓN

Los acelerados cambios en el ambiente derivados de las actividades antropogénicas han ocasionado que muchas especies silvestres entre las que se encuentran los reptiles sufran un deterioro tanto en su hábitat como en su estado de salud, ocasionado por el contacto con residuos biológicos humanos y/o de actividades de ganadería y pastoreo (Vitt y Cadwell, 2014; Ramírez-Bautista et al, 2009, 2016). El ganado y otros animales de pastoreo pueden contener muchos microorganismos potencialmente enteropatógenos que pueden ser transmitidos a los reptiles de vida silvestre y éstos a su vez retransmitirlos a otros organismos.

En Guanajuato existen 43 especies de reptiles (Flores-Villela y García-Vázquez, 2014; Leyte-Manrique et al., 2016), de las cuales 27 están registradas para la Cuenca Alta del Río Temascalio zona contigua al área de estudio del presente trabajo (Instituto de Ecología de Guanajuato, 2017). Por otro lado cabe mencionar que la Cuenca Baja del Río Temascalio carece de estudios acerca de aspectos biológicos y ecológicos, en el caso de la microflora asociada a la comunidad de reptiles su conocimiento es nulo. En este sentido, son de particular interés las bacterias entéricas, ya que se consideran indicadores de calidad sanitaria no solo de los propios organismos que los contienen sino también de las fuentes de alimentación y su hábitat en general.

De forma natural muchos microorganismos entéricos forman parte de la microflora normal de los reptiles en todo el tracto digestivo, sin que éstos les ocasionen ningún daño. Sin embargo, cuando se rompe el equilibrio y son sometidos a alguna condición de estrés, muchos de estos microorganismos pueden ocasionarles diferentes enfermedades, además brindan la oportunidad a patógenos oportunistas que provoquen infecciones secundarias. Entre los principales microorganismos entéricos que se han reportado se encuentran *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Edwardsiella tarda*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella terrigena*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas caviae*, *Salmonella sp.*, *Proteus sp.* (Aguillón-Gutiérrez et al., 2007).

La importancia del estudio de la microflora en animales silvestres, radica en que estos pueden ser portadores de enfermedades que son transmitidas a las personas conocidas como zoonosis, lo que resalta desde una perspectiva de salud pública. Además dado que en el estado no existen estudios sobre la microbiología de reptiles tanto en cautiverio como de vida silvestre no es posible partir de un diagnóstico previo con alguna especie, por lo que el objetivo general del presente trabajo fue caracterizar la microflora bacteriana de la cavidad oral y cloacal en reptiles de la Cuenca Baja del Río Temascalio, de forma que los resultados aquí mostrados puedan ser usados como referencia para estudios futuros.

MÉTODOS Y MATERIALES

Captura. El estudio se realizó en la Cuenca Baja del Río Temascatio donde se llevaron a cabo tres salidas de campo en los meses de Mayo a Julio del presente año. Los muestreos se realizaron durante el día y la noche de forma sistemática procurando abarcar la mayor cantidad de hábitats en cada jornada. El levantamiento y caracterización de datos se llevó a cabo mediante técnicas de búsqueda libre y búsqueda selectiva en hábitats y microhábitats sugeridas por Casas-Andreu et al. (1991); citado por Angarita-Sierra (2014). Dependiendo del tipo de organismos, estos fueron recolectados de manera manual o empleando el uso de ligas, redes, ganchos y pinzas herpetológicas, además los ejemplares recolectados fueron identificados *in situ* con apoyo de guías para campo (ejemplo: Herpetofauna del Valle de México: Diversidad y Conservación, Ramírez-Bautista et al., 2009; y Anfibios y reptiles de Aguascalientes, Vázquez-Díaz y Quintero- Díaz, 2005).

Toma de muestras bacteriológicas. Se le tomó una muestra microbiológica a cada uno de los organismos capturados de la cavidad oral y cloacal con ayuda de hisopos estériles, además de colectarse de igual forma una excreta de ganado del hábitat de los quelonios, las muestras fueron suspendidas en 1 ml de solución fisiológica. Posteriormente se trasladaron al laboratorio de biología del Instituto Tecnológico Superior de Irapuato y se mantuvieron en condiciones de refrigeración.

Identificación de bacterias entéricas. Para la identificación de bacterias entéricas se tomaron 100 µl de las muestras suspendidas en la solución fisiológica y se sembraron en tres medios de cultivo, uno diferencial y dos enriquecidos: Agar McConkey, Agar Sangre y Agar Sangre en anaerobiosis. Todos los aislados por medio de la técnica de siembra de extensión en placa.

Una vez que hubo crecimiento bacteriano, se realizó la descripción de las cepas observadas y posteriormente su caracterización morfológica por medio de la tinción de Gram. El siguiente paso fue su identificación por medio de pruebas bioquímicas en Agar Citrato de Simmons, Agar Hierro Triple Azúcar, Agar Urea y Agar Hierro Lisina (Chinchilla et al, 2014).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron muestras microbiológicas de la cavidad oral y cloacal de 12 organismos de cinco familias diferentes. Los organismos registrados fueron Tortugas: Kinosternidae (*Kinosternon hirtipes*) (3), lacertilos: Teiidae (*Aspidoscelis gularis*) (1), Phrynosomatidae (*Sceloporus horridus*) (4), Serpientes: no venenosas Colubridae (*Thamnophis cyrtopsis*) (1), semi venenosas (*Leptophis diplotropis*) (1) y venenosas: Viperidae (*Crotalus aquilus*) (1) las cuales se muestran a continuación en la siguiente imagen (Figura 1).



Figura 1. Especies de reptiles muestreadas. A. *Kinosternon hirtipes*. B. *Aspidoscelis gularis*. C. *Sceloporus horridus*. D. *Thamnophis cyrtopsis*. (E). *Leptophis diplotropis*. F. *Crotalus aquilus*.

De los 12 organismos muestreados en su mayoría presentaron un estado de salud aparentemente bueno, solo en dos de ellos se encontraron sintomatologías de alguna posible enfermedad siendo el caso de las tortugas *Kinosternon hirtipes* en las cuales se observó que en la parte exterior de la cavidad oral se encontraban con un enrojecimiento marcado, además de una descamación en la misma zona, estos síntomas presuntivamente podrían considerarse como dermatitis (Figura 2).



Figura 2. Organismos de la especie *Kinosternon hirtipes*, los cuales presentaron enrojecimiento en la parte externa de la cavidad oral (presuntiva dermatitis).

Estos organismos fueron colectados en un cuerpo de agua utilizado para el abastecimiento hídrico del ganado, en donde los bovinos también expulsan sus heces fecales que de acuerdo a Martínez-Silvestre (2013) se ha reportado que este tipo de padecimiento (dermatitis) está relacionado con la presencia de bacterias fecales de tipo coliforme y Gram negativo presentes en el hábitat de los quelonios, lo cual en este estudio se puede confirmar que existe una relación debido a que se logró identificar un mismo tipo de bacteria (*Klebsiella pneumoniae*) tanto en el aislado de la excreta como en los organismos de *Kinosternon hirtipes*, sin embargo estos reptiles también presentan *Salmonella typhimurium* bacterias Gram negativo, tanto para los aislados de la cavidad oral como cloacal coincidiendo con Martínez-Silvestre en la posible causa de los síntomas presentados, además de que estos podrían estar relacionados no solo a un tipo de microorganismo presente en la zona afectada.

Identificación de bacterias entéricas. Se encontraron bacterias pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae en el 100% de las especies de reptiles registradas. El total de los aislados bacterianos fue de 64 de los cuales el 37.5% se identificó a nivel de especie, en el 17.18% de los aislados el diagnóstico por medio de las pruebas bioquímicas arrojó dos posibles especies (*Pseudomonas auruginosa* y *Shigella flexneri*) y en el 45.32% no fue posible la determinación de especies. Del total de aislados las bacterias predominantes fueron: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella typhimurium*, especies de bacterias todas Gram negativas pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae. El caso de los aislados de excreta de ganado solo se identificó una especie: *Klebsiella pneumoniae*.

En la Tabla 1 se muestran los resultados de los aislados bacteriológicos, la cantidad de organismos de los cuales fueron tomados y sus respectivas especies.

Tabla 1. Bacterias de la familia Enterobacteriaceae identificadas por cada especie de reptiles muestreado, ND= bacterias no detectadas.

Familia reptiles	Especies reptiles	Organismos muestreados	Bacterias identificadas	Aislado donde se identificó la bacteria	Posibles bacterias detectadas	Aislado donde se identificó la bacteria
Kinosternidae	<i>Kinosternon hirtipes</i>	3	<i>Escherichia coli</i>	cloaca	ND	ND
			<i>Klebsiella pneumoniae</i>	hocico / cloaca		
			<i>Salmonella typhimurium</i>	hocico / cloaca		
Phrynosomatidae	<i>Sceloporus horridus</i>	4	<i>Escherichia coli</i>	cloaca	<i>E. coli</i> / <i>Shigella flexneri</i>	cloaca
			<i>Klebsiella pneumoniae</i>	cloaca		
Teiidae	<i>Aspidozelis gularis</i>	1	<i>Escherichia coli</i>	hocico	<i>K. pneumoniae</i> / <i>S. typhimurium</i>	cloaca
					<i>E. coli</i> / <i>Shigella flexneri</i>	Hocico
Colubridae	<i>Thamnophis cyrtopsis</i>	2	<i>Escherichia coli</i>	hocico / cloaca	<i>Pseudomonas sp</i> / <i>Klebsiella p.</i>	Cloaca
			<i>Klebsiella pneumoniae</i>	cloaca	<i>E. coli</i> / <i>Shigella flexneri</i>	hocico / cloaca
	<i>Leptophis diplotropis</i>	1	<i>Escherichia coli</i>	hocico	ND	ND
			<i>Klebsiella pneumoniae</i>	hocico		
Viperidae	<i>Crotalus aquilus</i>	1	<i>Escherichia coli</i>	hocico / cloaca	<i>E. coli</i> / <i>Shigella flexneri</i>	hocico
			<i>Klebsiella pneumoniae</i>	hocico		
			<i>Salmonella typhimurium</i>	cloaca		

En este estudio tal como se indica en la tabla anterior (Tabla 1) se logró identificar la presencia de *Escherichia coli* con una incidencia del 100% en todas las especies de reptiles, sin embargo en el caso de las tortugas y los lacertilos del género *Sceloporus*, se identificaron únicamente de los aislados provenientes de la cloaca. En rango de incidencia le siguió *Klebsiella pneumoniae* con 83.3% presentándose en la mitad de las especies de los aislados de la cavidad oral exceptuando a: *Aspidozelus gularis*, *Sceloporus horridus* y *Thamnophis cyrtopsis*. Además se detectó *Salmonella typhimurium* en *Kinosternon hirtipes* en los aislados de hocico y cloaca mientras que para *Crotalus aquilus* solo se detectó en los aislados provenientes de la cloaca, presentando esta bacteria una incidencia del 16.6% en los organismos muestreados no coincidiendo al que reporta DeHamel, quien indica hasta un 93.7% portan esta bacteria (Aguillón-Gutiérrez et al., 2007). Cabe destacar que en reptiles en cautiverio y de vida silvestre ya se han reportado bacterias enterobacterias como *Salmonella sp.* donde de acuerdo a Fornazari et al, (2009) describe a los reptiles de manera general como un reservorio de estos microorganismos que si se someten a ciertas condiciones de estrés pueden desarrollar salmonelosis y transmitirla a otros organismos.

CONCLUSIONES

Algunas enfermedades presentadas en los reptiles como las tortugas pueden estar estrechamente relacionadas con la presencia de otros organismos como el ganado, los cuales debido a las actividades antropogénicas interactúan en el mismo hábitat de estos animales silvestres, pudiendo ser vectores de transmisión de bacterias patógenas que se encuentran en sus heces fecales, que desechan en los cuerpos de agua al estar bebiendo del mismo. El conocimiento acerca de la identificación de microorganismos patógenos como las enterobacterias en los animales como los reptiles brindan la oportunidad de poder comprender más acerca de las posibles causas de enfermedades que se presentan en estos organismos y en algún momento pudieran ser un punto clave para las estrategias de conservación de estos mismos, además de ser una herramienta para la prevención y manejo de posibles zoonosis apoyando de esta forma al sector de salud pública.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al comité organizador del 19° VCRC por la oportunidad y el apoyo económico para realizar el presente estudio, al Instituto Tecnológico Superior de Irapuato por el apoyo del uso de sus instalaciones y mobiliario así como a mis asesores de proyecto por instruirme en la realización de este estudio y ayudar a la mejora del mismo con sus observaciones atinadas.

BIBLIOGRAFÍA

Aguillón-Gutiérrez D. R., Villareal Lazcano D., Romero Ramírez R., Ramos Aguirre A., Ramos Zárate J.J., González Wong A. (2007). "Bacterias cloacales y evaluación física del herpetofauna del Parque Ecologico Chipinque". CIENCIA UANL vol. X, No. 2 [pp. 168-173].

Angatira-Sierra Teddy. (2014). "Diagnosis del estado de conservación del ensamble de anfibios y reptiles presentes en los ecosistemas de sabanas inundables de la cuenca del río Pauto, Casanare, Colombia". Rev. Acad. Colomb. Cienc. 38(146), [pp. 53-78].

Chinchilla Magaña Andrea María, Henríquez Garcíaguirre Mitzi Xochitl, Martínez Menjivar Nargis Josefina. (2014). "Determinación de la flora bacteriana en cavidad oral de serpientes de la familia Boidae y Colubridae en el parque zoológico Nacional del Salvador, [pp. 18-31].

Fornazari Felipe, Teixeira Carlos Roberto. (2009). "Salmonelose em repteis: aspecto epidemiológicos, clínicos e zoonóticos", Vet. e Zootec. V. 16, [pp. 1-7].

Instituto de Ecología del Estado de Guanajuato. (2014). "Fauna presente en el Área Natural Protegida Cuenca Alta del Río Temascalio. Guanajuato", [pp. 1-6].

Leyte Manrique A., Morales-Castanera J. y Escobedo-Morales L. (2016). Variación estacional de la herpetofauna en el cerro del Veinte, Irapuato, Guanajuato, México. Revista Mexicana de Biodiversidad. 87 (2016), [pp. 150-155].

Martínez-Silvestre A. (2013). "Dermatología en Quelonios". XII Congreso de Especialidades Veterinarias. [pp. 1-5].

Ramírez-Bautista A., Hernández Salinas U., García-Vázquez O., Leyte-Manrique A. y Canseco-Márquez L. (2009). "Herpetofauna del Valle de México: diversidad y conservación. México, D.F. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad".

Vázquez Díaz Joel, Quintero Díaz Gustavo E. (2005). "Anfibios y Reptiles de Aguascalientes. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad", Centro de Investigaciones y Estudios Multidisciplinarios de Aguascalientes [pp. 1-6].

OBTENCION DE ZnO NANOESTRUCTURADO LAMINAR MEDIANTE PRECIPITACIÓN QUÍMICA

Martín Castañeda Lozano¹ y Gabriel Herrera Pérez²

RESUMEN

El óxido de zinc es un material de suma importancia en múltiples campos de la ciencia, debido a las propiedades del material, como es su ancho de banda prohibida y su naturaleza como un material semiconductor. En un tamaño nanométrico el ZnO obtiene también las propiedades como un agente antibacteriano, además de funcionar como un filtro contra las ondas ultravioleta. El objetivo de este trabajo fue analizar los cambios durante la síntesis de ZnO, observando las variaciones de diversos factores como la temperatura, el pH y el orden en el que se combinan los reactivos, esto se realizó durante la síntesis de ZnO en el proceso de precipitación química y utilizar los datos en futuros procesos de síntesis de ZnO.

ABSTRACT

Zinc oxide is a material of paramount importance in many fields of science, due to the properties of the material, such as its banned bandwidth and its nature as a semiconductor material. In a nanometric size ZnO also obtains the properties as an antibacterial agent, besides functioning like a filter against the ultraviolet waves. The objective of this work was to analyze the changes during the synthesis of ZnO, observing the variations of diverse factors as the temperature, the pH and the order in which the reagents are combined, this was realized during the synthesis of ZnO in the process of Chemical precipitation and use the data in future processes of ZnO synthesis.

Palabras Clave: Precipitación química, Óxido de Zinc, Caracterización.

INTRODUCCIÓN

Por la creciente demanda de materiales que satisfagan las necesidades para las nuevas aplicaciones de alta tecnología, un incremento exponencial ha surgido con respecto a los métodos y técnicas para producir dichos materiales. El óxido de zinc es un material que está siendo utilizado en esas nuevas aplicaciones, no solo en la escala volumétrica sino también como un nanomaterial, en esta forma el ZnO presenta un gran desafío en su caracterización y síntesis dada la gran diversidad de morfología y tamaño de partícula que presenta naturalmente, además estos factores se pueden ver agravados por diferentes procesos en las diferentes técnicas de síntesis de este material. Si bien a través de ciertos métodos se puede casi asegurar una forma y tamaño específico, siempre existen variables tanto en el proceso como en la naturaleza del material que pueden dar resultados no deseados, como por ejemplo en la síntesis de ZnO a escala nanométrica, las partículas resultantes son propensas a formar un agregado debido a la gran área superficial y alta energía superficial, además de que en procesos que involucren temperaturas altas, la exactitud para formar la fase cristalina deseada puede resultar complicado.

MARCO TEORICO

El óxido de zinc (ZnO) es un semiconductor tipo II-VI, que en los últimos años ha generado un gran interés debido a sus propiedades físicas, que hacen que sea un material muy interesante para numerosas aplicaciones tecnológicas, por ejemplo el ZnO puede ser utilizado en transductores, sensores químicos, cubiertas ópticas, acústicos, celdas fotovoltaicas y fotocatalizadores (Morkoç, & Özgür, 2007). El ZnO tiene un ancho de banda prohibida directa de 3,37 eV, es un semiconductor con una gran energía de enlace 60 meV (Man, Kim, Jeong, Do, & Lee, 2017). Como nanomaterial, el ZnO ha recibido una considerable atención en múltiples campos, tanto por sus características como por las diferentes formas que presenta a nanoescala como por ejemplo, el semiconductor nano-cristalino ZnO que ha recibido un considerable interés debido a su estructura estable, amplia banda de banda directa, la no toxicidad y un costo relativamente menor (Debanath, & Karmakar, 2013).

El ZnO en escala nanométrica tiene las características de gran volumen a relación de área, de alta de absorción ultravioleta (UV), y una larga vida útil, ha sido ampliamente utilizado como catalizador, sensor de gas, relleno activo para caucho y plástico, absorbente de UV en cosméticos y agente anti-virus en recubrimiento de envases (Kumar, & Kumbhat, 2016). Diferentes rutas de síntesis resultan en diferentes morfologías de ZnO, incluyendo partículas con formas de nanovarillas, nanotubos, nanolaminas e incluso estructuras nanométricas de formas similares a flor (Chakraborty, Kole, & Kumbhakar, 2012), por mencionar algunas de las formas. Por otra parte, ZnO también es una sustancia anfótera y tiene la capacidad de detectar y ajustar el valor de pH, lo que es útil en biomaterial y en la industria textil (Chiang, & Loo, 2012).

Las nanopartículas de ZnO se pueden sintetizar mediante diversos métodos, incluyendo el método sol-gel, la precipitación homogénea, la molienda mecánica, la síntesis organometálica, la deposición química de vapor, la descomposición térmica, la síntesis hidrotérmica, el método de microondas, pirolisis de spray, la evaporación térmica y la síntesis mecanoquímica (Wang, Zhao, & Liu, 2013). Sin embargo, las nanopartículas de ZnO son propensas a agregado debido a la gran área superficial y alta energía superficial, para mejorar la dispersión, en ocasiones es

necesario modificar la superficie de las nanopartículas de ZnO (Kundu, Sain, Satpati, Bhattacharyya, & Pradhan, 2015).

El método de síntesis utilizado en este trabajo para obtener ZnO, es el método de la precipitación química. Este método es una variante del enfoque de la química húmeda, cuando se busca obtener un nanomaterial a partir de este método se puede considerar un método de aproximación con un enfoque *bottom-up* (Kumar, & Kumbhat, 2016). La precipitación es el proceso por el cual se puede de obtener un sólido a partir de una disolución. Puede realizarse por una serie de diferentes factores como una reacción química, por evaporación del disolvente, por enfriamiento repentino de una disolución caliente, o por cambio de polaridad del disolvente (Saravanan., Dhivakar, & Jayanthi, 2012). El sólido así obtenido se denomina precipitado y puede englobar impurezas. Este es uno de los métodos más comunes utilizados para obtener materiales dada su relativa sencillez y velocidad.

MÉTODOS Y MATERIALES

Preparación de reactivos

Los materiales utilizados para el proceso de síntesis de ZnO por precipitación química fueron, el acetato de zinc dihidratado ($\text{Zn}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) una sal de base zinc, como el precursor y el hidróxido de sodio NaOH. Utilizando los reactivos de $\text{Zn}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y NaOH en estado sólido, se realizó una solución acuosa de cada uno, las concentraciones se pueden ver en la siguiente tabla (1). La cantidad total realizada fue 30 mL por cada uno de los reactivos, cada una de estas soluciones se dividió en dos vasos de precipitado de 50mL, cada par tenía un vaso de precipitado con 20 mL y otro con 10 mL.

Reactivo	Concentración
$\text{Zn}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	.0609
NaOH	.0309

(Tabla 1) concentraciones de los reactivos utilizados.

Instalación del sistema

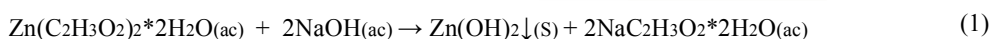
Para la síntesis se usó dos vasos de precipitado de 100 mL, una bureta graduada de 50 mL y una micropipeta, además de un agitador magnético y un platillo de calentamiento con agitación magnética, también se usó un PHmetro modelo OrionStar111, para verificar el cambio en el PH mientras ocurría la reacción. Durante el proceso uno de los vasos de precipitado se colocó debajo de la bureta sobre el platillo de calentamiento y con el agitador magnético en su interior. La bureta fijada a un soporte universal se ubicó sobre la boca del vaso de precipitado junto a el sensor del PHmetro, ambos a la suficiente distancia del agitador magnético pero un dentro de la solución como se muestra en la imagen siguiente



(Imagen 1) Sistema para la precipitación de $\text{Zn}(\text{OH})_2$

Precipitación del $\text{Zn}(\text{OH})_2$

Después de instalarse el sistema se decidió de realizar la síntesis con dos variaciones. En el primer caso se agregó en el agente de precipitación en la sal de base zinc, mientras que en el otro caso fue la sal de base zinc la que se agregó al agente de precipitación. Esto fue decidido para observar el efecto que el orden de agregado de los reactivos tendría sobre el producto resultante. Antes de iniciar el proceso también se agregó gotas de fenolftaleína a la solución que recibiría el reactivo. Se decidió que se usaría 10 mL de cada reactivo en cada síntesis de $\text{Zn}(\text{OH})_2$, además durante la síntesis el reactivo agregado fue goteado a una velocidad de .83mL/minuto en promedio. Durante el proceso de síntesis se llevó a cabo la siguiente reacción de precipitación (Ecuación 1), a partir de la cual obtuvimos el $\text{Zn}(\text{OH})_2$ disperso en la solución acuosa resultante.



centrifugaciones así como bajo las mismas condiciones, luego de ello se pasó a extraer el $\text{Zn}(\text{OH})_2$ de los tubos de centrifugación.

No de centrifugación	Velocidad (RPM)	Tiempo(minutos)
1°	35000	15
2°	55000	10
3°	75000	10

(Tabla 2) parámetros usados durante el proceso de centrifugación

Obtención del ZnO a partir del $\text{Zn}(\text{OH})_2$

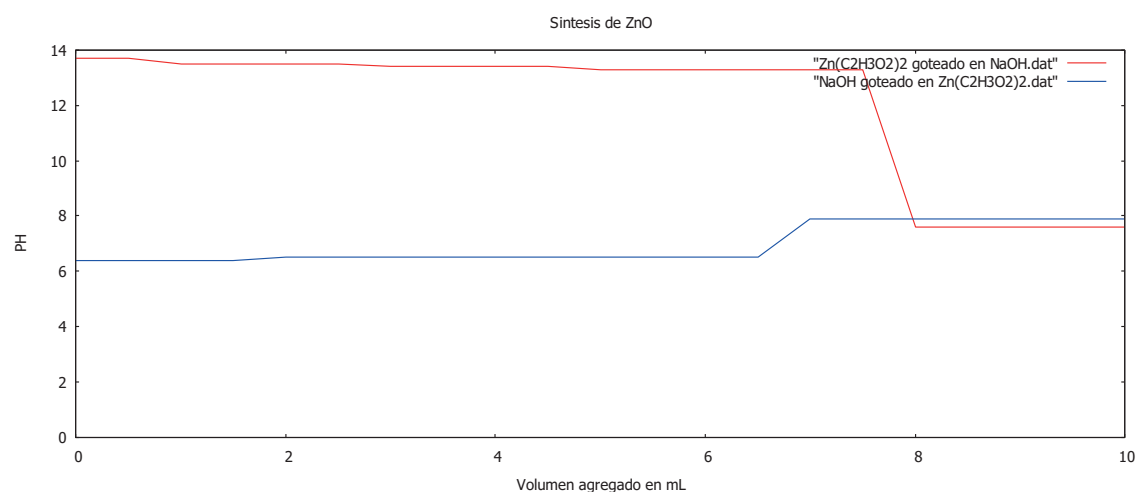
Para finalmente obtener el ZnO se decidió de calcinar el $\text{Zn}(\text{OH})_2$ obtenido de la precipitación anterior. Esto se realizó en una mufla donde las muestras fueron colocadas en capsulas de porcelana, se prosiguió a calentar la mufla hasta 230°C con una velocidad de calentamiento de $3.8^\circ\text{C}/\text{minuto}$, para después dejar enfriar lentamente la mufla durante un periodo de dos horas a una velocidad de enfriamiento de $2.6^\circ\text{C}/\text{minuto}$. Durante el enfriamiento se separó constantemente el precipitado dentro de las capsulas para asegurarse que el producto obtenido fuese un polvo.

Caracterización del ZnO

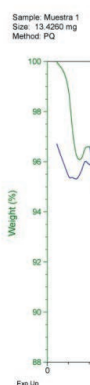
Para asegurar que el producto obtenido del precipitado luego de la calcinación fuese ZnO se realizó una caracterización por medio de un análisis térmico. Este análisis se llevó a cabo utilizando la siguiente ruta, primero se llevó a un equilibrio a 50°C , al finalizar el equilibrio se elevó la temperatura hasta 100°C manteniéndola durante 15 minutos, finalmente se aumentó la temperatura de manera constante hasta 1000°C , alcanzado este punto se dejó enfriar la muestra. El análisis llevo dos horas por cada muestra y siguió los mismos pasos en cada ocasión. Como una nota las rampas de calentamiento fueron de $10^\circ\text{C}/\text{minuto}$ en una atmosfera de aire.

RESULTADOS

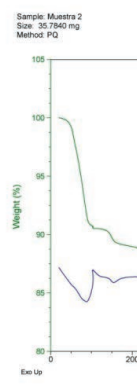
En la siguiente grafica (Grafica 1) se comparar el cambio en el PH mostrado durante las síntesis que se realizaron. En ella podemos observar como difiere el cambio en el PH de ambas síntesis en diferentes puntos, aunque los reactivos fuesen de la misma fuente. La razón del cambio se le puede otorgar a él orden en el cual fueron agregados los reactivos, con la muestra 1 donde se goteo el NaOH en el $\text{Zn}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$, presento el cambio antes que la muestra 2 donde el $\text{Zn}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ fue goteado en el NaOH. El PH inicial de ambas sustancia fue 13.7 en el caso de NaOH y 6.4 en el caso del $\text{Zn}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$. El cambio durante la síntesis en la muestra 1 se presentó primero cuando se goteo entre el 6.0 y 6.5 mL de NaOH, mientras que el cambio en la muestra 2 surgió al momento en que se goteo entre 7.5 8 mL de $\text{Zn}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$.



(Grafica 1) Grafica del volumen agregado contra cambios de PH durante el proceso de precipitación química.



(Gráfica 2) Gráfica de peso contra temperatura del ZnO obtenido de la muestra 1



(Gráfica 3) Gráfica de peso contra temperatura del ZnO obtenido de la muestra 2

Los resultados del análisis térmico (gráficas 2 y 3) muestran que se logró de obtener el mismo compuesto en ambos casos, ZnO. Esto se puede notar por que en ambos análisis térmicos muestran picos justo antes de llegar a los 400°C, además de la misma curvatura al llegar a los 800°C, pero las discrepancias entre ambas muestras, como es el aumento de peso en varios puntos en la muestra 1 en comparación con la uniformidad de muestra 2, esto demuestra que aunque se obtuvo el mismo producto las fases del ZnO fueron diferentes en ambas muestras. Las zonas donde aumentó el peso de la muestra fueron zonas donde la muestra reaccionó con los gases en su entorno, tomando moléculas de estos gases y alterando tanto su peso como su cristalinidad. Dado que los reactivos provenían de las mismas fuentes se puede deducir que fue el proceso de síntesis lo que causó las diferencias en la cristalinidad de las muestras.

CONCLUSIONES

El trabajo realizado parece demostrar que durante la síntesis por precipitación química del ZnO, el orden de adición de los reactivos puede tener un efecto determinante en la cristalinidad del producto obtenido. Aun así no se puede afirmar completamente esto, dado que las pruebas realizadas en las muestras fueron limitadas tanto por el tiempo, como los recursos disponibles dentro del periodo del verano de la investigación. Por lo cual se debe continuar con pruebas sobre las muestras obtenidas, caracterizaciones que nos permitan determinar la fase cristalina del producto obtenido, así como realizar nuevas síntesis por precipitación química bajo el mismo procedimiento, para poder corroborar los resultados obtenidos.

BIBLIOGRAFIA

1. Chakraborty, S., Kole, A. K., & Kumbhakar, P. (2012). "Room temperature chemical synthesis of flower-like ZnO nanostructures. *Materials Letters*" No. 67(1), pp. 362-364. Consultado en <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167577X11011621> (fecha de consulta 06-08-2017)
2. Debanath, M. K., & Karmakar, S. (2013). "Study of blueshift of optical band gap in zinc oxide (ZnO) nanoparticles prepared by low-temperature wet chemical method" en *Materials Letters*, 111, 116-119. Consultado en (fecha de consulta 02-08-2017).
3. Kumar, N., & Kumbhat, S. (2016). *Essentials in Nanoscience and Nanotechnology*. Hoboken: John Wiley & Sons.
4. Kundu, S., Sain, S., Satpati, B., Bhattacharyya, S. R., & Pradhan, S. K. (2015). "Structural interpretation, growth mechanism and optical properties of ZnO nanorods synthesized by a simple wet chemical route" en *RSC Advances*, No. 5(29), pp. 23101-23113. Consultado en <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167577X13011531> (fecha de consulta 02-08-2017).
5. Man, M. T., Kim, J. H., Jeong, M. S., Do, A. T. T., & Lee, H. S. (2017). "Oriented ZnO nanostructures and their application in photocatalysis" en *Journal of Luminescence*, No. 185, pp. 17-22. Consultado en <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022231316316441> (fecha de consulta 02-08-2017).

- 
6. Morkoç, H., & Özgür, Ü. (2007). Zinc Oxide, República Federal de Alemania: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA Weinheim.
 7. Saravanan, M., Dhivakar, S., & Jayanthi, S. S. (2012). "An eco friendly and solvent free method for the synthesis of Zinc oxide nano particles using glycerol as organic dispersant" en *Materials Letters*, No. 67(1), pp.128-130. Consultado en (fecha de consulta 01-08-2017).
 8. Wang, H., Li, C., Zhao, H., Li, R., & Liu, J. (2013). "Synthesis, characterization, and electrical conductivity of ZnO with different morphologies" en *Powder technology*, No. 239, pp. 266-271. Consultado en <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032591012008443> (fecha de consulta 01-08-2017).

CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE HONGOS FRENTE A ESTRÉS POR METALES PESADOS

Sandra Olivia Crespo Ayala¹ y Varinia López Ramírez²

RESUMEN

Los micobiontes de líquenes proporcionan protección al fotobionte al acumular contaminantes, sobreviviendo de esta manera a condiciones de vida hostiles. En este estudio, se evaluó la capacidad de crecimiento en medios sólidos y líquidos con metales pesados a distintas concentraciones, de una colección de diez hongos. La cepa ORM 20 mostró desarrollo rápido en medios con arsénico, mientras que en presencia de cromo se redujo. El micobionte *Flavoparmelia sp.* mostró tolerancia a metales pesados, cambiando su morfología en medio con cobre y plomo. Mientras que el micobionte *Imshaugia sp.* aumentó su desarrollo en presencia de cobre y plomo, limitándose en cromo y arsénico. Las características y estrategias de dichos aislados son fuente potencial de aplicación en biorremediación de suelos y aguas contaminadas con metales pesados.

ABSTRACT

Lichen mycobionts provide protection to the photobiont by accumulating contaminants, thus surviving hostile living conditions. In this study, the growth capacity of ten fungi was evaluated in solid and liquid media with heavy metals at different concentrations. The isolate ORM 20 showed rapid development in media with arsenic, whereas in the presence of chromium it was reduced. The mycobiont *Flavoparmelia sp.* showed tolerance to heavy metals, changing its morphology into a medium rich in copper and lead. Whereas *Imshaugia sp.* increased its development in presence of copper and lead, but its growing was limited in chromium and arsenic. The characteristics and strategies of these isolates are a potential source of application in bioremediation of soils and water contaminated with heavy metals.

Palabras Clave: Metales pesados, micobiontes, hongos, estrés oxidativo, Guanajuato

INTRODUCCIÓN

Los líquenes son formas de vida simbióticas encontrados en árboles, suelo y rocas, están formados por un alga, un hongo y de acuerdo a Spribille y col. (2016) también una levadura. Son usados para el monitoreo ambiental del lugar donde se encuentran ya que son capaces de asimilar una amplia variedad de metabolitos dependiendo de la disposición de los mismos en el lugar donde residen; están capacitados entonces para tolerar condiciones hostiles que no soportarían si vivieran de forma aislada cada una de las fracciones (Van der Wat & Forbes, 2015).

Bačkor y col. (2006) evaluaron la tolerancia del hongo simbionte en *Cladonia cristatella* ante distintas concentraciones de cobre. Por lo tanto, en el trabajo realizado, se evaluó el crecimiento radial y la biomasa en medio sólido y líquido respectivamente, de diez hongos en colección del Laboratorio de Diversidad e Interacción Microbiana de ITESI ante la presencia de cobre, arsénico, cromo y plomo, con el fin de observar patrones en cuanto a su desarrollo según el metal presente en el medio y su concentración.

MÉTODOS Y MATERIALES

Se prepararon soluciones concentradas de sales con cada metal usado, siendo dicromato de potasio, acetato de plomo, sulfato de cobre y arsenito de sodio a 1 M, posteriormente se esterilizaron por filtración.

Las cepas de hongos evaluadas fueron: *Imshaugia sp.*, *Flavoparmelia sp.* y ORM 20 en concentraciones de 150, 250, 500, 650 y 800 μM . Se realizó una estandarización de la siembra a una concentración de 300 μM , tanto en medio dextrosa Sabouraud sólido como líquido (20 mL), con un inóculo de 5 mm de diámetro. Posteriormente, de forma cualitativa y según la extensión en placa que alcanzaba cada cepa durante la estandarización, se determinó cuáles hongos se probarían en concentraciones más altas o más bajas y respecto a cuál metal.

Aquellos hongos que respondieron favorablemente a la concentración de 300 μM , se probaron a 500 y 650 μM y aquellos que se desarrollaron más lentamente se llevaron a 150 y 250 μM , en medio sólido y líquido. Finalmente, los que se desarrollaron apropiadamente en 650 μM se probaron en concentraciones de 800 μM solamente en medio sólido. Todas estas concentraciones fueron ensayadas con el siguiente protocolo:

Se esterilizó el medio y se agregaron las sales a la temperatura adecuada para evitar precipitación, se homogenizó el medio y la sal antes de depositar el medio en las placas. Una vez solidificado el medio, se sembró cada hongo, cuidando que el inóculo quedara en el centro de la placa para facilitar la medición del crecimiento radial. Se incubaron las cajas perfectamente selladas a temperatura ambiente y cada 24 horas se midió el crecimiento con ayuda de una regla, restando el radio del inóculo para obtener el crecimiento radial real del hongo. De igual manera, se preparó caldo dextrosa Sabouraud y se dosificaron 20 mL en frascos estériles y se inocularon. Cada frasco se selló perfectamente y se incubaron a temperatura ambiente durante 7 días. Al término del tiempo de incubación, se realizó la determinación de peso húmedo y seco del micelio en un equipo analizador de humedad marca A&D, modelo MX-50.

RESULTADOS

El desarrollo micelial de hongos en presencia de metales pesados se determinó a partir del crecimiento radial. De las diez cepas empleadas, tres en particular fueron las más interesantes según los patrones que mostraron (Figura 1). Los resultados que se presentan corresponden a las 48 h de incubación. Como se observa, los aislados *Flavoparmelia sp.* y ORM20 presentan buen desarrollo en presencia de cromo (Figura 1B) y arsénico (Figura 1C).

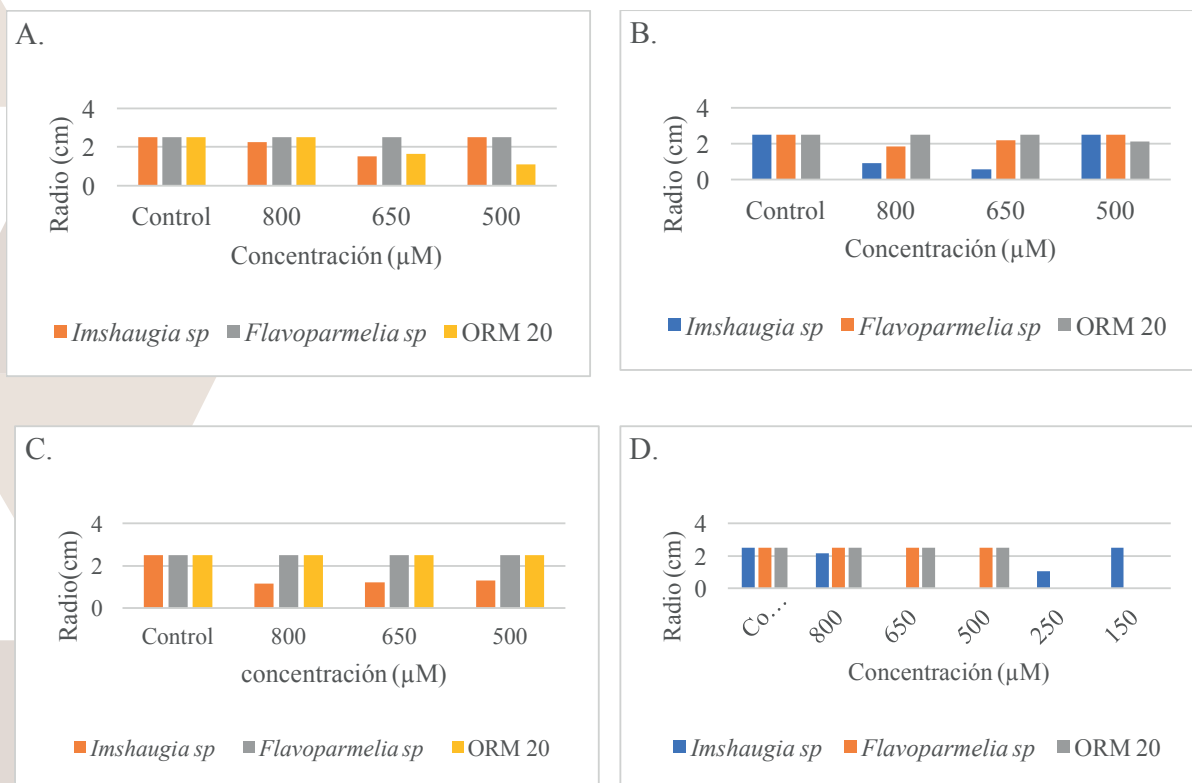


Figura 1. Crecimiento radial de aislados fúngicos en medio sólido en presencia de A. Cobre; B. Cromo; C. Arsénico; D. Plomo.

Analizando el desempeño en medio líquido respecto a cobre, se observa de forma general que *Flavoparmelia sp.* se desarrolló mejor principalmente en la concentración más alta, 650 μM (Figura 2A). De igual manera, se obtuvo mayor producción de biomasa determinada como peso seco en presencia de cobre a dicha concentración mayor incluso que el control (Figura 3A). Por otra parte, el aislado ORM20 parece ser menos tolerante al cobre en comparación a *Imshaugia sp.* y *Flavoparmelia sp.* (Figura 2A y 3A).

En lo concerniente a los medios ricos en cromo, fue la cepa ORM20 quien mostró ser más tolerante a dicho metal, alcanzando sus valores más altos en biomasa determinada como peso húmedo (Figura 2B) y seco (Figura 3B), en la concentración de 500 μM, rebasando incluso al control. Por su parte, *Imshaugia sp.* repite el patrón ya mostrado en medio sólido, pues de las tres cepas comparadas, es quien tuvo el desarrollo miceliar menor en todas las concentraciones de cromo (Figura 2B y 3B).

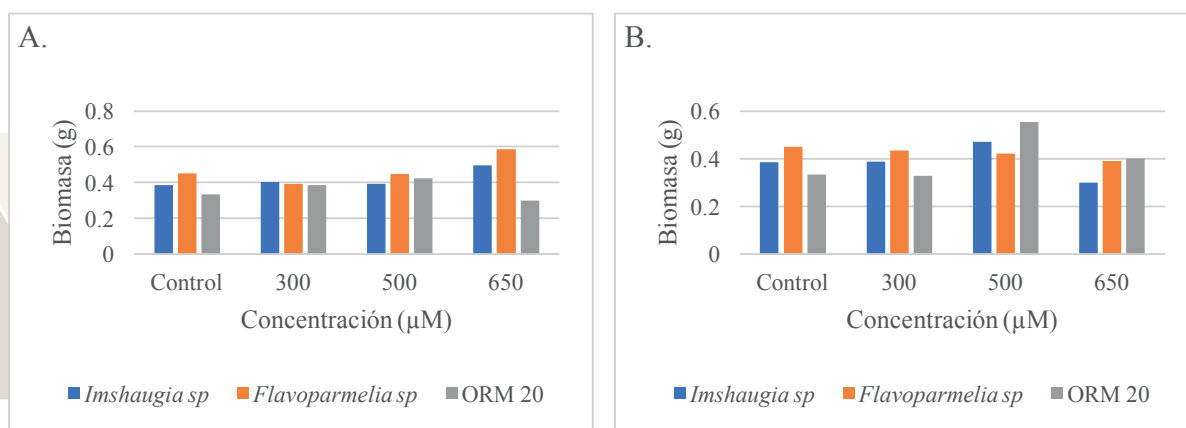




Figura 2. Peso húmedo de los micelios en presencia de A. Cobre; B. Cromo; C. Arsénico; D. Plomo.

Por otro lado, al analizar los valores de biomasa obtenidos en medios con arsénico, se observa que nuevamente las cepas ORM20 y *Flavoparmelia sp.* presentan un mejor desarrollo en presencia de este metal, pues los valores alcanzados en biomasa son mayores en cualquiera de las concentraciones del metal en comparación con el control (Figuras 2C y 3C).

Para el caso de la tolerancia a plomo, los aislados *Flavoparmelia sp.* y ORM20, fueron los que presentaron mejor desarrollo a las diferentes concentraciones del metal utilizadas (300, 500 y 650 μM ; Figuras 2D y 3D). Para el caso de *Imshaugia sp.* solo se probó en las tres concentraciones más bajas (150, 250 y 300 μM).

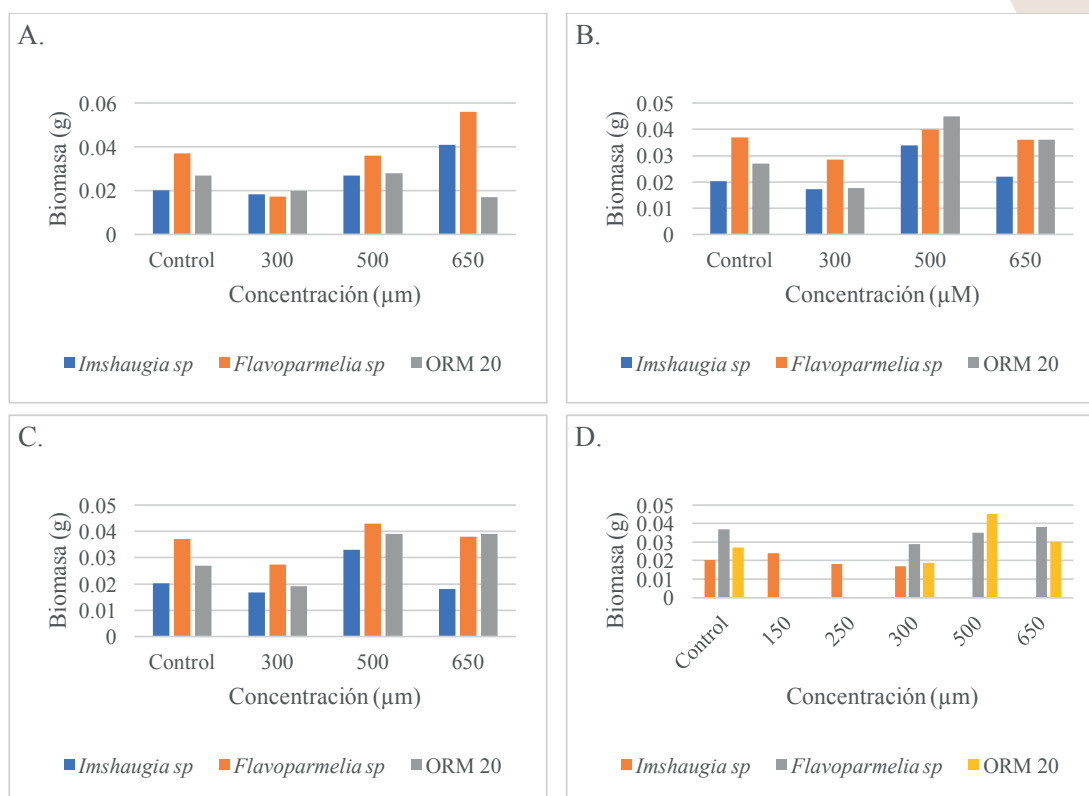


Figura 3. Peso seco de los micelios en presencia de A. Cobre; B. Cromo; C. Arsénico; D. Plomo.

Previamente se habían reportado concentraciones de metales pesados máximas utilizadas por micobiontes, mismas que han sido superadas por las cepas reportadas aquí. Por ejemplo, Bačkor y col. (2006) usó una concentración máxima de 500 μM de cobre para evaluar las cantidades del metal intracelular y extracelular en los micobiontes así como la producción de ergosterol encontrando que está última decrece cuanto más alta es la concentración del metal; comparado con la respuesta de las cepas ensayadas en este trabajo, resulta interesante que casi duplicando la concentración del cobre, responden favorablemente pues continúan desarrollando micelio en medio líquido y sólido, adicionalmente, dicha respuesta positiva no solo es en el cobre, sino también frente a arsénico, cromo y plomo. Branquinho y col. (2011), por su parte, al evaluar concentraciones variadas de cobre sobre la parte fotosintética y el micobionte del líquen, siendo las más altas de 500 y 1000 μM con el fin de evaluar la respuesta del hongo en cuanto a la producción de ergosterol, encontraron que la forma en que el hongo se relaciona con el fotobionte marca la diferencia en cuanto a la sensibilidad frente al cobre, siendo las cianobacterias las más afectadas en comparación con las algas verdes; dicho trabajo soporta la evaluación realizada a los micobiontes en el presente trabajo, al poner de manifiesto que el hongo es quien brinda cierta protección frente a este tipo de estrés, tal como lo señalaron Wolterbeek y col. (2003), el micobionte es quien posee la capacidad de acumular los metales pesados.

Por otro lado, se ha reportado que concentraciones de 500 μM de cobre y zinc pueden afectar el potencial de eficiencia del fotosistema y la pérdida de la integridad de la membrana en los líquenes ante sales y metales pesados, (Yemets *et al.*, 2015). Se entiende entonces que los micobiontes aquí evaluados, soporten concentraciones más altas, dado que ya están aislados y son ellos mismos quienes acumulan los metales, sin tener que brindar protección a un fotobionte. En un reporte previo donde se compararon dos líquenes en cuanto a su capacidad de acumular metales pesados procedentes del aire, se determinó que el líquen *Flavoparmelia caperata* era bioacumulador de cobre, zinc y plomo (Aprile *et al.*, 2010), apoyando de esta manera lo encontrado en el presente trabajo donde el micobionte *Flavoparmelia sp.* mostrado ser tolerante incluso a arsénico.

CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio indican que se deben probar concentraciones más altas en los cuatro metales evaluados, para demostrar realmente cual es la tolerancia que tienen los hongos ensayados, ya que es sorprendente el hecho de solo haberse observado cambios en cuanto a las coloraciones de los micelios en presencia de los metales pero seguir desarrollándose sin problemas; adicionalmente, los hongos trabajados fueron aislados de líquenes del estado de Guanajuato, lo que sugiere una población liquénica en el estado, que es tolerante a cobre, arsénico, cromo y plomo en altas concentraciones; proponiendo así una línea de investigación para biorremediación de suelos que estén contaminados con dichos metales mediante la elucidación de los procesos bioquímicos involucrados a la tolerancia que presentan los hongos evaluados.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Varinia por el enorme entusiasmo, su paciencia para enseñar, la disposición para compartir ciencia, la confianza que tuvo en mí y su gran sentido del humor. Del mismo modo, les doy las más infinitas gracias a mis compañeros de laboratorio, con quienes tuve el honor de compartir conocimientos y momentos inolvidables, Marifer, María, Isaac, Yahir, Carlos y Paloma, gracias por todo. Un agradecimiento a mis padres también por apoyarme siempre en perseguir mis sueños y enseñarme a dar siempre lo mejor de mí. Finalmente, pero no menos importante, agradezco a ITESI, CONACyT y al programa del Verano de la Ciencia Región Centro por la oportunidad de realizar este proyecto.

BIBLIOGRAFIA

- Aprile, G. G., Di Salvatore, M., Carratù, G., Mingo, A., & Carafa, A. M. (2010). Comparison of the suitability of two lichen species and one higher plant for monitoring airborne heavy metals. *Environmental Monitoring and Assessment*, 162(1–4), 291–299.
- Bačkor, M., Pawlik-Skowrońska, B., Tomko, J., Bud'ová, J., & Sanità di Toppi, L. (2006). Response to copper stress in aposymbiotically grown lichen mycobiont *Cladonia cristatella*: uptake, viability, ergosterol and production of non-protein thiols. *Mycological Research*.
- Branquinho, C., Matos, P., Vieira, A. R., Margarida, M., & Ramos, P. (2011). The relative impact of lichen symbiotic partners to repeated copper uptake. *Environmental and Experimental Botany*, 72(1), 84–92.
- Spribille, T., Tuovinen, V., Resl, P., Vanderpool, D., Wolinski, H., Aime, M. C., Schneider, K., Stabenheiner, E., Toome-Heller, M., Thor, G., Mayhofer, H., Johannesson, McCutcheon, J. P. (2016). Basidiomycete yeasts in the cortex of ascomycete macrolichens. *Science*, 353(6298), 488–492.
- Van der Wat, L., & Forbes, P. B. C. (2015). Lichens as biomonitors for organic air pollutants. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 64, 165–172.
- Wolterbeek, H. T., Garty, J., Reis, M. A., & Freitas, M. C. (2003). Chapter 11. Biomonitors in use: lichens and metal air pollution, (1866), 377–419.
- Yemets, O., Gauslaa, Y., & Solhaug, K. A. (2015). Monitoring with lichens - Conductivity methods assess salt and heavy metal damage more efficiently than chlorophyll fluorescence. *Ecological Indicators*, 55, 59–64.

BIOCONTROL DE FITOPATÓGENOS DEL SUELO.

Tania Itzel Yáñez Paniagua¹ y Francisco Alejo Iturbide² y María Azucena Márquez Lucio³

RESUMEN

Se aislaron y observaron microorganismos fitopatógenos en lesiones de tallos y hojas de diferentes plantas de uso agrícola del municipio de Salvatierra, Guanajuato. Se recolectaron las muestras de hojas, tallos y frutos con síntomas visibles de presencia de diferentes fitopatógenos. Se observaron macro y microscópicamente para posteriormente realizar cortes histológicos, que fueron posteriormente desinfectados y diseccionados en el borde de las lesiones, conteniendo una parte enferma y parte sana del tejido. Los cortes fueron sembrados en placas Petri con medio agar papa dextrosa e incubados a 24°C. De las muestras incubadas, se observó crecimiento de hongos en las de cebolla (M1, M2, M3, M4) y trigo (H1, H2, H3), mientras que en las hojas y tallos de trigo se observaron colonias de color blanco cremoso. Estas muestras se sembraron para la obtención de los cultivos puros en cajas Petri con agar PDA para el caso de hongos y agar nutritivo para el de las bacterias. Se observó al microscopio la morfología de los hongos obtenidos, sobre un portaobjetos con una gota de azul de lactofenol algodón. Para las pruebas de confrontación con los fitopatógenos se utilizaron microorganismos promotores de crecimiento provenientes del cerro del Cubilete de Silao Guanajuato, los cuales fueron 3 son bacterias y 3 hongos. En las confrontaciones con bacterias no se observó inhibición entre las bacterias promotoras y las fitopatógenas, mientras que en los tres hongos promotores se observó que sí tuvieron capacidad de inhibir a los aislados fitopatógenos. Los hongos promotores se inocularon en caldo dextrosa papa, y se pusieron en agitación moderada, para el crecimiento del micelio. Se realizaron cultivos para observar la inhibición del hongo fitopatógeno, para finalmente probar in vivo los biotratamientos derivados de los tres hongos promotores y el aislado fitopatógeno M2 en condiciones de invernadero.

ABSTRACT

Phytopathogenic microorganisms were isolated and observed in lesions of stems and leaves of different plants of agricultural use of the municipality of Salvatierra, Guanajuato. Samples of leaves, stems and fruits were collected with visible symptoms of presence of different phytopathogenic. They were observed macro and microscopically to later perform histological cuts, which were subsequently disinfected and dissected on the edge of the lesions, containing a diseased part and healthy part of the tissue. The cuts were sown in petri dishes with half-agar potato dextrose and incubated at 24 115° C. From the incubated samples, mushroom growth was observed in the onions (M1, M2, M3, M4) and wheat (H1, H2, H3), while in the leaves and wheat stalks, creamy white colonies were observed. These samples were replanted to obtain the pure cultures in petri dishes with PDA agar for the case of fungi and nutritive agar for the bacteria. The morphology of the fungi obtained was observed in the microscope, on a slide with a drop of lactophenol cotton blue. For the tests of confrontation with the phytopathogenic were used microorganisms growth promoters from the Cerro del Goblet of Silao Guanajuato, which were 3 are bacteria and 3 fungi. In confrontations with bacteria no inhibition was observed between the promoter bacteria and the pathogenic, whereas in the three promoter fungi it was observed that they did have the capacity to inhibit the isolates phytopathogenic. The promoter fungi were inoculated in potato dextrose broth, and were put in moderate agitation, for the growth of the mycelium. Cultures were carried out to observe the inhibition of the fungus Fitopatógeno, to finally try in vivo the biotreatments derived from the three promoter fungi and the isolated Fitopatógeno M2 in greenhouse conditions.

PALABRAS CLAVE

Biotratamiento, fitopatógenos, hifas, micelio

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial los hongos fitopatógenos originan pérdidas que ascienden a miles de millones de dólares al año (National Academy of Sciences 1980). El daño que ocasionan no sólo se refiere a las pérdidas de producción económica, sino también a las pérdidas en la producción biológica, es decir a la alteración que existe en el crecimiento y desarrollo de las plantas hospedantes atacadas por estos microorganismos. De los diversos microorganismos fitopatógenos que atacan a las plantas, como pueden ser los virus, hongos, bacterias, nemátodos, fitoplasmas, y viroides, son los hongos el grupo que más enfermedades ocasiona y por lo tanto sobre el que más investigación se ha realizado (National Academy of Sciences 1980). Se sabe que más de 8,000 especies de hongos pueden causar enfermedades en las plantas. Todas las plantas superiores pueden ser infectadas y dañadas por más de una especie de hongo fitopatógeno, y una especie de hongo fitopatógeno puede atacar a más de una especie de planta (National Academy of Sciences 1980, Agrios 1988). La importancia de los hongos fitopatógenos del suelo que atacan la raíz, no se limita sólo al daño que ocasionan en las plantas hospedantes, sino también debe considerarse el papel que juegan dentro de las cadenas tróficas y en las diversas relaciones que establecen con otros microorganismos del suelo (Agrios 1988, Lumsden 1981).

MARCO TEÓRICO

El suelo es uno de los hábitats microbianos que presenta mayor diversidad, se estima que alberga cerca de 109 microorganismos por gramo de suelo y 104 especies diferentes por gramo de suelo. Estos microorganismos pueden interactuar en la rizosfera, con las raíces de las plantas, de modo que los exudados radicales, ricos en compuestos orgánicos les aportan gran variedad de nutrientes para llevar a cabo sus actividades metabólicas (Agrios, 2005). Las

células se agrupan en filamentos llamados hifas que en conjunto recibe el nombre de micelio. Los hongos son pequeños organismos productores de esporas, generalmente microscópicos, eucarióticos, ramificados y a menudo filamentosos que carecen de clorofila y que tienen paredes celulares que contienen quitina, celulosa, o ambos componente (Agrios, 2005). Todas las plantas son atacadas por algún tipo de hongo, y cada uno de los hongos parásitos ataca a uno o más tipos de plantas. Algunos hongos crecen y se reproducen sólo cuando establecen una cierta asociación con las plantas que les sirven de hospedante, durante todo su ciclo de vida estos hongos se conocen como parásitos obligados o biotrófos.

METODOLOGÍA

Material vegetal. Se seleccionaron seis muestras obtenidas de campos agrícolas del municipio de Salvatierra, Guanajuato, que mostraban presencia de lesiones en diferentes partes vegetativas como tallos y hojas. Se observaron las muestras para descripción de las lesiones tanto a simple vista como en microscopio estereoscópico de 5x a 60x. Se realizaron cortes histológicos en forma de cuadros y se desinfectó en una solución de cloro y agua destilada estéril 5:1 y se sumergieron por un minuto.

Aislamiento de fitopatógenos. Se prepararon placas de Petri con agar papa dextrosa en cajas Petri, se inocularon con las muestras previamente desinfectadas y se incubaron a 24°C por un periodo de 3 a 5 días. De cada brote de micelio se realizaron preparaciones en portaobjetos y se realizaron observaciones microscópicas con azul de lactofenol. Además, para obtener los cultivos puros de las diferentes muestras de hongos y bacterias, cada brote de micelio y/o colonia bacteriana fue sembrado en placas de Petri con agar nutritivo y agar papa dextrosa.

Confrontaciones in vitro. A partir de hongos y bacterias promotores de crecimiento previamente aislados provenientes de la región del cerro del Cubilete de Silao Guanajuato, se realizaron las confrontaciones con los fitopatógenos obtenidos. Los aislados bacterianos fueron sembrados en medio N-Brip conteniendo 10 g de glucosa, 5 g de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, 5g de $\text{MgCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.25g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2g de KCl y 0.1g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ por litro de medio ajustando a pH 7, modificado con un indicador de rojo de metilo e incubadas a 30-35°C por 24 horas, los hongos se sembraron en Agar dextrosa papa.

A partir de los resultados obtenidos se preparó caldo papa dextrosa para su inoculación de hongos promotores de crecimiento y se puso en agitación moderada de 4-5 días a temperatura ambiente. Se realizó un ensayo con sensidiscos impregnados los extractos de los hongos promotores provenientes del caldo papa dextrosa colocados en forma periférica en las placas de Petri inoculadas previamente cada una con un aislado fitopatógeno para evaluar el posible efecto inhibitorio.

Ensayo de confrontación in vivo. A partir del caldo papa dextrosa se realizó un conteo de conidias de los hongos promotores, para preparar los diferentes biotratamientos para las pruebas in vivo en condiciones de invernadero con una concentración de 10^4 conidias por mililitro. Se seleccionó el hongo fitopatógeno M2 añadiéndosele a los diferentes biotratamientos.

Se sembraron 45 plantas de jitomate, para realizar las pruebas aplicándole a 9 plantas cada uno de los 5 biotratamientos, que constan de:

Tratamiento 1: hongo 1 promotor y patógeno.

Tratamiento 2: hongo 2 promotor y patógeno

Tratamiento 3: hongo 3 promotor y patógeno

Tratamiento 4: patógeno

Tratamiento 5: sin nada

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

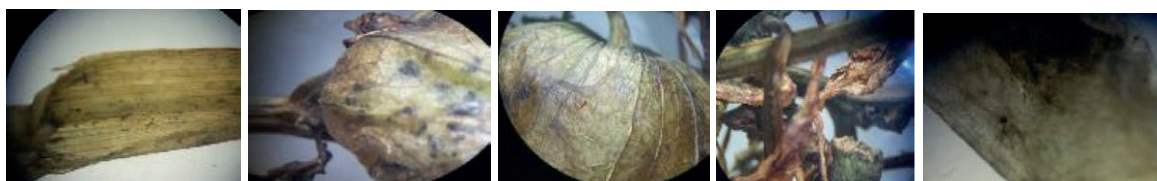


FIGURA 1. Observación con el estereoscopio de las diferentes muestras obtenidas a), b) c), d) de izquierda a derecha.

En la Figura 1 se muestran las diferentes partes con síntomas de lesión por fitopatógenos. La figura A nos muestra, lesiones en las hojas de trigo, conocidas como picnidos, de color negro y pequeños, la figura B y C se muestran lesiones del fruto de la hortaliza de tomate verde frontal y lateral donde se observan las manchas de color negro que llenaron el fruto, la figura C se observa la parte dañada de la raíz de cebolla, siendo esta más seca que las demás, y finalmente la D que muestra las lesiones de las hojas delgadas de pasto en donde tiene un severo daño estructural. Los cortes histológicos infectados que se colocaron en cajas Petri con medio PDA, mostraron crecimiento a las 72 horas de incubación. En la Tabla 1 se muestran los resultados de los crecimientos de cada una de las muestras.

Tabla 1. Resultados de los crecimientos en placa de las diferentes muestras

Muestra	Observaciones
Muestra 1 Tomate	No muestra crecimiento alguno, ni de bacterias ni hongos.
Muestra 2: Ramas de pastura	Muestra crecimiento de algunas colonias de bacterias de color blanco-cremoso

Muestra 3: trigo	Presentan un crecimiento de bacterias de color blanco-cremoso y en otros dos cortes se observa crecimiento de hongos rosados y oscuros.
Muestra 4: Cebolla	En tres cortes se observa el crecimiento de hongos, con mayor crecimiento en el central ya que son dos diferentes, uno rosa y el otro oscuro.
Muestra 5: hojas delgadas de pasto	Se observa un crecimiento de colonias de color blanco cremoso.
Muestra 6: hojas de jitomate	No se observa crecimiento de hongos ni bacterias.

Se nombraron M1, M2, M3, M4 a los hongos provenientes de la cebolla y H1, H2, H3, a los provenientes de la muestra de trigo.

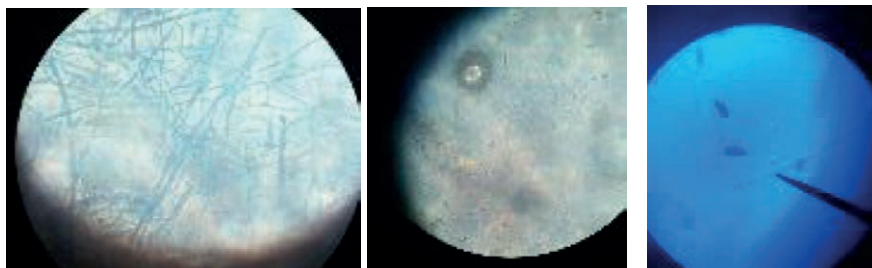


Figura 2. Vista al microscopio de algunas muestras A), B), C) de izquierda a derecha

En la Figura 2, se muestran las observaciones microscópicas de algunos de ellos como es la Figura A, que cuentan con micelio tabicado que atraviesan las hifas en diagonal, pertenecientes a la cebolla, en la Figura B, el micelio es cenocítico, estas hifas no presentan tabiques por lo que son pertenecientes a hongos inferiores pertenecientes a la muestra de tomate, la Figura C presenta micelio conidióforo y conidio sueltos, reproduciéndose asexualmente.

En la pruebas de confrontación entre hongos se observa que las bacterias tienen un cambio de pH, ya que el medio N-Brip cambio de color naranja a uno rojizo, pero no hay inhibición, mientras que en los hongos, se observa que todos los promotores de crecimiento son inhibidores de los fitopatógenos, ya que estos se extienden y no dejan crecer a los patógenos, como se observa en la Figura 3.

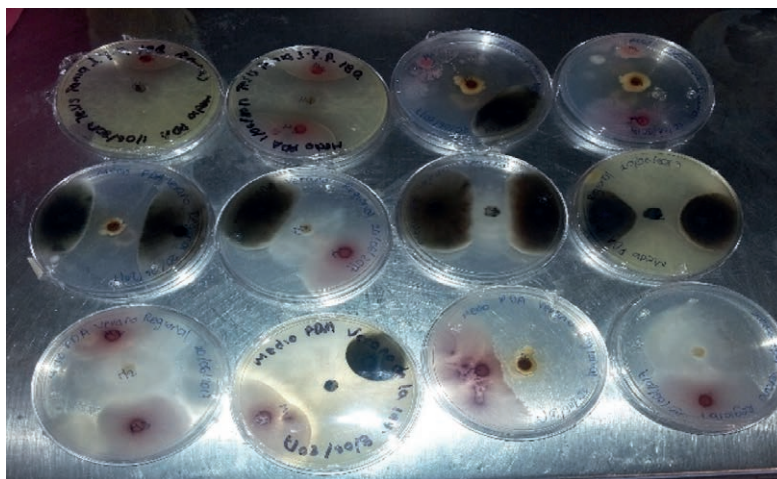


Figura 3. Confrontaciones de hongos fitopatógenos con hongos promotores.

El hongo fitopatógono M2 se escogió ya que como se observa en la Figura 4 B es la que más se inhibió con el promotor, además de que fue en la única muestra proveniente de una hortaliza que creció un hongo, para nuestra planta de estudio se considera la más correcta. Siendo la prueba de inhibición positiva, en el caldo papa dextrosa con nuestros hongos promotores de crecimiento hubo un crecimiento en un periodo de 4 días. En la prueba con el antibiograma no se observó crecimiento. Se añadieron tres aspersiones por planta, por 5 días, evaluando el grosor del tallo, su altura y su color de cada planta como se muestra en la Tabla 2. El crecimiento de las plantas tratadas, respecto al de las que no se les ponía la aspersión del biotratamiento, fue significativa ya que al segundo día de ser tratadas se observaba su crecimiento mayor al de las demás.

Tabla 2. Resultados de biotratamientos en pruebas de invernadero.

	Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3	Tratamiento 4	Tratamiento 5
Planta 1	Altura:13.5 cm Grosor del tallo: 0.2 cm Color: verde	Altura: 9.52 cm Grosor del tallo: 0.33cm Color: verde amarillo	Altura: 10.3 cm Grosor del tallo: 0.23cm Color: verde	Altura: 8.3 cm Grosor del tallo: 0.29 cm Color: verde	Altura: 6.6 cm Grosor del tallo: 0.21 Color: verde
Planta 2	Altura: 14.6 cm Grosor del tallo: 0.36 cm Color: verde	Altura: 10.2 cm Grosor del tallo: 0.36 cm Color: verde	Altura: 12.4 Grosor del tallo: 0.33 cm Color:	Altura: 9.8 cm Grosor del tallo: 0.31 cm Color: verde	Altura: 5.03 Grosor del tallo: 0.16 cm Color: verde
Planta 3	Altura: 7.3 cm Grosor del tallo: 0.3 cm Color: verde	Altura: 9.2cm Grosor del tallo: 0.39 cm Color: verde	Altura: 10.1cm Grosor del tallo: 0.22 cm Color:	Altura: 7.2 cm Grosor del tallo: 0.33 cm Color: verde	Seca
Planta 4	Altura: 11.6 cm Grosor del tallo: 0.23 cm Color: verde	Altura: 7.8 cm Grosor del tallo: 0.23 cm Color: verde	Altura: 9.3 cm Grosor del tallo: 0.41 cm Color:	Altura: 6.6 cm Grosor del tallo: 0.4 cm Color: verde	Altura: 4.8 cm Grosor del tallo: 0.16 Color:
Planta 5	Altura: 12.9 cm Grosor del tallo: 0.32 cm Color: verde	Altura: 9.8 cm Grosor del tallo: 0.28 cm Color: verde	Altura: 6.4 cm Grosor del tallo: 0.22 cm Color: verde amarillo	Altura: 4.5 cm Grosor del tallo: 0.37 cm Color: verde	Altura: 4.2 cm Grosor del tallo: 0.22 cm Color: verde
Planta 6	Altura: 11.2 cm Grosor del tallo: 0.40 cm Color: verde	Altura: 8.7 cm Grosor del tallo: 0.43 cm Color: verde	Altura: 9.4cm Grosor del tallo: 0.26cm Color: verde	Seca	Altura: 5.5cm Grosor del tallo: 0.13 cm Color: amarillo
Planta 7	Altura: 6.1cm Grosor del tallo: 0.33 cm Color: verde	Altura: 8 cm Grosor del tallo: 0.29 cm Color: verde	Altura: 9.3 cm Grosor del tallo: 0.35 cm Color: verde	Altura: 6.6cm Grosor del tallo: 0.27 cm Color: verde	Seca
Planta 8	Altura: 7.3cm Grosor del tallo: 0.25 cm Color: verde	Altura: 8.1cm Grosor del tallo: 0.31cm Color: verde	Altura: 7.7cm Grosor del tallo: 0.36 cm Color: verde	Seca	Altura: 6.8cm Grosor del tallo: 0.19 cm Color: verde
Planta 9	Altura: 13 cm Grosor del tallo: 0.44 cm Color: verde amarillo	Altura: 9.8 cm Grosor del tallo: 0.25 cm Color: verde	Altura: 7.3 cm Grosor del tallo: 0.42 cm Color: verde	Altura: 11.5 cm Grosor del tallo: 0.33 Color: verde amarillo	Altura: 8.4 cm Grosor del tallo: 0.17cm Color: amarillo

CONCLUSIONES

Como se pudo observar, los biotratamientos elaborados a partir de un hongo promotor de crecimiento son efectivos para tratar de mejorar las diferentes características de las plantas, son de gran ayuda para que se puedan fortalecer en su crecimiento, grosor del tallo y pigmentación en comparación de las que no son tratadas con los ellos. Es muy importante resaltar la efectividad del tratamiento y que puede servir en plantas de jitomate pues es un cultivo de gran interés agrícola por su alta demanda de consumo, además que esto representa una alternativa para los agricultores que necesitan la mejora de sus cultivos ya que esta reacciona positivamente al tratamiento, mostrando mejoras visuales muy importantes, no muestra crecimiento de patógenos, además de que los tiempos de crecimiento son mayores que el de la planta normal. Los resultados a nivel invernadero nos pueden dar pauta para futuras investigaciones en frutos, y raíces para evaluar la efectividad de este biotratamiento y ver si es apto para el consumo humano y sea una alternativa para evitar el uso de pesticidas que deterioran nuestros ecosistemas y nuestra salud.

BIBLIOGRAFIA

- Agrios, G.N. 1988. Plant Pathology. Third Edition. Academic Press. New York. 803 pp
- Agrios, G .N, 2005, fitopatología, 2da edición. México, Limusa, 952 p.
- Gonzalez. L. gC. 1985. Introduccion a la fitopatología. 1a, ed. 4a, reimpresión. San jose de Costa Rica. IICA. [Consultado julio 2017].
- Lumsden, R.D., Lewis, J.A., García, E.R. & Frías, T.G. 1981. Suppression of pathogens in soils from traditional Mexican agricultural systems. Phytopathology 71: 891-892.
- National Academy of Sciences. 1980. Desarrollo y Control de las Enfermedades de las Plantas. Control de Plagas de Plantas y Animales. Vol 1. Editorial Limusa. México. 223 pp.

VCRC CARACTERIZACIÓN DE BIOPOLÍMEROS SINTETIZADOS POR BACTERIAS AISLADOS EN SUELOS CONTAMINADOS CON METALES PESADOS DE XICHÚ GUANAJUATO

Victoria Guadalupe Delgado Perez¹ y Ma. Elena Calixto Olalde²

RESUMEN

El propósito principal de este trabajo fue caracterizar el polímero PHB (ácido hidroxibutírico) producido por la cepa *Cupriavidus necator* DMS 5536, usando fructuosa como fuente de carbono. La caracterización consistió en la identificación química mediante FT-IR y determinación de peso molecular por viscosimetría capilar. Los resultados obtenidos en FTIR corresponden a lo reportados en la literatura para este polímero y el valor obtenido del peso molecular fue de $(3 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1})$. El rendimiento obtenido con respecto a la cantidad de células llegó a duplicarse, como resultado de una mayor oxigenación en el medio, mientras que el porcentaje de polímero extraído llegó a ser de hasta un 90%.

ABSTRACT

The main purpose of this work was to characterize the PHB (hydroxybutyric acid) polymer produced by the strain *Cupriavidus necator* DMS 5536, using fructose as the carbon source. The characterization consisted in the chemical identification by FT-IR and determination of molecular weight by capillary viscosimetry. The results obtained in FTIR correspond to those reported in the literature for this polymer and the obtained value of the molecular weight was $(3 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1})$. The yield obtained with respect to the number of cells doubled as a result of increased oxygenation in the medium, while the percentage of polymer extracted was up to 90%.

Molecular mass or molecular weight is the mass of a molecule, Viscometer, Strain in microbiology.

INTRODUCCIÓN

Actualmente los polímeros sintéticos se encuentran presentes de manera muy marcada en la vida cotidiana, debido a su durabilidad, facilidad de moldeo, bajo costo y resistencia a la biodegradación, convirtiéndose en una industria muy amplia la cual maneja altas demandas, siendo los polímeros producidos a partir de fracciones de petróleo crudo los más comúnmente utilizados en el mercado; Estos no son renovables y tardan varias décadas en degradarse, lo que implica una acumulación excesiva en el medio ambiente que no se resuelve solo con el reciclaje de los plásticos debido a que ofrece posibilidades limitadas mientras que la incineración pueden producir compuestos tóxicos, motivos por los que se ha estado buscando fuentes alternativas y renovables que produzcan polímeros biodegradables con propiedades similares a los polímeros sintéticos, siendo uno de los polímeros más estudiados el PHB que es naturalmente sintetizado por una variedad de organismos diferentes los cuales son considerados recursos renovables (Koller M. Bona R. 2005). Las bacterias, productoras de PHB lo originan a menudo bajo condiciones de crecimiento desequilibradas y lo acumulan en gránulos en el citoplasma como carbono intracelular o compuestos de almacenamiento de energía, siendo aproximadamente 150 constituyentes de PHB los que han sido identificados. Esta gran diversidad de monómeros proporciona un amplio espectro de polímeros con propiedades físicas y mecánicas variables, desde polímeros cristalinos duros hasta cauchos elásticos, los cuales dependen de las unidades monoméricas incorporadas (Teinbu Chel A 1996). Motivo por el que es conveniente evaluar las características del polímero producido.

MARCO TEORICO

Actualmente existen mercados interesados en el desarrollo de plásticos biodegradables producidos a partir de fuentes renovables de energía, que pretenden sustituir a los plásticos desechables, con el fin de reducir la contaminación. Motivo por el cual se ha comenzado a ampliar el campo de estudio de microorganismos tales como (*Ralstonia metallidurans*, *Bacillus megaterium* o *Copriavidus necator*) los cuales que tiene la capacidad de producir polímeros con las características necesarias para cubrir estos requerimientos.

¹Instituto Tecnológico Superior de Irapuato, Departamento de ingeniería en materiales; Carretera. Irapuato- Silao Km. 12.5, C.P: 36821, Irapuato, Guanajuato, viky94delgado@gmail.com

²Instituto Superior de Irapuato, Departamento de Ingeniería en Materiales; Domicilio, Carretera Irapuato. Silao Km. 12.5, El copal C.P: 36821, Irapuato, Guanajuato Ma.calixto@itesi.edu.itesi.mx

Entre los microorganismos antes mencionados existe una bacteria denominada *Copriavidus necator* la cual es una bacteria oxidante del hidrógeno, capaz de adaptarse fácilmente a estilos de vida tanto heterotróficos como autotróficos utilizando compuestos orgánicos como el hidrógeno como fuente de energía, (Pohlmann, A., Fricke, W. 2006). *C. necator* tiene la capacidad de realizar respiración aeróbica o anaeróbica mediante la desnitrificación de nitrato y / o nitrito a nitrógeno gaseoso (Cramm, R. 2009). Además de que tiene la habilidad de fijar el carbono a través de la vía de fosfato de pentosa. (Bowien, B.; Kusian, B. 2002). lo que le permite producir plásticos de polihidroxialcanoato (PHB) cuando se expone a cantidades en exceso de sustrato de azúcar; permitiendo que el PHB se acumule a niveles de hasta alrededor del 90% del peso seco de la célula.; motivo por el que una gran cantidad de investigadores pretenden aprovechar la conducta de estos microorganismos para extraer el PHB, el cual es un polímero semicristalino, isotáctico a base de ácido (R)-3-hidroxibutírico, con un punto de fusión, cercano a los 180 °C, un módulo de Young que puede llegar a ser de hasta (3.5GPa) y una resistencia a la tensión que alcanza valores de hasta (43MPa) (Chodack I. 2002). Características que hacen que el PHB presente propiedades muy similares a las de los termoplásticos sintéticos, además de que es totalmente biodegradable y biocompatible, por lo que se ha estado analizado su uso potencial como alternativa a los plásticos artificiales en algunas aplicaciones de pintura, embalaje y medicina (Robert J. Young and peter A. Lovell 2011); A pesar de esto, las propiedades del polímero pueden variar en forma precipitada debido a las características estructurales del polímero tales como su un grado de polimerización (n), su temperatura de transición vítrea y su peso molecular pueden variar de entre (2,500-10,000)g/mol y de (0 a 30)°C, (1×10^4 - 1×10^6) g mol⁻¹ (Roland Alexander Durner 1998) respectivamente; Siendo estas las que determinan el comportamiento mecánico del polímero y que al mismo tiempo se ven afectadas por diversos factores como (el método de cultivo, la fuente de carbono utilizada para nutrir el medio, las concentraciones utilizadas en el cultivo, entre otros), motivo por el que en este trabajo se procedió a estudiar el desempeño de las propiedades del polímero producido por la bacteria *Copriavidus necator* a partir del análisis del peso molecular producido por la bacteria, cuando esta es nutrida con fructuosa, ya que el peso molecular es el principal factor estructural que rige la conducta de un polímero y el desempeño de sus propiedades físicas y mecánicas.

MÉTODOS Y MATERIALES

Microorganismo: A lo largo de este trabajo se utilizó una bacteria denominada *Copriavidus necator* (ralstonia eutropha) DMS 5536 proveniente de Sierra de Lobos, la cual fue proporcionada y conservada por el cepario del departamento de biología del Instituto Superior de Irapuato (ITESI) en cajas Petri con medio LB solido a 4 °C.

Preparación de los medios de cultivo y crecimiento: Para el proceso de crecimiento de la bacteria se prepararon 25 mL de medio LB líquido, con concentraciones de 5g/L de peptona marca divico, 2 g/L de extracto de, levadura, marca Divico y 5g/L NaCl con una pureza del 99%, marca Faga lab, mientras que para el medio de crecimiento y producción de PHB se prepararon 2L con concentraciones de 0.5g/L de NH₄Cl con una pureza del 99.9%, marca Fer mont, 2.3g/L de KH₂PO₄ cristalino con pureza del 99.5% marca J.T. Baker, 2.3g/L de Na₂HPO₄ con de pureza del 98% marca Meyer, 0.5g/L de MgSO₄ heptahidratado con pureza del 98% marca Meyer, 0.5g/L de NaHCO₃ con pureza de 99.7% marca Resol, 0.5 de citrato férrico grado técnico marca Sigma Aldrich, 0.01g/L de CaCl₂ y 20g/L de Fructosa marca Resol.

Inoculación: Se transfirió la sepa al primer medio de cultivo (LB) en estado líquido, del cual se prepararon 25 ml, en matraces Erlenmeyer de 50ml los cuales fueron tapados con aluminio, después de a ver sido inoculados y posteriormente, agitados en un dispositivo shaker a 120 rpm, por un periodo de tiempo de 72hrs. suficiente para que la solución se tornara turbia a causa del crecimiento de la bacteria e inmediatamente después de a ver terminado el período de agitación se procedió a tomar 2 mL de la solución LB para transferirla a el segundo medio de crecimiento del cual se prepararon 2 soluciones de 500ml en matraces Erlenmeyer de 2L, y en la segunda ocasión se prepararon 6 soluciones de 166.5 mL en 6 matraces Erlenmeyer de 500mL los cuales de igual manera fueron tapados con aluminio, y agitados en un dispositivo Shaker a 120 rpm. Pero en esta ocasión por un periodo de 130 hrs, para consecutivamente continuar con la lisis.

Método de extracción: Se procedió a trabajar con la lisis por medio de detergentes, la cual fue complementada con otros métodos, para mejorar su eficiencia, los pasos seguidos fueron, colocar la solución obtenida de los medios de crecimiento en tubos falcón de 45ml. para posteriormente centrifugar los en una centrífuga de marca Hettich modelo MIKRO 200/200R, (con el fin de sedimentar, las bacterias presentes en el medio), después de verse sedimentado se procedió a retirar el líquido sobrante y tomar 10ml de solución SDS al 1% la cual utilizamos para Re-suspender las bacterias sedimentadas, esto con el fin de acelerar el proceso de ruptura de la bacteria, ya que el SDS actúa como un surfactante; Luego de re-suspender la bacterias sedimentadas, se tomaron alrededor 25 perlas de vidrio las cuales fueron colocadas en los tubos falcón, que inmediatamente fueron cerrados y sometidos a vortex en un agitador de marca HEATHROW SCIENTIFIC y modelo HS-120209 durante un período de 5 minutos a 1000 rpm. Y consecutivamente se colocaron los tubos en baño maría dentro de un vaso de precipitado de 2L con agua, la cual fue calentada a 80°C con ayuda de un termo-agitador, marca Arsa modelo AR-313 durante una hora y luego se dejó enfriar al aire alrededor de 45min o hasta que la temperatura de los tubos bajara a 30 °C, lo que permitió la salida del material intracelular; el cual fue separado de la siguiente manera, se colocaron 10mL de cloroformo (CHCl₃) en los tubos falcón que contenían a las bacterias, y las esferas de vidrio para posteriormente aplicarles 2 min de vortex en un agitador de marca HEATHROW SCIENTIFIC y modelo HS-120209 a 1000 rpm, al término de la agitación, se vaciaron las soluciones en un embudo de separación, con tapa de vidrio de 250ml el cual fue agitado 3 veces para liberar la presión, posteriormente se procedió a descargar en un tubo falcón la fase más clara de la solución, repitiéndose dos veces este procedimiento de lavado en la solución con el surfactante, luego de terminar los lavados, se eliminó el cloroformo, con dos métodos distintos, primero fue con un Rotavapor de 1000 ml y modelo RE100-PRO a el cual le adaptamos un matraz bola de 50ml con la finalidad de reducir el are de donde se raspo el polímero obtenido, para finalmente vaciarlo en tubos Eppendorf, mientras que el segundo consto de dejar reposar el tubo Falcón con la solución obtenida y sin tapa en un horno con una temperatura de 70°C durante un periodo de 12 horas, con la finalidad de volatilizar el solvente, y posteriormente rasparle polímero obtenido y vaciar en tubos Eppendorf, en los cuales se almacenaron las muestra hasta el momento de su análisis.

Caracterización por Infrarrojo: Las muestras fueron preparadas con bromuro de potasio y corridas en un equipo Spectrum 2000 con un rango de 4000-500 cm⁻¹ teniendo como finalidad de analizar la estructura química del material extraído y de esta manera corroborar que es PHB.

Caracterización por Viscosimetría: El peso molecular se determinó con un viscosímetros Oswald, el cual se colocó dentro de un vaso de precipitado de 2L con agua en forma totalmente perpendicular a la base del vaso, que estaba sobre una parrilla de agitación mientras era sostenido con unas pinzas de tres dedos las cuales estaban montadas en una de las barra de un soporte universal doble, al mismo tiempo que el agua se agitaba con un agitador magnético y se reguló la temperatura del sistema a 30°C con un termómetro montado en la segunda barra del soporte universal doble; como se muestra en la (Figura 1) ubicada en la parte inferior.



(Figura 1) Sistema montado

Después de montar el sistema se prepararon 5 soluciones de (CHCl₃) cloroformo con concentraciones de (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1) g/dl de PHB respectivamente de las cuales se tomaron 3ml de cada una para realizar la medición, iniciando con la medición del tiempo de caída del solvente puro para continuar con cada una de las diluciones, el viscosímetro fue lavado con cetona y secado con aire entre cada una de las mediciones, la temperatura del sistema era monitoreada con ayuda de un termómetro y un pirómetro electrónico y los tiempos de caída fueron medidos con ayuda de un cronómetro de marca (Healteacher) y se midió el tiempo de caída 5 veces por cada muestra arrojando los resultados presentes en la (Figura 2)

Solvente	C(1)	C(2)	C(3)	C(4)	C(5)
36.998	37.32	37.906	38.8	40.086	41.504

(Figura 2) Tiempos de caída promedio

Con los valores obtenidos se procedió a manejar la nomenclatura propuesta por la (Unión internacional 1952), a partir de la aplicación de la ecuación presente en la (Ecuación 1).

$$n_{esp} = \frac{n - n^0}{n^0} = \frac{t - t^0}{t^0}$$

(Ecuación 1) Viscosidad específica, nomenclatura de la unión internacional 1962

Después de obtener el valor de la viscosidad específica se procedió a calcular el peso molecular del polímero a partir de la (Ecuación 2), tomando como valores de [K] y [a], (1.18x10⁻³) y (0.78) respectivamente [6].

$$[\eta]^{0C}_{CHCl_3} = K [Mv]^a$$

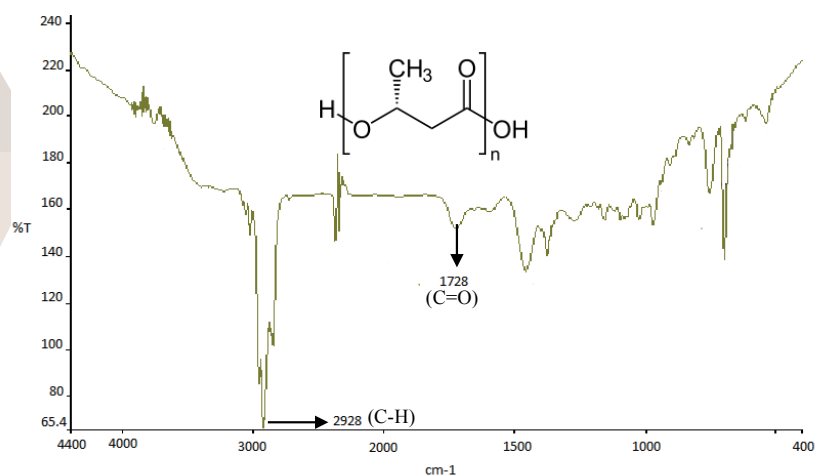
(Ecuación 2) Relación entre viscosidad y peso molecular

RESULTADOS

Efecto del método de extracción en el rendimiento: El PHB producido por la bacteria *Copriavidus necator* puede acumularse a niveles de hasta alrededor del 90% del peso seco de la célula por lo que, para determinar el rendimiento de los dos métodos de extracción utilizados en este trabajo, se pesaron las células obtenidas después de cada

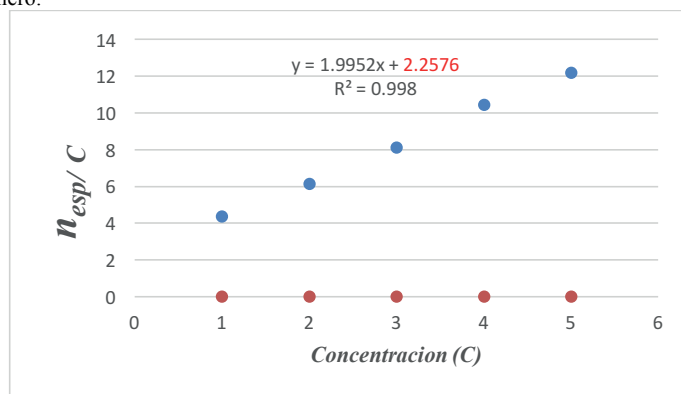
centrifugación y se consideraron los gramos de PHB obtenidos por extracción dando como resultado un 90% de eficiencia entre cada extracción, cuando es utilizado el rota vapor a diferencia de cuando se utilizó el horno del cual se obtuvo un rendimiento de alrededor del 80%, de acuerdo a los resultados, se llega a la conclusión de que el rota vapor es el método de extracción más eficiente, efecto que puede verse atribuido a que este equipo tiene la capacidad de eliminar los solventes a bajas temperaturas, lo que evita la descomposición del polímero, mientras que al extraer el solvente con el horno cabe la posibilidad de que cierto porcentaje de polímero se degrade. Además de que se logró comprobar que la cantidad de oxígeno presente en los medios, proporciona a las bacterias un medio idóneo de crecimiento, por lo que se obtuvo casi el doble del rendimiento en el método que se utilizaron 6 matraces de 500mL en comparación con en el método en el que se usaron 2 matraces de 2L, esto sin afectar las propiedades estructurales del polímero extraído.

FTIR: Se realizó un FTIR al producto extraído, en busca de las principales bandas características del PHB, las cuales son 1728 cm⁻¹ (C=O), 2928 cm⁻¹ (C-H), estas bandas se encontraron presentes en el espectro (Figura 3) lo que permitió confirmar que efectivamente el producto extraído es PHB.



(Figura 3). Espectro infrarrojo obtenido del análisis donde se observan las principales bandas del PHB

Peso molecular: Los resultados de viscosidad obtenidos de cada solución, con respecto a su concentración se muestra en la (Figura 4) de la cual se tomó el valor de (b) obtenido en la ecuación de la recta como el valor de viscosidad específica del polímero.



(Figura 4) Nomenclatura UI

La viscosidad específica derivada de la gráfica sirvió para determinar el peso molecular del PHB, obteniendo un valor de $(3 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1})$ el cual se encuentra dentro del intervalo de pesos moleculares reportados para este polímero, siendo el rango de $(1 \times 10^4 - 1 \times 10^6) \text{ g mol}^{-1}$ motivo por el que se puede considerar usar este método para obtener pesos moleculares medios, los cuales son requeridos en ciertas aplicaciones como por ejemplo en dispositivos de renegación ósea que sean biodegradables, en jabones, en champús, en tintes, en maquillaje, empaques alimenticios entre otros; Debido a que los pesos moleculares medios suelen ser suficientemente resistentes como para realizar las funciones correspondientes antes de llegar a comenzar a sufrir degradación, por lo que son perfectos para ser utilizados dentro de áreas como (Biomedicina, higiene personal, Alimenticia, etc.).

CONCLUSIONES

La bacteria *Copriavidus necator* tiene la capacidad de producir PHB con pesos moleculares medios a los reportados en la literatura cuando se utiliza fructuosa como principal fuente de carbono siendo una de las más recomendables para producir lo, esto puede ser corroborado por (Barbosa Marcela 2005). Además, se logró demostrar que la cantidad de aire presente en los medios no afecta directamente a las propiedades del polímero solo a la producción de bacterias, lo que nos permite afirmar que entre mayor sea la cantidad de oxígeno en el medio, mayor será la producción celular, y que para obtener un rendimiento mayor de PHB al momento de la extracción es recomendado utilizar equipos similares al rotavapor que manejen la evaporación de solventes a bajas temperaturas.

BIBLIOGRAFÍAS

[1] Roland Alexander Durner (1998) Accumulation of bioplastic in *pseudomonas oleovorans*, ETH No. 12591 Zurich.

- [2] Robert J. Young and Peter A. Lovell (2011) Introduction to polymers 3ra edición Editorial Taylor y Francis group.
- [3] Koenig GJM, (1993) prospecto of bacterial PHB, TU Eindhoven.
- [4] Chodack I. (2002), Polyhydroxyalkanoates: properties and modification for high volumen applicaation. In: Scott G, editor. Degradable polymer, principles and aplicacions 2nd ed. Dordrech, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers;

Artículos de libros

- [5] Pohlmann, A., Fricke, W., Reinecke, F., Kusian, B., Liesegang, H., Cramm, R., Eitingen, T., Ewering, C., Potter, M., Schwartz, E., Strittmatter, A., Vob, I., Gottschalk, G., Steinbuchel, A., Friedrich, B. and Bowien, B. (2006). "Genome sequence of the bioplastic-producing Knallgas bacterium *Ralstonia eutropha* H16". *Nature Biotechnology*. [pp. 1257–1262.].
- [6] Zdeno Spitalsky, Igor Lacík, Elena Lathová, Ivica Janigová, Ivan Chodák en *Polimer degradation and stability* (2005) Controlled degradation of polyhydroxybutyrate via alcoholysis with ethylene glycol or glycerol, (Elsevier) [pp. 856-861].
- Roland Alexander Durner (1998) Accumulation of bioplastic in *Pseudomonas oleovorans*, Yamane, T., Chen, X.F. and
- [7] Ueda, S., (1996). Growth-associated production of poly(3-hydroxyvalerate) from n-pentanol by a methylotrophic bacterium, *Paracoccus denitrificans*. *Appl. Environ. Microbiol.*, [pp. 380-384].
- [8] Ward, A.C., Rowley, B.I. and Dawes, E.A., (1977). Effect of oxygen and nitrogen limitation on poly-β-hydroxybutyrate biosynthesis in ammonium-grown *Azotobacter beijerinckii*. *J. Gen. Microbiol.*, [pp. 61-68].

Artículos de revista

- [9] Bello Gil, Daniel; Brandl, Helmut (2007) Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, vol. XLI, núm. 2, en revista *icidca*. pp. 10-18

Artículos en línea

- [10] Cramm, R. (2009). "Genomic View of Energy Metabolism in *Ralstonia eutropha* H16". *J Mol Microbiol Biotechnol*. 38–52. Consultada en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1895786>. (fecha de consulta (23-06-2017)).
- [11] Bowien, B.; Kusian, B. (2002). "Genetics and control of CO₂ assimilation in the chemoautotroph *Ralstonia eutropha*". *Arch Microbiol*. 85–93. Consultada en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12115053> (fecha de consulta (20-06-2017)).
- Spiekermann, P.; Rehm, B.; Kalscheuer, R.; Baumeister, D. & Steinbuchel A. (1999). "A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other
- [12] lipid storage compounds". *Arch Microbiol*. Consultada en <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs002030050681> (fecha de consulta (25-06-2017)).

"OPTIMIZACIÓN DEL TRATAMIENTO DEL AGUA DE POZO UBICADO EN EL ITSMEM SEGÚN SUS CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS Y BACTERIOLÓGICAS PARA USOS DIVERSOS"

Axel Arnulfo Pérez Zamora¹ y Adriana Hernández Córdova².

RESUMEN

Este proyecto contiene información sobre la calidad del agua incluyendo todas las propiedades que esta debe tener. Además, de acuerdo a los análisis fisicoquímicos realizados al agua de pozo que se encuentra dentro de las instalaciones del ITSMEM, se proponen diferentes métodos para que esta agua alcance la calidad óptima para nuestros fines, también se presentan de manera clara las ventajas y desventajas en la utilización del agua con alto contenido de azufre y como contrarrestar éste para fines de riego de jardines del ITSMEM y otros probables usos.

ABSTRACT

This project contains information on water quality including all the properties it should have. In addition, according to the physicochemical analyzes performed to the well water that is inside the ITSMEM facilities, different methods are proposed so that this water reaches the optimum quality for our purposes, also the advantages and disadvantages in The use of water with a high content of sulfur and how to counteract it for irrigation purposes of ITSMEM gardens and other probable uses.

Palabras clave: PH, Conductividad, Solidos totales disueltos, salinidad, azufre, tratamiento de agua.

INTRODUCCION

Este proyecto consta de una propuesta en la cual se realizó una investigación sobre la optimización de tratamientos de agua y los posibles usos del agua del instituto partiendo del análisis físico-químico y bacteriológico, con el objetivo de lograr usar el agua con la seguridad de que cuenta con la calidad necesaria para el riego y algunos usos alternativos.

MARCO TEORICO

El principal problema que afecta la calidad del agua de riego es la salinidad. Cuando hablamos de salinidad nos referimos a la conductividad eléctrica (CE), usada comúnmente en la agricultura y jardinería.

Un nivel alto de salinidad del agua reduce el rendimiento de los cultivos, aunque distintas plantas y cultivos varían su tolerancia a la salinidad. A continuación se presenta una tabla con cultivos según la tolerancia a la salinidad.

Tabla. 1. Clasificación de los cultivos según la tolerancia al riego con aguas salinas (Hass y Hoffman, 1977):

	Tolerantes	Muy tolerantes
CE (µS/cm) límite de tolerancia	1.300 – 4.000	2.700 – 5.300
Cultivos	Alfalfa, Espinacas, Tomate, Brócoli, Granada, Olivo, Higuera, Soja, Trigo	Remolacha, Algodón, Cebada grano, Remolacha azucarera, Sorgo, Trigo, Soja

La salinidad se mide en un conductivímetro y el parámetro más común para determinarla es el dS/m (dS=deciSiemens).

- Entre 0 y 2 dS/m: Tolerable para casi cualquier tipo de planta o cultivo.
- Entre 2 y 4dS/m: Limitante para algunos cultivos y plantas sensibles a la salinidad.
- Entre 4 y 8 dS/m: Pocas especies son resistentes.
- Superior a 8 dS/m: Altamente salina.

La desalinización puede realizarse por medio de diversos procedimientos, entre los que se pueden citar:

- Ósmosis inversa
- Destilación
- Congelación
- Evaporación relámpago
- Formación de hidratos

Habitualmente los parámetros que componen al agua con calidad de riego son las siguientes:

Tabla. 2. Parámetros de Calidad

Parámetros de Calidad	Símbolo	Unidad	Intervalo usual
Conductividad eléctrica	CE a 25°C	μS/cm	0-3000
	CE a 25°C	dS/cm	0-3
Materia Disuelta Total	MDT	mg/l	0-2000
Calcio	Ca ²⁺	mg/l	0-400
Magnesio	Mg ²⁺	mg/l	0-60
Sodio	Na ⁺	mg/l	0-900
Carbonatos	CO ₂ -3	mg/l	0-3
Bicarbonatos	HCO ₃ -	mg/l	0-600
Cloruros	Cl ⁻	mg/l	0-1100
Sulfatos	SO ₂ -4	mg/l	0-1000
Boro	B	mg/l	0-2
pH	pH	-	6.5-8.5
SAR	SAR	-	0-15

Dureza. Las aguas con menos de 50 ppm de CaCO₃ se llaman blandas, hasta 100 ppm de CaCO₃, ligeramente duras, hasta 200 ppm de CaCO₃, moderadamente duras, y a partir de 200 ppm de CaCO₃, muy duras.

Lo frecuente es encontrar aguas con menos de 300 ppm de carbonato cálcico, pero pueden llegar hasta 1000 ppm e incluso hasta 2000 ppm.

La eliminación de la dureza se hace, principalmente, por descalcificación o ablandamiento por intercambio iónico con resinas.

El azufre es un nutriente esencial para el crecimiento vegetal. En los últimos años, las deficiencias de este nutriente se han vuelto más frecuentes y la importancia del azufre en la producción de cultivos es cada vez más reconocida. Por mucho tiempo fue considerado como un nutriente secundario, pero ahora se está convirtiendo como el 'cuarto macronutriente' más reconocido, junto con el nitrógeno, fósforo y potasio.

Las oleaginosas, leguminosas, forrajes y algunas hortalizas requieren azufre en cantidades considerables. En muchos cultivos su cantidad en la planta es similar a la del fósforo.

El tratamiento del azufre en el agua del pozo se puede hacer en una variedad de formas, desde la aireación de los tratamientos con cloro.

Instrucciones

1 Usar un kit de prueba de agua para determinar el nivel de pH y el contenido de azufre en el agua. La lectura de la prueba del agua va a determinar el mejor tipo de filtración para su bienestar.

2 Instalar un sistema de filtración de aireación para los niveles más bajos de azufre en el agua. La aireación se separa el azufre del agua y ventila en el aire fuera del pozo. Esto puede hacer que el área fuera de su bien con el olfato, pero el agua en sí ya no tendrá un olor a azufre. La aireación no requiere productos químicos y es más seguro para el medio ambiente.

3 Tratar a mayores niveles de azufre en el agua con un sistema de cloro. Una bomba de alimentación química continua puede ser instalada y programada para inyectar la cantidad correcta de cloro en el agua, basado en su consumo de agua.

4 Retire el azufre del agua potable con un filtro de arena verde de manganeso. El filtro de arena verde de manganeso oxida el azufre en el agua, convirtiéndose en partículas sólidas que luego son filtrados fuera del agua.

5 Utilice un filtro de carbón activado para eliminar los bajos niveles de azufre a partir de su agua. Debido a que el carbón activado sólo puede eliminar pequeñas cantidades de azufre, este tipo de filtro tiene que ser mantenido regularmente.

METODOLOGÍA

La investigación se llevó a cabo usando la técnica de investigación aplicada buscando resolver de manera rápida y concreta los problemas que presenta el agua del ITSMEM los cuales son el exceso de sal y la dureza de la misma. Además de la investigación Cuasi-experimental en el cual se manipulan algunas variables para obtener datos sobre los resultados esperados esto en base a las propiedades presentes en el agua.

RESULTADOS Y DISCUSION

Gracias a la investigación realizada en diferentes fuentes se logró obtener información precisa sobre la calidad del agua tomando en cuenta puntos como el azufre en el agua, la conductividad (salinidad), la dureza, además de encontrar algunos usos alternos y procesos para mejorar la calidad del agua, a continuación se presenta una tabla con los resultados obtenidos.

Tabla. 3. Resultados Obtenidos

OBJETIVOS	RESULTADOS
1. Posibles usos que se le puede dar al agua de pozo dentro de las instalaciones del ITSMEM con las características fisicoquímicas establecidas en el reporte de análisis fisicoquímico y el alto contenido de azufre.	De acuerdo a la investigación realizada se encontró dentro de las posibilidades usar el agua tal y como esta para riego, aunque es riesgosa se encontraron algunos cultivos que son tolerantes a la salinidad en altas cantidades. Además se encontró posible el uso del agua para la crianza de especies acuáticas, a pesar de que no tiene mucha relación con el ITSMEM es un uso del cual se podría sacar algún beneficio. En cuanto al alto contenido de azufre se encontró que es de gran beneficencia para las plantas y cultivos, y para lograr eliminar el mal olor con el proceso de aireación y tratamientos con cloro.
2. Buscar también las características que debería tener el agua para poder utilizarla y de acuerdo a esto, buscar y proponer algún equipo de tratamiento de agua que se pueda adaptar a la cisterna que contiene el agua de pozo.	Se obtuvo información sobre las características que debe tener el agua adecuada para el riego y se observó que el agua del ITSMEM tiene un valor de conductividad muy elevado al igual que el de la dureza por lo que se propone utilizar procesos de desalinización como la osmosis inversa, destilación, congelación y formación de hidratos y de abundamiento del agua que se lleva a cabo con un descalcificador mediante resinas de intercambio iónico.

CONCLUSIONES

De acuerdo a la investigación recabada para la elaboración de este proyecto se pudieron obtener datos importantes para la utilización del agua del ITSMEM de manera que se llegó a la conclusión de que el agua del instituto está en condiciones inapropiadas para el riego de cultivo y jardines, pero existe la posibilidad de usarse en algunos cultivos resistentes a la salinidad y gracias a esto se propone la formación de un huerto que pueda dar cosechas benéficas para el instituto y además que sirva de práctica para las nuevas tecnologías agrícolas que existen en el mundo.

Por otra parte se encontraron procesos con los cuales se puede tratar el agua hasta ser de calidad para el riego de cualquier cultivo, entre estos procesos se encontraron de desalinización como la osmosis inversa, destilación, congelación y formación de hidratos y de abundamiento del agua que se lleva a cabo con un descalcificador mediante resinas de intercambio iónico, proceso de aireación y tratamientos con cloro. Los procesos anteriores se llevan a cabo mediante equipos que constan de filtros, bombas, etc. Además se obtuvieron las siguientes recomendaciones para trabajar el riego con aguas saladas, el riego debe ser abundante y poco frecuente, regar por la noche o temprano por la mañana para evitar la pérdida por evaporación y la concentración de sales en las hojas, regar por goteo es mejor que regar por aspersión, no se debe regar bajo condiciones de viento o calor.

En conclusión este proyecto reafirma que la optimización del agua es de suma importancia y que es necesario siempre tener en cuenta las propiedades presentes en el agua para poder usar las herramientas, métodos o procedimientos necesarios para tener los beneficios esperados.

BIBLIOGRAFIA

Castro Cosio, M. (1 de marzo de 2012). *slideshare*. Recuperado el 18 de agosto de 2017, de calidad del agua para riego: <https://es.slideshare.net/Mauriciocastrocosio/calidad-del-agua-para-riego-11821593>

Melendez, L. (19 de mayo de 2014). *HORTALIZAS*. Recuperado el 17 de agosto de 2017, de Manejo de agua con alto contenido de sales solubles: <https://es.slideshare.net/Mauriciocastrocosio/calidad-del-agua-para-riego-11821593>

Romero, B. (8 de febrero de 2016). *Gidahatari, gestion sostenible del agua*. Recuperado el 15 de agosto de 2017, de Si el contenido de azufre en el agua de un pozo es un poco alto, ¿sigue siendo segura para beber?: <http://gidahatari.com/ih-es/si-el-contenido-de-azufre-en-el-agua-de-un-pozo-es-un-poco-alto-sigue-siendo-segura-para-beber>.

<https://es.slideshare.net/Mauriciocastrocosio/calidad-del-agua-para-riego-11821593>

C. Dorronsoro. Contaminación de suelos por sales solubles. Universidad de Granada, 2001.

PILAS MICROBIANAS CREANDO ENERGÍA CON AGUAS RESIDUALES

José Miguel Ferriño Guerrero ¹ y Baruck Francisco Alvarado ²

RESUMEN

Las baterías microbianas, son el objeto central de esta investigación, se presentan como una nueva propuesta para la creciente demanda social y tecnología que el hombre ha desarrollado en aparatos de uso doméstico y uso diario de comunicación. Estas pilas funcionan a través de energías renovables, se analiza cada una de las energías renovables para elegir la más viable, después de iniciar y explicar la aplicación de la energía eléctrica generada a través de las aguas residuales como la mejor opción encontrada hasta el momento, se explica la medición y los resultados obtenidos con los prototipos generados a partir de la implementación de la energía eléctrica generada a través de las aguas residuales.

ABSTRACT

Microbionic batteries, the central object of this research, are presented as a new proposal for the growing social demand and technology that man has developed in everyday communication devices, these batteries operate through renewable energies. Each renewable energy is analyzed to choose the most viable. After starting and explaining the application of the electric energy generated through the wastewater as the best opinion found so far it explains the measurement and the results obtained with the prototypes generated from the implementation of the electric energy generated through the wastewater.

Palabras Clave: microbianas , energía , fuentes, ambiente ,renovable

INTRODUCCIÓN

El cuidado del medio ambiente debe ser un tema prioritario en cuestión de políticas públicas puesto que son muchos los problemas ambientales que hoy en día nos aquejan y que hacen cada vez más evidente las consecuencias de la irresponsable forma en que nuestra civilización se ha ido desarrollando. En el presente trabajo se hace una investigación de la creación de pilas de combustible microbianas (MFCS) funcionando con aguas residuales. Haciendo posible este proyecto en la ciudad de Aguascalientes, Aguascalientes, trabajando en las instalaciones del instituto tecnológico de Aguascalientes, por parte del El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt).

Este tipo de actividades son necesarias para el buen desarrollo de las ciudades en crecimiento ya que de esta forma ayuda a crecer de una manera más ordenada y sin descuidar las situaciones que son un problema en la actualidad porque si no se atienden a la brevedad seguirán agravándose y haciéndose más difíciles de solucionar. Se busca que de forma más natural logremos crear energía eléctrica para así mismo no agotar y saturar los recursos que se tiene actualmente, se le llama nueva modalidad a las energías renovables pues muchas de ellas aun no son descubiertas o se inician los procesos de creación, Revisando la historia la historia encontramos que desarrollo sustentable ha adquirido peso e importancia para cualquier institución y la sociedad, pues todos queremos tener una calidad de vida integra pero también poderles proporcionar de esta a los futuros pobladores.

JUSTIFICACION

El tema de nuestra investigación son las pilas de combustible microbianas es un tema relativamente nuevo, por eso es importante hacer mención que esta investigación es amplia y de interés progresivo por la necesidad de una creciente demanda ecológica para poder crear energía eléctrica, la energía generada por estas baterías, abastecerá los aparatos de uso cotidiano. Por tal motivo las pilas de combustible microbianas surgen para presentar a la sociedad una alternativa ecológica que permitirá abastecer de electricidad de uso cotidiano siendo así un fomento al público a la inclinación de elección por productos ecológicos, creando así, una conciencia por prácticas que protejan al medio ambiente y al mismo tiempo satisfacer las necesidades básicas de las personas.

Con este proyecto también se incorpora la ciencia aplicada para satisfacer demandas de la creciente entienda de índole social, empresarial y ecológico. Se eligió porque es necesario para el desarrollo de las nuevas energías renovables, así mismo, dando el primer paso para conocer y abastecer la electricidad de manera diferente a lo tradicional, cabe mencionar que esta investigación se basa en poder lograr hacer uso de ella para abastecer aparatos electrónicos, por ejemplo los celulares, computadoras, planchas, etc. Es importante conocer sobre el tema porque este nos guíara a un futuro y saber cómo desempeñarse eficientemente y con un desarrollo sustentable, garantizando

así en la nueva producción para aparatos de uso cotidiano. Los grandes avances tecnológicos son el mejor intento del hombre por imitar la perfección de la naturaleza.

MARCO TEORICO

Existe un conjunto de gases que cambian la capacidad del planeta de enfriarse o calentarse alterando así los ciclos y patrones climáticos que hasta el siglo pasado estaban de cierta forma estable. Tales ciclos y patrones climáticos habían estado estables por gran parte de la historia conocida del ser humano, pero ahora están siendo afectados; por primera vez en la historia, por la actividad humana, este tipo de evento nunca se habían experimentado en la tierra y hemos llegado a un punto de inflexión en el cual ya nos será muy difícil revertir estos efectos sobre el planeta tierra. Dichos efectos son tan variados como intensos, y van desde el calentamiento generalizado en el planeta, el aumento de las temperaturas en los polos, el efecto el niño más intenso y con mayor regularidad, huracanes cada vez más potentes y destructivos, y por último el aumento en el nivel del mar; trayendo consigo consecuencias inimaginables, ya que más de la mitad de la población del planeta vive en zonas costeras propensas a inundarse.

Hay que enfatizar que dentro de los gases de efecto invernadero el que más peso tiene es el monóxido de carbono, ya que actúa como una capa que cubre el planeta completamente y no permite reflejar los rayos del sol de vuelta al espacio, creando un calentamiento artificial.

Por lo que es de gran importancia saber nuestra huella de carbono; la cual es un coeficiente que nos permite saber cuánto monóxido de carbono dejamos por nuestra actividad humana y colectiva, así mismo es como en la electricidad es para nosotros un gran beneficio, desde la energía corporal que tenemos, hasta la energía para subsistir anteriormente se manejaba luz a base de fuego prendiéndolo con diésel, en la actualidad tenemos una infinidad de aparatos electrónicos que necesitan energía para su uso, La energía es la capacidad de los cuerpos para realizar un trabajo y producir cambios en ellos mismos o en otros cuerpos. Es decir, la energía es la capacidad de hacer funcionar las cosas. La unidad de medida que utilizamos para cuantificar la energía es el Joule (j).

Transferencia de energía Hay tres formas de transferir energía de un cuerpo a otro, el trabajo cuando se realiza un trabajo se pasa energía a un cuerpo que cambia de una posición a otra. Por ejemplo, si en casa desplazamos una caja, estamos realizando un trabajo para que su posición varíe. Ondas Las ondas son la propagación de perturbaciones de ciertas características, como el campo eléctrico, el magnetismo o la presión, y que se propagan a través del espacio transmitiendo energía, Calor Es un tipo de energía que se manifiesta cuando se transfiere energía de un cuerpo caliente a otro cuerpo más frío.

Sin embargo, no siempre viaja de la misma manera, existiendo tres formas diferentes de transferencia energética:

- **Conducción:** cuando se calienta un extremo de un material, sus partículas vibran y chocan con las partículas vecinas, transmitiéndoles parte de su energía.
- **Radiación:** el calor se propaga a través de ondas de radiación infrarroja (ondas que se propagan a través del vacío y a la velocidad de la luz).
- **Convección:** que es propia de fluidos (líquidos o gaseosos) en movimiento.

La energía se manifiesta de diferentes maneras, recibiendo así diferentes denominaciones según las acciones y los cambios que puede provocar.

- Energía mecánica
- Energía cinética
- Energía potencial
- Energía interna
- Energía térmica
- Energía electromagnética
- Energía química
- La energía nuclear

Propiedades de la energía

La energía tiene 4 propiedades básicas:

- Se transforma. La energía no se crea, sino que se transforma, siendo durante esta transformación cuando se ponen de manifiesto las diferentes formas de energía.
- Se conserva. Al final de cualquier proceso de transformación energética nunca puede haber más o menos energía que la que había al principio, siempre se mantiene. La energía no se destruye.
- Se transfiere. La energía pasa de un cuerpo a otro en forma de calor, ondas o trabajo.
- Se degrada. Solo una parte de la energía transformada es capaz de producir trabajo y la otra se pierde en forma de calor o ruido (vibraciones mecánicas no deseadas).

Por otra parte existe otra manera de crear energía que son Energía verde es un término que describe la energía generada a partir de fuentes de energía primaria respetuosas con el medio ambiente. Las energías verdes son energías renovables que no contaminan, es decir, cuyo modo de obtención o uso no emite subproductos que puedan incidir negativamente en el medio ambiente.

Las energías renovables (también conocidas como limpias) son todas aquellas energías que no originan ni gases de efecto invernadero ni ninguna otra emisión perjudicial para el medio ambiente. Son energías renovables la hidráulica, la solar, la eólica, la mareomotriz, la geotérmica o la que produce la biomasa.

La producción de algunas de ellas está supeditada a las condiciones climatológicas, pero en general se encuentran en una cantidad ilimitada en la naturaleza.

Pese a que este tipo de energías suelen tener buena prensa, su uso tiene ventajas y desventajas. Lo que sí es una evidencia y no admite discusión es que tarde o temprano estaremos obligados a usarlas ya que serán la única alternativa posible y viable cuando agotemos los combustibles fósiles como el carbón o el petróleo.

- No contaminan.
- Son inagotables
- No necesitan planes de vigilancia para los residuos que generan, como por ejemplo sí necesita la energía nuclear.
- Generan más autonomía tanto en el ámbito comercial como en el residencial, ya que, por ejemplo, se puede cubrir la demanda energética con energía solar.
- Generan puestos de trabajo y dan lugar a nuevos ámbitos de investigación e innovación.
- No suponen ningún tipo de amenaza para la salud de las personas, ni afectan negativamente a la flora y la fauna.

Aun así, también presentan desventajas, aunque ni de lejos tantas como presentan las no renovables. Éstas son algunas de ellas:

- El alto coste de inversión. Tienen un alto coste inicial y no suelen ser rentables hasta pasado un tiempo, por lo que pueden suponer un riesgo de inversión.
- Puede llegar a producirse de forma intermitente (según sean las condiciones meteorológicas), hecho que provoca que su disponibilidad pueda no estar siempre garantizada.
- Requieren de grandes espacios para poder ser eficientes. Así, por ejemplo, si quieres generar una gran cantidad de energía eléctrica con paneles solares, necesitarás una gran extensión de terreno donde colocar los paneles que generen la energía verde.
- No poseen una naturaleza difusa, es decir, no todos los tipos de energía renovable pueden utilizarse en cualquier lugar, a excepción de la energía geotérmica, que es un poco más versátil. Aun así, ésta necesita lugares donde la capa terrestre es más fina para que su generación resulte más eficiente.
- Algunas energías verdes generan un impacto paisajístico. La energía eólica, por ejemplo, tiene un impacto sobre el paisaje ya que necesita de la instalación de aerogeneradores de grandes dimensiones, cuyas hélices también pueden generar problemas a algunas aves.

MÉTODOS Y MATERIALES

Como método para recabar la información nos enfocamos en visualizar el prototipo que hasta ahorita se tiene, ahí sacamos algunas características y observamos la manera de funcionar, como también encontramos en libros y anexos de investigación existente fundamentada, basada en las energías renovables (energías verdes) con ayuda con especialistas y doctores en este tema llegamos a cabo la práctica con la finalidad de encontrar la innovación.

RESULTADOS

Así pues, queda claro que las ventajas que ofrecen las energías renovables son superiores a los inconvenientes que pueden llegar a generar. La mejora de la eficiencia y la rentabilidad de estas energías alternativas se basan en el estudio, la investigación y el desarrollo de nuevas tecnologías que complementen a las actuales y las mejore, a fin de generar mejores resultados y beneficios económicos.

CONCLUSIONES

Así pues, queda claro que las ventajas que ofrecen las energías renovables son superiores a los inconvenientes que pueden llegar a generar. La mejora de la eficiencia y la rentabilidad de estas energías alternativas se basan en el estudio, la investigación y el desarrollo de nuevas tecnologías que complementen a las actuales y las mejore, a fin de generar mejores resultados y beneficios económicos.

AGRADECIMIENTOS.

Quiero hacer mención que gracias al apoyo de mi madre he logrado mi proyecto y en todos ha estado siempre conmigo. Gracias infinitas a los que hicieron posible mi estancia en aquella bella ciudad. Fue una experiencia maravillosa de conocimientos y aprendizaje.

BIBLIOGRAFIA

Libros

FRERIS L. & INFELD D. (2008). *Renewable Energy in Power Systems*

PERALES T. (2004). *El Universo De Las Energías Renovables*

Artículos en línea

“Carta de la tierra” <http://cartadelatierra.org/> (18 de julio del 2017)

"OPTIMIZACIÓN DEL TRATAMIENTO DEL AGUA DE POZO UBICADO EN EL ITSMEM SEGÚN SUS CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS Y BACTERIOLÓGICAS PARA USOS DIVERSOS"

Néstor Hugo Ramos Escalante¹ y Adriana Hernández Córdova².

RESUMEN

Esta investigación se realizó con la finalidad de aprovechar un pozo de agua ubicado en el ITSMEM para diferentes usos tales como el riego de jardines, realizándose primeramente una toma de muestra de dicha agua y posteriormente se le realizó el análisis fisicoquímico, el cual arrojó una elevada dureza y contenido de azufre principalmente, lo cual representa hasta cierto punto un problema para el riego. Por lo anterior se proponen diferentes métodos de tratamiento de agua para obtener de ella las características óptimas.

ABSTRACT

This research was carried out with the purpose of taking advantage of a well of water installed in the ITSMEM for different uses such as the irrigation of gardens, firstly taking a sample of said water and later the physicochemical analysis was performed, which showed a high Hardness and sulfur content mainly, which represents to some extent a problem for the irrigation. For the above, different methods of water treatment are proposed to obtain the optimum characteristics.

Palabras clave: Dureza, riego, análisis fisicoquímico.

INTRODUCCION

En este proyecto se realizó una investigación de las condiciones del agua de pozo ubicado en el ITSMEM iniciando desde la extracción de la muestra y la realización del análisis fisicoquímico y bacteriológico para después interpretar los resultados y realizar la investigación sobre la optimización de tratamientos de agua mediante los procedimientos, procesos o métodos existentes que sean los más adecuados a las características del agua del instituto.

En base a lo anterior determinar también los posibles usos que a esta agua puede dársele.

MARCO TEORICO

Uno de los principales problemas que afecta la calidad del agua de riego es la salinidad.

Cuando hablamos de salinidad nos referimos a la conductividad eléctrica, usada comúnmente en la agricultura y jardinería.

Si se utiliza agua de un pozo, es conveniente conocer cómo es esa agua.

Para ello, se realizó un análisis fisicoquímico del agua del pozo ubicado en el ITSMEM, el cual arrojó una cantidad bastante elevada de sales y un alto contenido de azufre.

Para poder tratar el agua con las características anteriores existen procedimientos mediante los cuales se puede llevar esta agua a la calidad óptima para diferentes usos como lo es el riego de jardines.

METODOLOGÍA

Se realizó una investigación de acuerdo a los resultados del análisis fisicoquímico del agua de pozo del ITSMEM buscando alternativas para el tratamiento de dicha agua mediante los diferentes procedimientos existentes.

Dentro de los métodos adecuados para la desalinización de agua de pozo tenemos los siguientes:

- Destilación
- Congelación
- Evaporación relámpago
- Formación de hidratos

Se realizó una comparación de valores de parámetros aceptables regidos por tablas con los arrojados de la muestra del pozo instalado en el ITSMEM.

Tabla. 1. Parámetros de Calidad

<i>Parámetros de Calidad</i>	<i>Símbolo</i>	<i>Unidad</i>	<i>Intervalo usual</i>
Conductividad eléctrica	CE a 25°C	μS/cm	0-3000
	CE a 25°C	dS/cm	0-3
Materia Disuelta Total	MDT	mg/l	0-2000
Calcio	Ca ²⁺	mg/l	0-400
Magnesio	Mg ²⁺	mg/l	0-60
Sodio	Na ⁺	mg/l	0-900
Carbonatos	CO ₂ -3	mg/l	0-3
Bicarbonatos	HCO ₃ -	mg/l	0-600
Cloruros	Cl-	mg/l	0-1100
Sulfatos	SO ₂ -4	mg/l	0-1000
Boro	B	mg/l	0-2

Se consideró también la clasificación de los cultivos según la tolerancia al riego con aguas salinas:

Tabla. 2. Clasificación de los cultivos según la tolerancia al riego con aguas salinas (Hass y Hoffman, 1977):

	Tolerantes	Muy tolerantes
CE (μS/cm) límite de tolerancia	1.300 – 4.000	2.700 – 5.300
Cultivos	Alfalfa, Espinacas, Tomate, Brócoli, Granada, Olivo, Higuera, Soja, Trigo	Remolacha, Algodón, Cebada grano, Remolacha azucarera, Sorgo, Trigo, Soja

Otros datos importantes para esta investigación son los rangos de medición de la salinidad.

La salinidad se mide en un conductímetro y el parámetro más común para determinarla es el dS/m (dS=deciSiemens).

Tabla. 3. Rangos de medición de la salinidad

Rango	Criterio
Entre 0 y 2 dS/m	Tolerable para casi cualquier tipo de planta o cultivo.
Entre 2 y 4 dS/m	Limitante para algunos cultivos y plantas sensibles a la salinidad.
Entre 4 y 8 dS/m	Pocas especies son resistentes
Superior a 8 dS/m	Altamente salina.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los parámetros que componen al agua con calidad de riego son las siguientes:

Dureza. Las aguas con menos de 50 ppm de CaCO_3 se llaman blandas, hasta 100 ppm de CaCO_3 , ligeramente duras, hasta 200 ppm de CaCO_3 , moderadamente duras, y a partir de 200 ppm de CaCO_3 , muy duras.

Lo frecuente es encontrar aguas con menos de 300 ppm de carbonato cálcico, pero pueden llegar hasta 1000 ppm e incluso hasta 2000 ppm.

La eliminación de la dureza se hace, principalmente, por descalcificación o ablandamiento por intercambio iónico con resinas.

El azufre es un nutriente esencial para el crecimiento vegetal. En los últimos años, las deficiencias de este nutriente se han vuelto más frecuentes y la importancia del azufre en la producción de cultivos es cada vez más reconocida.

El tratamiento del azufre en el agua del pozo se puede hacer en una variedad de formas, desde la aireación de los tratamientos con cloro.

Con este proyecto se logró obtener información sobre la calidad del agua tomando en cuenta parámetros de suma importancia como lo es el azufre, su conductividad (salinidad), dureza.

De acuerdo a la investigación realizada se encontró dentro de las posibilidades usar el agua tal y como esta para riego, aunque es riesgosa se encontraron algunos cultivos que son tolerantes a la salinidad en altas cantidades.

En cuanto al alto contenido de azufre se encontró que es de gran beneficencia para las plantas y cultivos, y para lograr eliminar el mal olor con el proceso de aireación y tratamientos con cloro.

Se obtuvo información sobre las características que debe tener el agua adecuada para el riego y se observó que el agua del ITSMEM tiene un valor de conductividad muy elevado al igual que el de la dureza por lo que se propone utilizar procesos de desalinización como la osmosis inversa, destilación, congelación y formación de hidratos y de abundamiento del agua que se lleva a cabo con un descalcificador mediante resinas de intercambio iónico.

CONCLUSIONES

La calidad del agua de pozo ubicado en el ITSMEM tiene una alta concentración de sales y de azufre pero existe la posibilidad de usarse en algunos cultivos resistentes a la salinidad.

Además se puede realizar diferentes procedimientos o procesos para tratar el agua de pozo y llevarla a las condiciones óptimas para el riego de cualquier cultivo.

Entre estos procesos se encontraron de desalinización como la osmosis inversa, destilación, congelación y formación de hidratos y de abundamiento del agua que se lleva a cabo con un descalcificador mediante resinas de intercambio iónico, proceso de aireación y tratamientos con cloro. Los procesos anteriores se llevan a cabo mediante equipos que constan de filtros, bombas, etc.

Se puede recomendar trabajar el riego con aguas saladas siempre y cuando el riego sea abundante y poco frecuente, regar por la noche o temprano por la mañana para evitar la pérdida por evaporación y la concentración de sales en las hojas, regar por goteo es mejor que regar por aspersión, no se debe regar bajo condiciones de viento o calor.

BIBLIOGRAFIA

Castro Cosio, M. (1 de marzo de 2012). *slideshare*. Recuperado el 18 de agosto de 2017, de calidad del agua para riego: <https://es.slideshare.net/Mauriciocastrocosio/calidad-del-agua-para-riego-11821593>

Melendez, L. (19 de mayo de 2014). *HORTALIZAS*. Recuperado el 17 de agosto de 2017, de Manejo de agua con alto contenido de sales solubles: <https://es.slideshare.net/Mauriciocastrocosio/calidad-del-agua-para-riego-11821593>

Romero, B. (8 de febrero de 2016). *Gidahatari, gestion sostenible del agua*. Recuperado el 15 de agosto de 2017, de Si el contenido de azufre en el agua de un pozo es un poco alto, ¿sigue siendo segura para beber?: <http://gidahatari.com/ih-es/si-el-contenido-de-azufre-en-el-agua-de-un-pozo-es-un-poco-alto-sigue-siendo-segura-para-beber>.

<https://es.slideshare.net/Mauriciocastrocosio/calidad-del-agua-para-riego-11821593>

C. Dorronsoro. Contaminación de suelos por sales solubles. Universidad de Granada, 2001.

IDENTIFICACIÓN DE LA SUBUNIDAD ALFA DE CANALES BK EN RETINAS DE RATAS WISTAR

Erika Márquez Padilla¹, Ricardo Espinosa Tanguma² y Alma Rosa Barajas Espinosa²

RESUMEN

La diabetes mellitus es una enfermedad en la que la hiperglucemia es la principal característica y ésta se da por falta de secreción y/o desarrollo de resistencia de la hormona insulina y, de no controlarse adecuadamente, trae como consecuencia bastantes complicaciones y alteraciones en el cuerpo, especialmente en ojos, corazón, riñones y vasos sanguíneos. Dentro de las complicaciones sistémicas se encuentra la retinopatía diabética, siendo ésta la principal causa de ceguera, que se presenta cuando los vasos sanguíneos sufren un deterioro por causa de la diabetes. Un controlador importante de las arteriolas es la actividad de los canales iónicos en las membranas plasmáticas de las células del músculo liso vascular. Los canales de BK tienen un papel importante en la regulación del tono del músculo liso. Estos canales están compuestos por subunidades α y β . El objetivo de la presente investigación fue identificar la localización de la proteína BK_{Ca} y, para ello, se trabajó con retinas de ratas wistar, normales y ratas inducidas a diabetes y así comparar el resultado de ratas control con el de ratas diabéticas, mediante técnicas de western blot e inmunohistoquímica (MK McGahon *et al.*, 2007).

ABSTRACT

Diabetes mellitus is a disease in which hyperglycemia is the main characteristic and this is due to lack of secretion and / or development of resistance of the hormone insulin and, if not properly controlled, leads to many complications and alterations in the body, Especially in eyes, heart, kidneys and blood vessels. Among the systematic complications is diabetic retinopathy, which is the main cause of blindness, which occurs when blood vessels deteriorate because of diabetes. An important controller of arterioles is the activity of ion channels in the plasma membranes of vascular smooth muscle cells. BK channels play an important role in the regulation of smooth muscle tone. These channels are composed of α and β subunits. The objective of the present investigation was to identify the location of the BK_{Ca} protein and, for this purpose, it was worked with retinas of wistar rats, normal and rats induced to diabetes and thus to compare the result of control rats with that of diabetic rats, by means of techniques of Western blot and immunohistochemistry (MK McGahon *et al.*, 2007).

Palabras Clave: Diabetes mellitus, retina, BK.

INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus (DM) es un trastorno endocrino causado por la incapacidad de producir o de utilizar insulina. Es una enfermedad que se caracteriza por hiperglucemia crónica debido a la falta de secreción de insulina o falla en su acción; por lo tanto, una persona con hiperglucemia presenta alteración en los niveles de insulina. Debido a que la insulina es incapaz de promover el transporte de la glucosa hacia las células del cuerpo, el nivel de glucosa sanguínea es alto. Existen dos tipos de DM, el tipo 1 y tipo 2. El tipo 1, el nivel de insulina es bajo porque el sistema inmunitario de la persona destruye las células beta del páncreas, por lo que se produce poco o nada de insulina. La diabetes tipo 2, es en la que las células diana se vuelven menos sensible a la insulina por la regulación por decremento de los receptores de insulina. (Tortora y Derrickson, 2013).

La DM se puede asociar a diversas complicaciones en el cuerpo y ha alcanzado proporciones epidémicas, siendo la DM tipo 2, responsable del 90% de los casos. A pesar de los avances en el tratamiento y prevención, la prevalencia de la diabetes ha aumentado de manera más drástica de lo esperado: en el año 2000 se esperaba una cifra de 150 millones de personas diabéticas; sin embargo, llegó a 177 millones, lo que proyecta que en 2025 se espera una estimación de 333 millones de personas con DM en el mundo (López, 2009).

Dicha enfermedad causa diversos daños en el cuerpo como neuropatía y enfermedades macro y microvasculares. La diabetes causa cambios en la estructura y función de los vasos sanguíneos y, en la retina, conduce a la deficiencia visual. Una vía principal a través de la cual se cree que la hiperglucemia contribuye a la microangiopatía, es la interrupción del flujo sanguíneo de la retina. Los estudios basados en pacientes han demostrado que las anomalías hemodinámicas de la retina ocurren antes del inicio de la retinopatía diabética clínica y que el desarrollo y progresión de la retinopatía se correlaciona con el grado de los cambios observados en el flujo sanguíneo (McGahon *et al.*, 2007).

La retinopatía diabética es una enfermedad degenerativa de la retina causada por diabetes mellitus, en la cual los vasos sanguíneos de la retina sufren un deterioro, lo que puede causar ceguera. A medida que la diabetes avanza, las arteriolas comienzan a dilatarse y el flujo sanguíneo retiniano en masa aumenta en proporción a la gravedad de la retinopatía y, por tanto, el grado de isquemia retiniana. La retina es una capa profunda de la parte posterior del globo ocular formada por tejido nervioso, donde comienza el proceso de visión, y una capa pigmentada de células epiteliales que están en contacto con la coroides (Tortora y Derrickson, 2013).

Un factor importante que controla el estado contráctil de las arteriolas es la actividad de los canales iónicos en las membranas plasmáticas de las VSMC (Células del Músculo Liso Vascular). Se sabe que los canales BK desempeñan un papel crucial en la regulación del tono del músculo liso arterial desde el bloqueo de estos canales utilizando el inhibidor específico iberitoxina, provocando la despolarización de la membrana y la vasoconstricción en recipientes aislados a presión. Los canales BK son activados por la liberación de Ca^{2+} , resultantes de la apertura de los canales del receptor de ryanodina (RyR) en el retículo sarcoplásmico. La activación de los canales BK produce una corriente de K^{+} hacia el exterior que se opone a la contracción de las VSMC al causar hiperpolarización de la membrana. Esto reduce la afluencia de Ca^{2+} mediante la reducción de la activación de la dependencia de la tensión de canales de Ca^{2+} . Los canales BK están compuestos de subunidades α y β . La subunidad α forma el poro selectivo de K^{+} , mientras que las subunidades β influyen en la cinética, la farmacología y la sensibilidad al Ca^{2+} de las corrientes BK. (MK McGahon *et al.*, 2007).

Se trabajó con ratas Wistar normales (control) y ratas inducidas a diabetes con estreptozotocina (STZ), sustancia química que destruye las células β del páncreas, única fuente de insulina en el cuerpo. Estos animales posteriormente presentan muchos de los cambios vasodegenerativos asociados con la retinopatía diabética humana. Se asumió la hipótesis que la diabetes provoca disminución de la subunidad α , reduciendo así la capacidad de los canales BK de hiperpolarizar las VSMC retinianas y resistir la vasoconstricción. Esto sugiere que los cambios en la composición molecular de los canales BK en VSMC de retina durante la diabetes podrían contribuir a la aparición y progresión temprana de la retinopatía diabética. Por lo que, en este proyecto, se buscó identificar la proteína BK_{Ca} en retinas de ratas wistar, utilizando técnicas de western blot e inmunohistoquímica para su localización e identificar una posible disminución de la proteína en ratas diabéticas.

MÉTODOS Y MATERIALES

Obtención de retinas: Las retinas utilizadas fueron de ratas Wistar macho, inyectadas con pentobarbital sódico (130 mg/kg) como anestesia.

Western blot: Las muestras de retina se congelaron y se pasaron a tubos de eppendorf, agregando 30 μl de Ripa, sonicando 3 veces por 10 segundos y dejando incubar en hielo por 30 minutos. Posterior a la incubación, las muestras se centrifugaron a 14.8 RPM durante 15 minutos. Al término de la centrifugación, se tomaron los sobrenadantes y se pasaron a otros tubos diluyendo la solución e incubando a 37°C durante 30 minutos. Las muestras se llevaron al espectrofotómetro para realizar la cuantificación. En seguida, los tubos se colocaron en agua a temperatura de 60 a 100°C durante 10 minutos para su desnaturalización y, posteriormente, se cargaron las muestras en geles de poliacrilamida. A continuación, se hizo la transferencia a membrana, lavando 3 veces con TBS- Tween y se bloqueó por una hora con leche. Luego se agregó el anticuerpo primario a dilución de 1:5000 y se dejó con él durante toda la noche a una temperatura de 4°C . Se hicieron tres lavados con TBS-Tween por 10 minutos cada uno y se agregó el anticuerpo secundario en una solución de 1:5000 con leche por una hora. Al término, se hicieron 3 lavados con TBS por 10 minutos y se colocaron los reactivos de revelado durante 1 minuto donde después se prosiguió con el revelado en un fotodocumentador.

Aislamiento de vasos sanguíneos en retinas: Una vez obtenidas las retinas directamente del animal, se diseccionaron y se pasaron a solución para mantener el tejido. Después, se separó la membrana retino-vítrea y se cortó el borde de cada retina. Posteriormente se incubaron a 30°C por 24 minutos en una solución preparada con 2.5 ml de solución Earle, 1 cristal de cisteína y 7.5 μl de papaína. Se utilizaron cubreobjetos redondos para la impresión de vasculatura, dejando en etanol al 50% y se dejaron secar por 15 minutos. Las retinas fueron cortadas en cuadrantes y los cubre objetos secados se colocaron sobre cada uno de los cuadrantes y después se colocaron en solución para seguir preservado el tejido.

Inmunohistoquímica: Una vez realizado el aislamiento de vasos sanguíneos, los portaobjetos redondos fueron cubiertos con 1 ml de paraformaldehído al 4%, echo con PBS sin Ca dejándolos en solución por 10 minutos para su fijación. Pasado el tiempo de fijación, se realizaron tres lavados de 10 minutos con PBS sin Ca, para después agregar tritón al 0.1% y 1 μl de anticuerpo primario. Se plasmó una cámara de humedad en una caja Petri sellada y se dejó durante toda la noche en anticuerpo primario a temperatura de 4°C . Posteriormente se hicieron 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBS, para quitar excesos de anticuerpo primario y se agregó el anticuerpo secundario por 1 hora con PBS, tapando completamente las muestras de la luz. Se hicieron nuevamente tres lavados con PBS de 10 minutos cada uno, cubriendo las muestras. En seguida, quitó el exceso de PBS y se agregó una gota de Fluoroshield with Dapi y los portaobjetos circulares se colocaron en un portaobjetos rectangular, estos portaobjetos fueron sellaron alrededor, dejando secar por 30 minutos, tapando de la luz. Las muestras obtenidas fueron analizadas en un microscopio de fluorescencia, permitiendo captar las imágenes mediante el programa informático "QCapture", así como su composición con el programa "Imagej".

RESULTADOS

Al hacer el revelado de western blot, se observó que existe la presencia de la proteína BActina, la cual se utilizó como control positivo en dicha experimentación. Se pudo observar en las 4 muestras cargadas en la técnica de western blot; se obtuvo 3 muestras de retina y 1 de cerebro, esta última seleccionada como muestra control, ya que existe evidencia de que la proteína de interés se encuentra ahí.

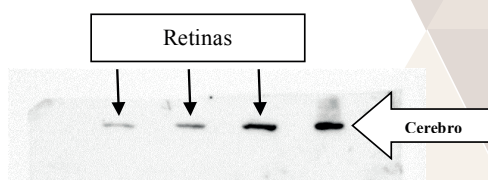


Figura 1. BActina en revelado de Western blot

En la muestra de cerebro, la proteína BK_{Ca} se encontró con mayor señal de existencia, como se muestra en la **figura 2**. En cambio, en las muestras de retinas, se pudo ver ligeramente señal de la presencia de la proteína.

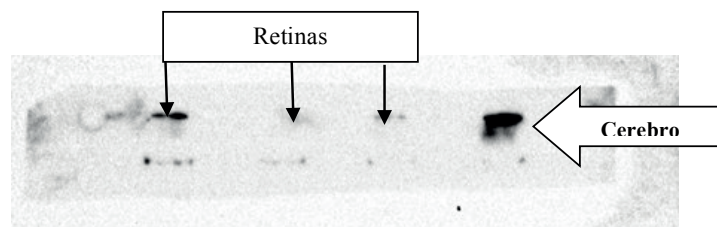


Figura 2. Revelado de Western blot. Se observar mayor intensidad de la proteína BK_{Ca} en cerebro.

Esta experimentación permitió observar la presencia de la proteína de interés buscada en retinas de ratas. Uno de los objetivos de este experimento era realizar la misma metodología en ratas inducidas a diabetes, con la finalidad de ver si la enfermedad afectaba en la degeneración de tal proteína, pero debido a la falta de tiempo de dicha investigación, no fue posible llevar a cabo el procedimiento.

La experimentación de la inmunohistoquímica se realizó primero con retinas completas, pero al realizarla no se obtuvieron los resultados esperados.

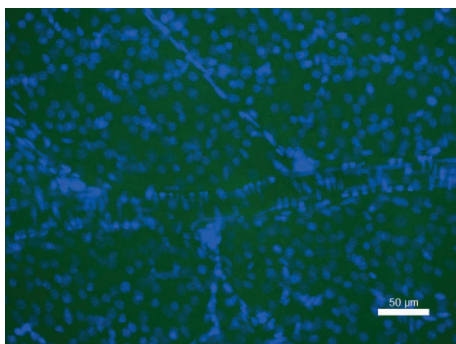


Figura 3. Inmunohistoquímica en retinas sin aislar vasos sanguíneos. En esta experimentación no se observó la señal de la proteína de interés, por tal motivo, se optó por aislar vasos sanguíneos y hacer la inmunohistoquímica con ese protocolo.

Debido a que no se obtuvieron los resultados esperados, se optó por usar otro protocolo en donde primero se aislaron vasos sanguíneos de las retinas y después se prosiguió con metodología descrita desde un inicio. Al hacer la inmunohistoquímica, no se logró ver una señal significativa. En la **figura 4**, se puede observar que solo hay una señal, pero no se sabe con precisión si realmente la proteína de interés se encuentra en vasos sanguíneos. Se tenía planeado seguir con las experimentaciones en ratas control y ratas diabéticas para ver la diferencia con los animales enfermos, pero al igual que con el western blot, no se contó con el tiempo suficiente dentro del lapso destinado para dicha investigación.

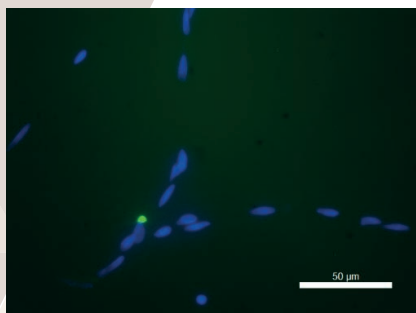


Figura 4. Inmunohistoquímica en vasos sanguíneos aislados en rata control.

CONCLUSIONES

Al realizar las experimentaciones se comprobó mediante la técnica de western blot que la proteína BK_{Ca} está presente en retinas de rata wistar. Al realizar la inmunohistoquímica en vasos sanguíneos aislados, se esperaba que hubiera una mayor señalización de la proteína de interés, pero no se obtuvieron los resultados deseados, y no se puede asegurar con certeza que la proteína se encuentre en la microvasculatura de la retina.

Cabe destacar que el propósito de dicha investigación era llevar a cabo las mismas experimentaciones con ratas inducidas a diabetes, pero por falta de tiempo, no se permitió llevarlas a cabo. Se espera que este proyecto siga en pie en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, para dar conclusiones más concretas sobre este tema.

BIBLIOGRAFIA

López, Gloria. (2009). Diabetes mellitus: classification, pathophysiology, and diagnosis. *MEDWAVE*. Recuperado en: <https://www.medwave.cl/link.cgi/Medwave/PuestaDia/APS/4315> (Fecha de consulta: 22/07/2017).

McGahon, M., Dash D., Arora A., Wall N., Dawicki J., Simpson D., Scholfield C., McGeown J., Y Curtis T. (2007). Diabetes downregulates BK β 1 potassium channel subunit in retinal arteriolar smooth muscle. *National Center for Biotechnology Information*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2596350/>. (Fecha de consulta: 22/07/2017).

Tortora, G. Y Derrickson B. (2013). Sentidos especiales. *Principles of anatomy and physiology, thirteenth edition*. 646-675.

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE ACTINOMICETOS DE SUELOS POTOSINOS

Estefanía Pérez Martínez¹ y Jesús Israel Morales Jiménez²

RESUMEN

Los actinomicetos, son un grupo de bacterias que producen diferentes moléculas con actividad microbiana. Este tipo de bacterias, se encuentran en la rizosfera, principalmente en suelos alcalinos. El objetivo del presente trabajo es, el aislamiento de actinobacterias presentes en los suelos de San Luis Potosí. A partir de muestras de suelo de tres tipos distintos de vegetación de la Sierra de Álvarez colectadas el 14 de junio de 2017. Se aislaron 39 morfotipos de cepas de actinobacterias. A todas las cepas obtenidas, se les extrajo su ADN. El gen 16S ADN de cada cepa se amplificará por PCR y se secuenciará para identificar a menos a nivel de género a las actinobacterias aisladas.

Palabras clave: Actinomicetos, antibióticos, rizosfera

ABSTRACT

Actinomycetes, are a group of bacteria that produce different molecules with microbial activity. These types of bacteria are found in the rhizosphere, mainly in alkaline soils. The objective of the present work is, the isolation of actinobacteria present in the soils of San Luis Potosí. From soil samples of three different types of vegetation from the Sierra de Álvarez collected on June 14, 2017, 39 morphotypes of actinobacteria strains were isolated. To all strains obtained, their DNA was extracted. The 16S r DNA of each strain will be amplified by PCR and sequenced to identify at least genus level to the isolated actinobacteria.

Key words: Actinomycetes, antibiotics, rhizosphere

INTRODUCCIÓN

El suelo alberga una enorme cantidad de microorganismos. Muchos procesos fundamentales para el desarrollo de la vida del planeta, son realizados por los microorganismos (algas, protozoos, hongos y bacterias). Las bacterias son los organismos más abundantes en el suelo, sin embargo, sólo representan una pequeña cantidad de la biomasa microbiana total.

La rizosfera, la zona de influencia de la raíz, es el punto donde se llevan a cabo las interacciones más importantes entre los microorganismos del suelo. La rizosfera concentra una gran actividad metabólica con intercambio de nutrientes entre la atmósfera y el suelo, la cual es mediada por la acción e interacción entre plantas y microorganismos del suelo. (Pedraza, 2010)

Actualmente, muchos científicos se han centrado en programas de búsqueda de nuevos antimicrobianos, principalmente de origen actinomicetal, por su prolífica producción de antibióticos naturales (Oskay M, 2004).

Los actinomicetos son bacterias que realizan respiración aeróbica que incluso puede llegar a ser fermentativa, forman filamentos ramificados similares a los hongos, las células de éstas, son procariotas y pertenecen a las bacterias Gram-positivas. (Bergey & Hendriks, 2000). Se caracterizan por no producir mucopolisacáridos, además, de que poseen un olor muy característico a suelo húmedo ya que producen un metabolito llamado “geosmina”. Los actinomicetos, son abundantes en suelo, ríos, lagos y estiércol de animales; viven principalmente en la superficie de suelos alcalinos y muy raramente en los horizontes inferiores. (Betina, 1994).

Los actinomicetos representan un grupo de microorganismos ampliamente distribuido en ecosistemas naturales y tienen gran importancia en la participación de la degradación de materia orgánica, además de ciertas propiedades fisiológicas que los hacen particulares (Ghanem, *et al.* 2000).

Por lo general se aíslan cepas de actinomicetos en la superficie del suelo y en profundidades entre 2 y 15 cm, más allá de esta profundidad disminuye la cantidad de éstos. El tamaño de la comunidad depende del tipo del suelo, particularmente de algunas de las características físicas, del contenido de materia orgánica y del pH del medio ambiente (R.L, 2000). Los principales géneros que se aíslan a partir de suelos son *Nocardia*, *Streptomyces* y *Micromonospora*, que pueden estar presentes como conidias o como hifas vegetativas (Martín, 1980).

Morfología:

Forman estructuras filamentosas de menos de 1µm de diámetro, rectas, ondulantes, y ramificadas. Tienen un núcleo difuso y presentan un cromosoma único disperso en el citoplasma y ribosomas. La pared celular está formada por derivados de ácido murámico y la membrana celular por una bicapa de fosfolípidos.

Clasificación:

- Streptomyces: tienen hifas no fragmentadas, micelio aéreo extenso, esporas o conidias en cadena. Los géneros son, *Streptomyces*, *Microeliobosporia* y *Sporichthya*.
- Nocardia: hifas fragmentadas con pequeñas estructuras redondeadas. Producen vitaminas principalmente B, antibióticos y pigmentos de interés industrial. Los géneros son: *Pseudonocardia*, *Nocardioides* y *Terrabacter*.

(Actinomicetos como fuente de interés biotecnológico, 2017)

MATERIAL Y MÉTODOS

Recolección de muestras

Se tomaron 3 tipos de muestras de suelo en la Sierra de Álvarez en San Luis Potosí, rizosfera de encino(RE), rizosfera de cactus(RC) y rizosfera de sábila(RCR). Las cuales se almacenaron en bolsas herméticas a 4°C hasta el momento del análisis.

Diluciones seriadas de suelo

Se rotularon los tubos de ensayo con 9ml de agua estéril, desde 1×10^{-1} hasta 1×10^{-6} , tres veces para cada muestra de suelo. También, se rotularon, las cajas Petri, con medio GAE (Glucosa, Asparagina, Extracto de levadura) con las tres últimas diluciones por duplicado para cada muestra de suelo. En el tubo 1×10^{-1} , se colocó 1gr de muestra de suelo y se agitó en el vortex por un minuto. Se tomó una muestra de 1ml del tubo agitado y se añadió en el siguiente tubo de ensayo, se volvió a agitar y nuevamente se extrajo una muestra de 1ml para agregar al siguiente tubo y así sucesivamente. De los últimos 4 tubos de ensayo, se tomó una muestra de 100 μ l con la micropipeta P200 y se situó en el centro de la caja Petri; se dispersó la muestra hasta que estuvo completamente absorbida por el medio. Las cajas inoculadas se incubaron por 5 días para observar colonias bacterianas de buen tamaño.

Resembrar bacterias por estriado

Pasados los 5 días, se aislaron los diferentes tipos de colonias de actinomicetos observadas por el método de estria cruzada. Se utilizó un asa de alambre de platino, la cual se esterilizó con el mechero, luego se enfrió y se tomó la muestra de la colonia evitando tocar otro tipo de colonias. Se resembraron las bacterias y al final el asa volvió a esterilizarse en el mechero. Luego se dejaron crecer durante 5 días más y se volvieron a resembrar por estriado pero sólo en la mitad de la caja, en este punto, las colonias ya estaban completamente aisladas.

Extracción de ADN de suelo y PCR

El ADN se extrajo con el kit *Powersoild DNA Isolation*, enseguida se realizó PCR.

Electroforesis

Se utilizó un gel al 1.5% de agarosa; de cada muestra se colocaron 3 μ l con 1 μ l de amortiguador de carga y 1.5 μ l de marcador de peso molecular.

Extracción DNA de cepas

El ADN se extrajo colocando algunas colonias bacterianas en un tubo eppendorf de 1.5 mL con 200 μ L de Solución de lisis y 100 mg de perlas de vidrio. Después, se adicionó a cada tubo 200 μ L de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Los tubos se agitaron en el vortex durante 5 minutos y posteriormente se calentaron a 60 °C durante 30 minutos. Los tubos se centrifugaron a $10000 \times g$ durante 5 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se agregaron 200 μ L de Cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Los tubos se agitaron nuevamente en el vortex por 5 minutos y se centrifugaron a $10000 \times g$ durante 5 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. El ADN se precipito con 1 mL de Isopropanol y se incubó a -20 °C durante 2 horas. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 4°C durante 10 minutos y se eliminó el sobrenadante. La pastilla de ADN se lavó con etanol al 70% y después con etanol absoluto, en cada lavado los tubos se centrifugaron y se eliminó el sobrenadante. Las pastillas de ADN se dejaron secar a temperatura ambiente y finalmente se disolvieron en 50 μ L de agua estéril.

RESULTADOS

Las figuras 1a y 1b, muestran las electroforesis de los amplicones de las muestras RC y RCR y la muestra RE respectivamente.

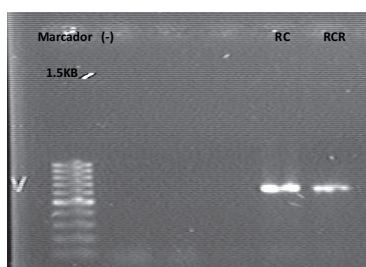


Figura 1a. Electroforesis de DNA totales en gel de agarosa al 1.5% para RC Y RCR

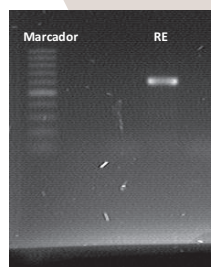


Figura 1b. Electroforesis de DNA totales en gel de agarosa 1.5% para RE

Se aislaron 39 diferentes cepas de actinobacterias. Las cepas se sembraron puras en cajas de Petri con medio GAE. A cada mitad de la caja se le colocó un tipo distinto de cepa para obtener biomasa que fue empleada durante la extracción de DNA. En la Figura 2 se pueden observar las diferentes cepas de actinobacterias aisladas de los suelos utilizados.

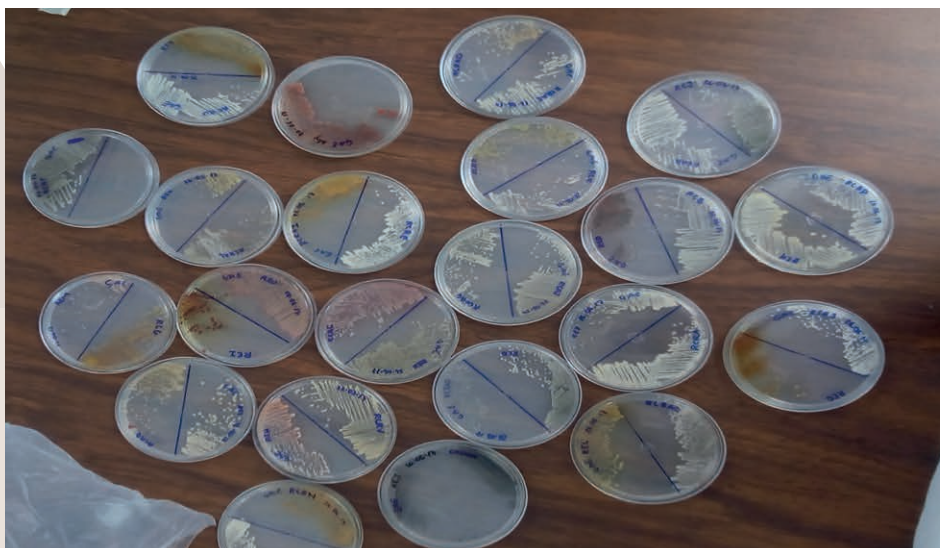


Figura 2. Cajas con los diferentes tipos de cepas

Las morfologías coloniales de las diferentes cepas aisladas de los suelos potosino se describen en las tablas 1a, 1b y 1c.

TIPO	PIGMENTACION	FORMA	BORDE	LUZ REFLEJADA	LUZ TRANSMITIDA	ELEVACIÓN	SUPERFICIE	CONSISTENCIA	TAMAÑO	IMAGEN
RCB	Verde oliva	Puntiforme	Entero	Opaca	Opaca	Convexa	Convexa	Cremosa	Pequeña	
RCJ	Blanco	Circular	Ondulado	Brillante	Opaca	Pulvinada	Acuminada	Cremosa	Mediana	
RCK	Blanco	Irregular	Ondulado	Opaca	Translúcida	Umbonada	Umbilicada	Seca	Grande	
RCH	Blanco	Irregular	Ondulado	Opaca	Transparente	Umbonada	Umbilicada	Seca	Grande	
RCG	Salmón	Irregular	Lobular	Opaca	Opaca	Convexa	Planoconvexa	Seca	Grande	
RCM	Rosa	Circular	Entero	Opaca	Translúcida	Umbonada	Papilada	Seca	Grande	

Tabla 1a- Muestra la morfología de los actinomicetos encontrados en las muestras colectadas de rizosfera de cactus, de las cuales se obtuvieron 6 cepas distintas.

TIPO	PIGMENTACIÓN	FORMA	BORDE	LUZ REFLEJADA	LUZ TRANSMITIDA	ELEVACIÓN	SUPERFICIE	CONSISTENCIA	TAMAÑO	IMAGEN
RCRC	Gris	Puntiforme	Ondulado	Opaca	Opaca	Plana	Plana	Seca	Pequeña	
RCRZ	Blanco azulado	Circular	Entero	Brillante	Opaca	Pulvinada	Acuminada	Cremosa	Mediana	
RCRH	Naranja	Puntiforme	Lobular	Brillante	Translúcida	Umbonada	Umbilicada	Seca	Mediana	
RCRAO	Camel	Puntiforme	Ondulado	Brillante	Translúcida	Plana	Plana	Cremosa	Pequeña	
RCRAD	Amarillo-naranja	Circular	Lobular	Opaca	Translúcida	Umbonada	Papilada	Seca	Grande	
RCRAE	Blanco	Puntiforme	Entero	Opaca	Opaca	Umbonada	umbilicada	Cremosa	Mediana	
RCRAL	Blanco transparente	Puntiforme	Ondulado	Opaca	Transparente	Convexa	Convexa	Seca	Mediana	
RCRAC	Blanco transparente	Puntiforme	Entero	Opaca	Transparente	Convexa	Convexa	Seca	Mediana	
RCRIU	Blanco	Circular	Entero	Opaca	Transparente	Convexa	Convexa	Seca	Mediana	
RCRE	Blanco-café	Circular	Entero	Opaca	Opaca	Pulvinada	Acuminada	Cremosa	Grande	
RCRAI	Naranja	Puntiforme	Lobular	Opaca	Translúcida	Umbonada	Papilada	Seca	Mediana	
RCRV	Gris	Puntiforme	Entero	Opaca	Opaca	Convexa	Convexa	Cremosa	Mediana	
RCRR	Verde- amarillo	Irregular	Lobular	Brillante	Translúcida	Umbonada	Papilada	Seca	Grande	
RCRS	Azul	Circular	Entero	Opaca	Opaca	Pulvinada	Acuminada	Cremosa	Grande	
RCRAG	Beige	Puntiforme	Lobular	Opaca	Translúcida	Umbonada	Umbilicada	Seca	Grande	
RCRJ	Pardo oscuro	Puntiforme	Ondulado	Opaca	Translúcida	Plana	Planoconvexa	Seca	Grande	
RCRP	Blanco	Puntiforme	Entero	Opaca	Translúcida	Convexa	Convexa	Seca	Mediana	
RCRA	Blanco	Circular	Entero	Opaca	Translúcida	Convexa	Convexa	Seca	Mediana	
RCRT	Verde oscuro	Puntiforme	Entero	Opaca	Opaca	Convexa	Convexa	Cremosa	Mediana	

Tabla 1b.-Muestra de rizosfera de sábila, de la que se extrajeron la mayor cantidad de actinomicetos, se obtuvieron 19 distintas, .

TIPO	PIGMENTO	FORMA	BORDE	LUZ REFLEJADA	LUZ TRANSMITIDA	ELEVACIÓN	SUPERFICIE	CONSISTENCIA	TAMAÑO	IMAGEN
RED	Morado	Puntiforme	Ondulado	Opaca	Opaca	Pulvinada	Convexa	Cremosa	Pequeñas	
REX	verde manzana	Irregular	Lobular	Opaca	Traslúcida	Umbonada	Papilada	Seca	Medianas	
REQ	Gris	Puntiforme	Entero	Opaca	Opaca	Convexa	Convexa	Cremosa	Medianas	
REU	Naranja	Circular	Entero	Opaca	Traslúcida	Pulvinada	Convexa	Seca	Pequeñas	
REI	Rojo anaranjado	Puntiforme	Lobular	Opaca	Opaca	Umbonada	Papilada	Seca	Grandes	
REAA	Blanco	Circular	Entero	Opaca	Opaca	Pulvinada	Convexa	Cremosa	Medianas	
REZ	Blanco, centro gris	Circular	Entero	Opaca	Opaca	Pulvinada	Acuminada	Cremosa	Grandes	
REK	Amarillo	Irregular	Lobular	Opaca	Opaca	Umbonada	Umbilicada	Cremosa	Medianas	
REL	Wengué y blanco	Circular	Ondulado	Opaca	Opaca	Elevada	Planoconvexa	Cremosa	Medianas	
REO	Marrón	Irregular	Ondulado	Opaca	Opaca	Elevada	Planoconvexa	Seca	Grandes	
REJ	Negro	Puntiforme	Lobular	Opaca	Opaca	Umbonada	Umbilicada	Seca	Pequeñas	
REH	Blanco, centro rosa	Circular	Entero	Opaca	Opaca	Pulvinada	Acuminada	Cremosa	Medianas	
REM	Rosa pálido	Irregular	Lobular	Opaca	Traslúcida	Umbonada	Umbilicada	Seca	Grandes	
REY	Blanco	Circular	Entero	Opaca	Opaca	Pulvinada	Acuminada	Cremosa	Medianas	

Tabla 1c.- Cepas extraídas de la muestra de rizosfera de encino, de las cuales se obtuvieron 14 distintos actinomicetos.

CONCLUSIÓN

El proyecto “Aislamiento e Identificación de Actinomicetos de Suelos Potosinos”, aún sigue construcción. Sin embargo, se logró aislar cepas de actinomicetos al modificar el pH del medio de cultivo, únicamente en medio básico. La cuantificación y el aislamiento de estas, en medio básico y y ácido se realizará en proyectos futuros.

Las cepas aisladas se clasificaron de acuerdo a su morfología colonial y sólo se conservó una cepa de cada morfología. De igual se aislaron las cepas que crecieron en medio básico, pero que por su diminuto tamaño de colonia, no fue posible determinar su morfología.

BIBLIOGRAFÍA

- T. R.L., *Soil Microbiology*, (2000). (second ed.) (págs. pp.47-56). New York: Wiley.
- Bergey, J., & Hendriks, D. a. (2000). En *Bergey's manual of determinative bacteriology* (pág. 787 p). Philadelphia: The Williams and Wilkins Co.
- Betina, V. (1994). En *Microbial metabolites affecting plant growth and metabolism* (págs. 192-208 p). Bioactive secondary metabolite of microorganism.
- Ghanem N.B., S. S.-s. (et al. 2000). Isolation and Enumeration of marine Actinomycetes from seawater and sediments in Alexandria. En *Applied and Environmental Microbiology* (págs. 46:105-111).
- Martín, A. (1980). En A. Martín, *Introducción a la microbiología de suelo* (pág. 198). Ciudad de México.
- Oskay M, T. A. (2004). En *Antibacterial activity of seme actinomicetes isolated from farming soils of Turkey* (págs. 441-6). African J. Biotechnol.
- R.L, T. (2000). En *Soil Microbiology (second ed.)* (págs. pp.47-56). New York: Wiley.

CELULASAS DE ORIGEN MICROBIANO

Melanie Lizbeth Ruvalcaba Villagrán.¹ y Morales Jiménez Jesús Israel.²

RESUMEN

El presente trabajo investiga la producción de celulasas por los hongos endófitos de muérdagos americanos. Los hongos endófitos se aislaron en agar PDA a partir de hojas sanas de *Phoradendron longifolium* y *P. velutinum*. La capacidad para producir celulasas de los hongos endófitos se realizó de manera cualitativa en placas de agar con carboximetilcelulosa teñidas con Rojo Congo. Los hongos que dieron positivo el ensayo cualitativo fueron cultivados en medio líquido para obtener el extracto enzimático. La cuantificación de la actividad enzimática de los extractos se determinó por el método de Miller. Los hongos H2SA2, PC3R6 y PC3R12 tuvieron una actividad de 0.01640, 0.06037 y 0.02718 UI.

ABSTRACT

This work investigates the production of cellulases by the endophytic fungi of American mistletoes. Endophytic fungi were isolated on PDA agar from healthy leaves of *Phoradendron longifolium* and *P. velutinum*. The ability to produce cellulases of endophyte fungi was performed qualitatively on carboxymethylcellulose agar plates stained with Congo Red. The positive fungal strains in the qualitative test were cultivated in liquid medium to obtain the enzymatic extracts. The enzymatic activity of the extracts was determined by the Miller method. The fungi H2SA2, PC3R6 and PC3R12 had an activity of 0.01640, 0.06037 and 0.02718 IU.

Palabras Clave: *Phoradendron longifolium*, *P. velutinum*, hongos endófitos, celulasas.

INTRODUCCIÓN

Los hongos endófitos habitan en los tejidos de las plantas sin causar síntomas de enfermedad aparente durante casi todo su ciclo de vida [1] y se localizan en los espacios intercelulares de los tejidos vegetales [2]. Se han aislado de diferentes órganos de las plantas y un diverso rango de huéspedes, incluyendo algas, briofitos, pteridofitos, gimnospermas y angiospermas. La mayoría de los hongos endófitos pertenecen al phylum Ascomycota, aunque también se han encontrado organismos pertenecientes a los phyla Basidiomycota, Zygomycota y Oomycota [3]. La estrecha relación que existe entre el hongo endófito y su planta hospedera se considera de gran importancia, ya que el hongo es capaz de producir metabolitos secundarios por su interacción con su planta hospedera y con otros endófitos. A medida que se han ido descubriendo nuevos productos naturales, el interés por los hongos endófitos ha ido en aumento, ya que estos microorganismos pueden convertirse en una fuente sostenible de dichos compuestos. La producción a gran escala de metabolitos secundarios a partir de microorganismos es más fácil y económica que su obtención por otros métodos o a partir de otras fuentes que los produzcan. El interés de explorar a los endófitos se debe a la diversidad química y biológica que cabe esperar y por el número de especies que podrían quedar por descubrir.

Las enzimas son consideradas de gran importancia no sólo en el sentido biológico, sino también por sus importantes aplicaciones en campos científicos e industriales. Por ello los investigadores se han centrado en el aislamiento de cepas microbianas que producen grandes cantidades de enzimas. A lo largo de la historia se han venido empleando las enzimas para usos industriales, una de las enzimas comúnmente utilizadas es la celulasa. Las celulasas y xilanasas son enzimas hidrolíticas que participan en el rompimiento de los enlaces glicosídicos β -1,4 presentes en los polisacáridos de la celulosa y hemicelulosa, respectivamente. El interés por las celulasas empezó alrededor de los años 50 debido a su enorme potencial para convertir la lignocelulosa en glucosa y azúcares solubles. [5]. La búsqueda de microorganismos productores de las enzimas celulolíticas es de gran importancia para desarrollo de nuevas tecnologías que implica el uso de celulosa como materia prima a tratar [6]. Para la determinación de enzimas se realizan ensayos enzimáticos fiables con cuantificación de azúcares reductores por el método de DNS. Este procedimiento se fundamenta en la reacción de los grupos reductores de los azúcares con el reactivo oxidante ácido dinitrosalicílico (DNS). El reactivo consiste en una disolución formada por los siguientes compuestos: ácido dinitrosalicílico (ácido 2-hidroxi-3,5-dinitrobenzónico), que actúa como oxidante; Sal de Rochelle (tartrato sódico-potásico), que impide la disolución de oxígeno en el reactivo e hidróxido sódico, que aporta el medio requerido para que se produzca la reacción redox. De esta forma, el ácido 2-hidroxi-3,5-dinitrobenzónico se reduce, en presencia del grupo reductor de la glucosa, formando el ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, mientras que el grupo aldehído reductor se oxida, para formar un grupo carboxílico. En este método analítico el DNS está en exceso frente a los grupos reductores y en todas las muestras se adiciona la misma cantidad, de tal forma que mayores concentraciones de azúcares reductores provocan una mayor coloración de la muestra. Estas diferencias de coloración pueden determinarse por espectrofotometría de luz visible, a la longitud de onda de máxima absorbancia de 540 nm.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico

Los muérdagos se colectaron de dos zonas de la Sierra de Álvarez, San Luis Potosí. *P. longifolium* se colectó en las coordenadas geográficas latitud 22°2' N y longitud 100°33' O y *P. velutinum* se tomó en latitud 22°4' N y longitud 100°38' O. De los muérdagos se tomaron hojas sanas, sin sintomatología de enfermedades causadas por hongos y se reunieron vástagos de cada muestra que fueron tomados al azar. El material vegetal

se colocó en bolsas ziploc y se conservó a 4°C hasta su procesamiento en el laboratorio dentro de las 24 h siguientes.

Aislamiento de hongos endófitos.

La desinfección superficial de las hojas se realizó por inmersión consecutiva durante 1 min en hipoclorito de sodio 10%, 1 min en etanol al 70% (v/v) y cinco lavados de 1 min cada uno con agua destilada estéril. La efectividad del proceso se comprobó mediante la inoculación de 100µL de agua sobrante del último lavado en una caja con agar papa dextrosa (PDA). Después, las hojas se cortaron en secciones pequeñas (1-3 mm²) entre la nervadura central y el borde de la hoja y se colocaron en cajas con PDA. En cada caja se colocaron 10 fragmentos de hoja por triplicado. Las cajas se incubaron a 28 °C durante 5-7 días. Cada colonia de hongos se transfirió a medio fresco para tener cultivos axénicos.

Ensayo cualitativo de actividad de celulasa.

La actividad de celulasa en placa se midió en medio CMC (9g levadura Extracto; 0,4g K₂HPO₄; 0,001g ZnSO₄ 7H₂O; 0,6g KH₂PO₄; 0,05g FeSO₄ 7H₂O; 0,05g MnSO₄ H₂O; 0,5 g MgSO₄ 7H₂O; 10g Carboximetilcelulosa; en g / L), (Téllez-Téllez et al. 2008). Las placas se inocularon y se incubaron a 28 °C durante 5 a 7 días. La actividad de celulasa se reveló con Rojo Congo al 0.2%. Las cajas se tiñeron durante 30 min a temperatura ambiente y el exceso de colorante se eliminó con NaCl 1 M. La actividad de celulasa se observa como un halo transparente o amarillo alrededor de la colonia.

Obtención de extracto enzimático (EE)

Matraces de 250mL con medio CMC líquido se inocularon con los hongos con un mayor halo de actividad de celulasa y se incubaron por 7 días a 28°C en agitación constante a 120. Después del periodo de incubación los cultivos se colocaron en tubos falcón de 50 mL y se centrifugaron a 10,000g por 10 min a 4°C. Finalmente el sobrenadante (EE) se separó de la biomasa.

Determinación de azúcares reductores por el método DNS

Para evaluar la actividad enzimática celulolítica del EE se cuantificaron los azúcares reductores liberados por los extractos fúngicos utilizando el método DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) (Miller 1959). Las mezclas de reacción contenían 475µl de sustrato y 25µL de EE, 250µl de sustrato y 250µL de EE y 400µl de sustrato y 100µL de EE. Las reacciones se realizaron en tubos eppendorf de 1.5mL y se incubaron en un baño de agua caliente en un equipo Heating Bath B-100 a 50 °C por 1 h y por 24 h. Posteriormente, los tubos eppendorf fueron colocados en hielo. La determinación de los azúcares reductores se realizó con 50µl de la mezcla de reacción y 150µl de reactivo de DNS. Las reacciones de DNS se incubaron en un termociclador Veriti durante 10 minutos a 95°C. Una curva patrón de Glucosa desde 50µg/mL hasta 1000µg/mL se realizó para interpolar las lecturas de las reacciones de DNS. La absorbancia de las reacciones de DNS se leyeron a 540nm en un espectrofotómetro para microplacas BIORAD Benchmark Plus.

Cuantificación de proteína

El contenido proteico de los extractos enzimáticos de los hongos endófitos se cuantificó por el método de Bradford modificado a 595nm (Zor y Selinger, 1996).

RESULTADOS

Hongos endófitos

Un total de 10 cepas de hongos endófitos fueron aisladas de las especies de muérdago estudiadas. A partir de hojas de *Phoradendron longifolium* se aislaron 8 cepas (PL3H1, PL3H2, PL3H3, PL3H4, PL3H5, PL3H7, PL3H9 y PL3H10) y de *Phoradendron velutinum* se aislaron 2 cepas (PV3H2 y PV3H4).

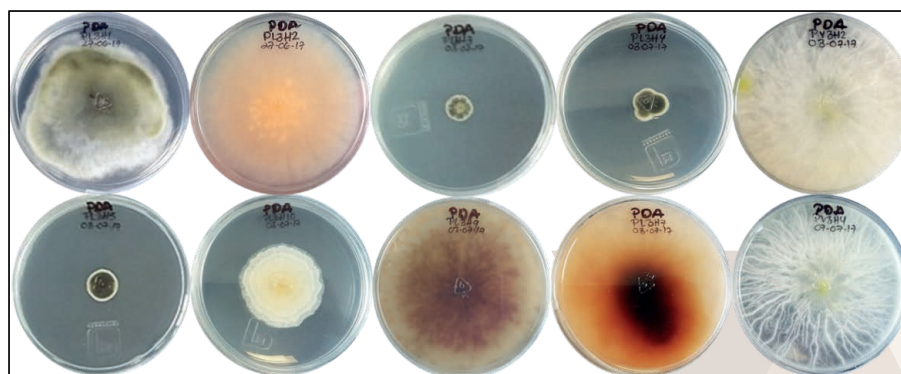


Figura 1. Cepas de hongos endófitos aislados de *Phoradendron longifolium* y *Phoradendron velutinum*.

Ensayo de actividad enzimática

A partir de una colección de cepas de hongos endófitos de *Phoradendron velutinum* se detectó que la cepa H1VFM1 de *Epicoccum* sp. Presento actividad celulolítica en medio de CMC teñido con Rojo Congo. De la misma manera, 4 cepas asociadas a *Psittacanthus calyculatus* (PC3CH5, PC3R12, PC3R7, PC3R6) presentaron actividad. También, la cepa HISA2 aislada a partir de hojas de *Salvia amarissima* presento actividad celulolítica. A partir de la rizosfera de encino se aislaron 4 cepas fúngicas y 2 (Rea Y Reß) de ellas degradaron la celulosa. La **Figura 2**. Muestra la actividad celulolítica de las cepas fúngicas visualizada por medio de un halo de hidrólisis de color amarillo-transparente alrededor de la colonia.

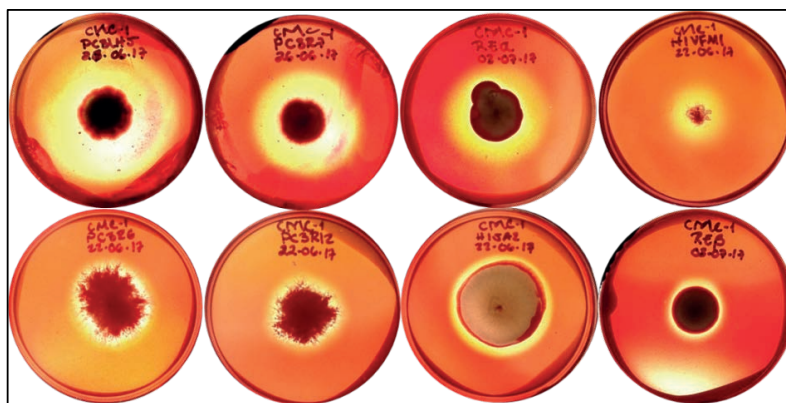


Figura 2. Actividad Celulolítica de microorganismo fúngicos.

Actividad enzimática

Los hongos H2SA2, PC3R6 y PC3R12 tuvieron una actividad de celulasa de 0.01640, 0.06037 y 0.02718 UI. Una unidad internacional (UI) se define como la cantidad de enzima en mg necesaria para producir un μmol de glucosa por minuto.

CONCLUSIONES

Mediante pruebas cualitativas y cuantitativas se logró comprobar que existen hongos endófitos de muérdagos con actividad celulolítica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kusari S., Hertweck C., Spiteller M. (2012). *Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites*. Chem Biol. 19: pp 792-798.
2. Strobel G. y Daisy B. (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. Microbiol Mol Biol R. 67 (4): pp 491-502.
3. Rosa L.H. et al (2011). Drug Development, Acase study based insight into modern strategies. Ed. Rundfeldt, C. pp 1-18
4. Ramírez, P. y Cocha, J. "Degradación de celulosa por actinomicetos termófilos: aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celulolítica". Rev. Peru. biol.1. (1):67-77(2003).
5. Ponce, T. y Pérez, O. (2002) "Celulasas y xilanasas en la industria", Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Cinvestav.
6. Sinicin A.P; Chernoglasov V.M; Gisakov A.B (1993) Métodos de estudio y propiedades de las enzimas celulolíticas. Moscú, 150 pp
7. T.K. Ghose. Measurement of cellulase activities, 1987.
8. Anamaria Negrulescu, Viorica Patrulea, Manuela M. Mincea, Cosmin Ionascu, Beatrice Vlad-Oros, Vasile Ostafe (2012) "Adapting the Reducing Sugars Method with Dinitrosalicylic Acid to Microtiter Plates and Microwave Heating".

ADSORCIÓN Y LIBERACIÓN CONTROLADA DE CARVACROL SOBRE NANOESFERAS DE DIÓXIDO DE SILICIO

Miguel Ángel Franco Carranza¹ y Vicente Rodríguez González²

RESUMEN

Las nanopartículas cerámicas poseen propiedades fisicoquímicas y estructurales que las hacen ideales como agentes nanofarmacéuticos, tal es el caso de las nanoesferas de dióxido de silicio las cuales por su elevada biocompatibilidad, porosidad ordenada, capacidad de adsorción, estabilidad mecánica y baja toxicidad son capaces de llevar a cabo la adsorción y liberación de una gran variedad de componentes activos. Se llevó a cabo la adsorción de carvacrol sobre nanoesferas de dióxido de silicio debido a sus propiedades como agente antibacteriano, antioxidante y antiinflamatorio, para posteriormente evaluar su liberación. Las técnicas de caracterización utilizadas fueron espectrofotómetro Uv-Vis, FTIR, SEM y DRX. Se cuantificaron las concentraciones de carvacrol adsorbidas y liberadas sobre las nanoesferas de dióxido de silicio, el tamaño de las nanoesferas y las interacciones entre el carvacrol y las nanoesferas de dióxido de silicio.

Palabras Clave: carvacrol, nanoesferas, dióxido de silicio, porosidad ordenada, adsorción.

ABSTRACT

Ceramic nanoparticles possess physicochemical and structural properties that make them ideal as nanopharmaceutical agents, such as silicon dioxide nanospheres which, due to their high biocompatibility, ordered porosity, adsorption capacity, mechanical stability and low toxicity, can carry out the adsorption and release of a wide variety of active components. The adsorption of carvacrol on silicon dioxide nanospheres was carried out due to its properties as an antibacterial, antioxidant and anti-inflammatory agent, to later evaluate its release. The characterization techniques used were Uv-Vis spectrophotometer, FTIR, SEM and DRX. The concentrations of adsorbed and released carvacrol on silicon dioxide nanospheres were quantified, the size of nanospheres and the interactions between carvacrol and silicon dioxide nanospheres were analyzed.

Keywords: carvacrol, nanospheres, silicon dioxide, ordered porosity, adsorption.

INTRODUCCIÓN

El incremento de la investigación de los nanomateriales para su utilización en la administración controlada de fármacos es debido a que las estrategias actuales de suministro presentan desventajas entre las cuales se encuentran mala solubilidad en el torrente sanguíneo, rápida descomposición, pérdida de actividad, entre otras. Por estas razones se han comenzado a investigar nuevos sistemas de administración, entre ellos se encuentran las nanopartículas cerámicas como el dióxido de titanio, dióxido de zirconio y el dióxido de silicio, las cuales poseen características que las hacen ideales como agentes nanofarmacéuticos, tales como su tamaño de partícula que puede llegar a ser menor de 50 nm, una elevada superficie específica y su naturaleza porosa que no muestra cambios con el pH. La razón por la cual estos tipos de materiales cerámicos puedan ser usados para la liberación de principios activos se encuentra por una parte en el fenómeno de adsorción que se lleva a cabo en el interior de los poros del material, que permite el alojamiento de los fármacos hasta su liberación bajo condiciones adecuadas y, por otro lado, a través de interacciones y enlaces covalentes.

Las nanoesferas de dióxido de silicio poseen características que las hacen ideales para llevar a cabo la adsorción y liberación de fármacos ya que cuentan con un tamaño de poro que puede ajustarse desde 50 a 300 nm, buena estabilidad y rigidez, mesoporosidad ordenada, baja toxicidad y además posee una superficie interna que permite funcionalizarlas con otro tipo de moléculas para modificar su acidez lo que permite controlar su liberación en distintos tipos de medios. Los principales grupos que se forman durante la síntesis de las nanoesferas de dióxido de silicio son el silanol y el siloxano, este último favorece su resistencia a la degradación mecánica.

Actualmente se extraen los componentes activos de diferentes plantas con actividad antimicrobiana, una de ellas es el tomillo la cual posee dos componentes principales bioactivos el timol y el carvacrol. El carvacrol es un fenol monoterpenoide el cual tiene un sabor picante y produce el olor del orégano, este inhibe el crecimiento de diversas cepas de bacterias como *e. coli* y *b. cereus*, también posee propiedades antiinflamatorio y antioxidantes por lo cual es ideal para ser utilizado en nuevos métodos de liberación de fármacos como lo son las nanoesferas de dióxido de silicio. En el presente trabajo se realizó la síntesis de las nanoesferas de dióxido de silicio por un método Stöber modificado para posteriormente evaluar la adsorción de carvacrol sobre las nanoesferas de dióxido de silicio y su liberación en agua destilada, cuantificando las cantidades adsorbidas y liberadas por un método indirecto mediante espectroscopia Uv-Vis.

MÉTODOS Y MATERIALES

Síntesis de las nanoesferas de dióxido de silicio

Para la síntesis de las nanoesferas de dióxido de silicio (SiO₂NSs) se utilizó un reactor de dos litros de capacidad al cual se agregó 400 mL de agua destilada, 0.6414 g de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) y 16 mL de hidróxido de amonio, posteriormente se colocó sobre una parrilla de agitación a 750 rpm y se agregó 17.14 mL de tetraetil ortosilicato (TEOS) a modo de goteo, se calentó la solución hasta los 90°C en la cual se mantuvo una hora, al término de la hora se apagó la agitación y la temperatura hasta que la solución se enfrió. Se vació la solución en vasos

de centrifuga de 250 mL y se centrifugó a 13,000 rpm por 15 min, posteriormente se realizaron 3 lavados con una solución de etanol-agua en una concentración 1-1 a 13,000 rpm por 10 min. Se recuperó el sedimento en crisoles y se metió al horno a 80°C por 12 horas, posteriormente se filtró con una bomba de vacío y una membrana de lecho poroso haciendo enjuagues con la solución de etanol-agua. Finalmente, el sedimento obtenido se metió en la mufla a 500°C por cuatro horas y posteriormente se pulverizó en un mortero para obtener las SiO₂NSs.

Adsorción de carvacrol sobre las nanoesferas de dióxido de silicio

La adsorción se realizó por duplicado y se utilizaron tres concentraciones diferentes de carvacrol (23.30, 42 y 52.40 µL) las cuales se agregaron en 10 mL de etanol y 200 mg de las SiO₂NSs, posteriormente se sometieron a ultrasonido por 10 minutos y se colocaron en una parrilla de agitación a 60 rpm y se tomaron muestras de 300 µL a las 0, 1, 2, 3, 5, 8, 12, 24 y 48 horas, se centrifugaron las muestras a 9,000 rpm por 5 minutos posteriormente se realizaron diluciones tomando 10 µL del sobrenadante de las muestras y 990 µL de etanol, para posteriormente analizar las muestras en el espectrofotómetro Uv-Vis. La solución de SiO₂NSs-Carvacrol se centrifugó a 4,000 rpm por 20 minutos para la recuperación de las SiO₂NSs cargadas con carvacrol.

Liberaciones de carvacrol-SiO₂NSs

La liberación de carvacrol se realizó en 50 mL de agua destilada en la cual se agregaron 50 mg de SiO₂NSs-Carvacrol, posteriormente se colocaron en agitación a 250 rpm y se tomaron muestras de 1,000 µL a las 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 5, 8, 12 y 24 horas, se centrifugaron las muestras a 9,000 rpm por 5 minutos, se analizó el sobrenadante mediante espectroscopia Uv-Vis. Las soluciones de las liberaciones se centrifugaron a 4,000 rpm por 20 min para la recuperación de las SiO₂NSs.

RESULTADOS

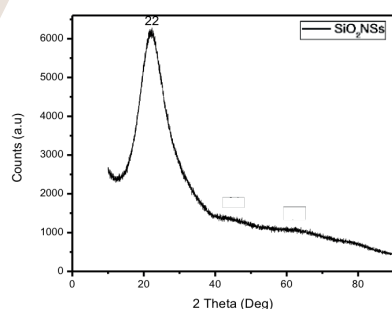


Figura 1. Análisis por DRX de las SiO₂NSs

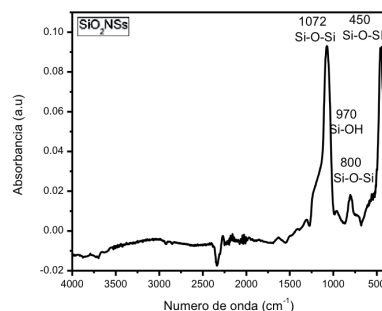


Figura 2. Análisis por FT-IR de las SiO₂NSs

En la figura 1 se observa la curva de difracción de rayos X de las nanoesferas de dióxido de silicio, observando un pico a 22° (2θ) el cual es característico del dióxido de silicio, además se puede observar que tiene una cristalinidad amorfa o también se podría decir que no es cristalino, lo cual ya ha sido reportado anteriormente por Usha et al. (2013). En la figura 2 se observa el espectro FT-IR de las nanoesferas de dióxido de silicio donde están marcadas sus bandas características en 1,072, 970, 800 y 450, los cuales corresponden a los enlaces Si-O-Si con una vibración de tensión asimétrica, Si-OH con una vibración de tensión, Si-O-Si con una vibración de tensión simétrica y Si-O-Si con una vibración de flexión respectivamente. Estos resultados ya han sido reportados anteriormente por Cornejo et al (2009).

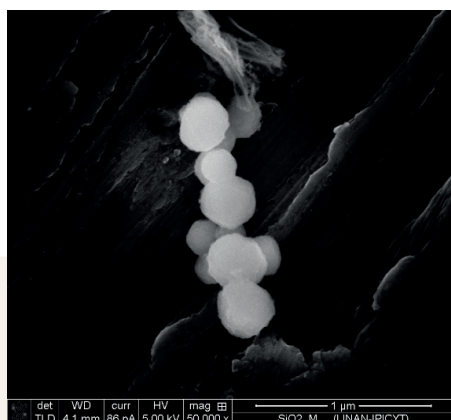


Figura 3. Análisis por SEM de las SiO₂NSs

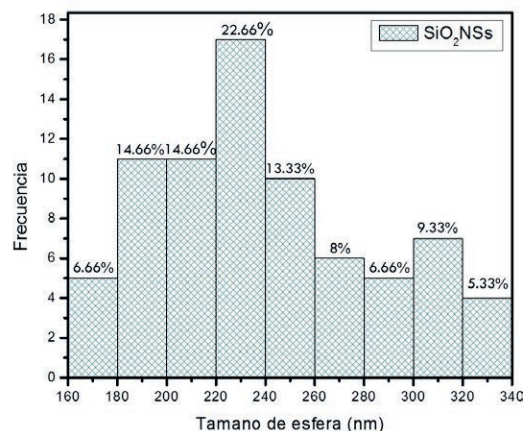


Figura 4. Histograma del tamaño de las SiO₂NSs

En la figura 3 se observan las nanoesferas de dióxido de silicio mediante la técnica de microscopía electrónica de barrido, comprobando así que la síntesis de las nanoesferas se llevó a cabo exitosamente.

En la figura 4 se observa el histograma del tamaño de las nanoesferas, se contaron 76 esferas y se midió su diámetro utilizando el software Comptage de particule, se obtuvo un 51.98% de esferas con tamaño de 180 a 240 nm.

Tabla. 1. Adsorción de carvacrol sobre las SiO₂NSs

Experimento	Concentración inicial (mg)	Carvacrol adsorbido (mg)	
		1	2
C1	22.7	2.0291	6.3466
C2	40.992	3.0573	7.0634
C3	51.1424	6.0119	1.2892

En la tabla 1 se muestran los resultados de las adsorciones de carvacrol sobre las nanoesferas de dióxido de silicio que fueron realizados por duplicado, para la concentración uno de 22.7 mg se obtuvieron adsorciones de 2.0291 y 6.3466 mg, para la concentración dos de 40.992 mg se obtuvieron adsorciones de 3.0573 y 7.0634 mg, por ultimo para la concentración tres de 51.1424 mg se obtuvieron adsorciones de 6.0119 y 1.2892 mg. Se encontró una gran variación entre las adsorciones aun cuando se utilizaron las mismas concentraciones de carvacrol en las adsorciones.

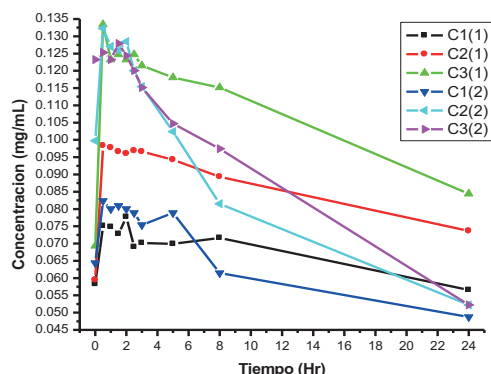


Figura 5. Liberaciones de las SiO₂NSs-Carvacrol durante 24 horas

Tabla. 2. Liberaciones de las SiO₂NSs-Carvacrol

Experimento	Concentración inicial (mg)	Carvacrol liberado (mg)	Carvacrol liberado (%)
C1(1)	2.02918	0.0778	3.82
C2(1)	3.05732	0.0982	3.22
C3(1)	6.012	0.1331	2.21
C1(2)	6.3466	0.0823	1.31
C2(2)	7.0634	0.1319	1.87
C3(2)	1.2892	0.1278	9.92

En la figura 5 se observa que el tiempo en el que se libera la mayor cantidad de carvacrol es durante las primeras 3 horas en todos los experimentos ya que después empieza a decaer la concentración de carvacrol como se observa en las horas 12 y 24 en las cuales la concentración muestra una disminución continua.

En la tabla 2 se observan las cantidades de carvacrol que se liberaron con respecto a las concentraciones que se habían adsorbido, mostrando los porcentajes muy parecidos en el experimento uno, mientras que en el experimento dos el porcentaje de liberación de una de las pruebas varió considerablemente

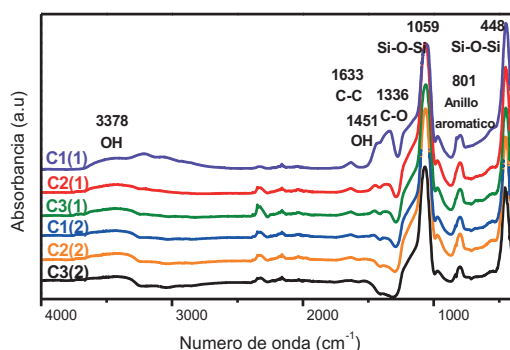


Figura 6. FT-IR de las SiO₂NSs cargadas con carvacrol

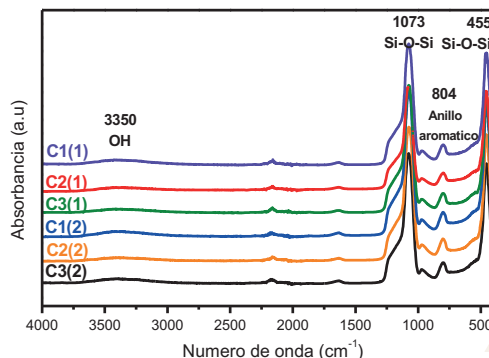


Figura 7. FT-IR después de las liberaciones de SiO₂NSs-carvacrol

En la figura 6 se observa el espectro FT-IR de las SiO₂NSs cargadas con carvacrol en donde se observan las bandas características de las nanoesferas de dióxido de silicio las cuales se encuentran en 1,059 y 448 que corresponden a los enlaces Si-O-Si con un tipo de vibración de tensión asimétrica y flexión respectivamente. También se observan las bandas características del carvacrol las cuales se encuentran en 3,378, 1,633, 1,451, 1,336 y 801, donde se encuentran los enlaces OH con vibración de tensión, C-C con vibración de tensión, OH con vibración de flexión, C-O con vibración de tensión y el anillo aromático con vibración de flexión respectivamente, estas bandas características del carvacrol han sido reportadas anteriormente por Karim et. al. (2012). Demostrando así que las nanoesferas de dióxido de silicio si adsorbieron parte del carvacrol.

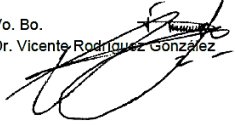
En la figura 7 se observa el espectro FT-IR de las SiO₂NSs-carvacrol después de la liberación en la cual se observan las bandas 1,073 y 455 las cuales corresponden a los enlaces Si-O-Si con un tipo de vibración de tensión asimétrica y de flexión respectivamente, las cuales corresponden a las nanoesferas de dióxido de silicio. También se observan bandas en 3,350 y 804 las cuales corresponden a los enlaces OH con vibración de flexión y el anillo aromático con vibración de flexión los cuales corresponden al carvacrol. Algunas de las bandas del carvacrol que se encontraron en la figura 6 desaparecieron debido a la liberación del mismo.

CONCLUSIONES

Se obtuvieron nanoesferas de dióxido de silicio con un tamaño promedio de 180 a 240 nm, el cual está dentro del rango que se puede obtener en la síntesis de las mismas, ya que el tamaño puede variar dependiendo de la cantidad de los reactivos que se utilicen. La temperatura también es un factor que incide directamente proporcional al tamaño de la nanoesfera, aunque para determinar el grado de influencia en este, se deben hacer conteos de al menos 500 esferas.

Respecto a la adsorción de carvacrol se obtuvo una mayor cantidad cuando la concentración de este es alta, pero en el duplicado que se hizo no se obtuvo el mismo comportamiento. Con respecto a la liberación los porcentajes fueron distintos, puede ser debido a que se utilizaron distintos materiales en la realización del duplicado, por lo cual no se logró realizar una cinética para la liberación del carvacrol.

Vo. Bo.
Dr. Vicente Rodríguez González



BIBLIOGRAFÍA

Espinoza, C. (2015). *Síntesis de nanopartículas de SiO₂ como potenciales vehículos para administración de fármacos* (tesis de maestría). Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, San Luis Potosí, S.L.P.

Usha, P., Madhusudhanamurthy, J. & Sreedhar, B. (2013). "Dynamic adsorption of α -pinene and linalool on silica nanoparticles for enhanced antifeedant activity against agricultural pests" en *Journal of Pest Science*, No. 87, pp. 191-200. Consultada en <https://www.semanticscholar.org/paper/Dynamic-adsorption-of-%CE%B1-pinene-and-linalool-on-sil-Rani-Madhusudhanamurthy/a806747f923b8417d218fadb12b3102e5ccf73ce> (fecha de consulta 26-07-2017).

Kota, R., Khalil, E., Tsutomu K., Kazumi, M. & Keisuke, M. (2013). "A novel method for synthesis of silica nanoparticles" en *Journal of Colloid and Interface Science*, No. 289, pp. 125-131. Consultada en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15913636> (fecha de consulta 26-07-2017).

A. Karim, A. Jalil, S. Triwahyono, S. Sidik, N. Kamarudin R. Jusoh, N. Jusoh & B. Hameed. (2012). "Amino modified mesostructured silica nanoparticles for efficient adsorption of methylene blue" en *Journal of Colloid and Interface Science*, No. 386, pp. 307-314. Consultada en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22889626> (fecha de consulta 27-07-2017).

Ikbal, S., Kasim, H. & Amal S. (2005). "Qualitative and Quantitative Evaluation of some Organic Compounds in Iraqi Thyme" en *National Journal of Chemistry*, No. 19, pp. 366-379. Consultada en <http://www.iasj.net/iasj?func=fulltext&aId=60880> (fecha de consulta 27-07-2017).

Cornejo, D., Sánchez, J. & Guarneros, C. (2009). "Nanoesferas monodispersas de SiO₂: síntesis controlada y caracterización" en *Sociedad Mexicana de Ciencia y Tecnología de Superficies y Materiales*, No. 22, pp. 44-48. Consultada en http://smcsyv.fis.cinvestav.mx/supyvacc/22_3/SV2234409.pdf (fecha de consulta 27-07-2017).

Andrade, M., Díaz, L. & Cortés, D. (2013). "Materiales nanoestructurados cerámicos como vehículo para la liberación de principios activos" en *Avances en química*, No. 8, pp. 171-177. Consultada en <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=93330145004> (fecha de consulta 27-07-2017).

L.G Wade. Jr. (2012). *Química Orgánica*. México: PEARSON.

HONGOS RECOLECTADOS DE LA SIERRA MADRE ORIENTAL DE SAN LUIS POTOSÍ: IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE UN MICROMICETO

García Castro Hermelinda.¹ y Terán Figueroa Yolanda.²

RESUMEN

Fue purificado un macromiceto (denominado # 8) el cual fue colectado en la Sierra Madre Oriental de San Luis Potosí en tiempo de secas. Este fue crecido en caja de Petri y se obtuvo una curva de crecimientos. Las características macroscópicas y microscópicas fueron descritas. El ADN de este fue extraído y su concentración y relación de Absorbancia 260/280 se estableció. Con este ADN se montó una reacción de PCR con el objetivo de amplificar la región ITS del ADN ribosomal para poder hacer la identificación molecular después de analizar la secuencia, desafortunadamente no fue posible obtener el amplicón esperado, aun cuando se ensayaron varias modificaciones en las condiciones.

Palabras Clave: ADN, electroforesis, purificación, macromicetos.

ABSTRACT

A macromycete (denominated # 8) which was collected in the Sierra Madre Oriental of San Luis Potosí in the dry season was purified. This was created in Petri box and obtained a curve of growth. Macroscopic and microscopic features were described. DNA from this was extracted and its concentration and Absorbance 260/280 ratio was established. With this DNA a PCR reaction was set up with the aim of amplifying the ITS region of the ribosomal DNA to be able to do the molecular identification after analyzing the sequence, unfortunately it was not possible to obtain the expected amplicon, even though several modifications were made to the conditions.

Key Words: DNA, electrophoresis, purification, macromicets.

INTRODUCCIÓN

Se dice que los hongos son organismos con núcleo que se reproducen por esporas, carecen de clorofila, se reproducen sexual o asexualmente y tienen estructuras somáticas filamentosas y ramificadas rodeadas por una pared celular hecha de celulosa, quitina o ambas. Una definición que intenta ser exhaustiva señala que son organismos heterótrofos (incapaces de usar el bióxido de carbono como única fuente de carbono) e ingieren su alimento por absorción (Alexopoulos y col, 1996).

La micología es el estudio de los hongos, grupo diferentes de organismos más emparentados con los animales que con las plantas, en un conocimiento preciso de su estructura bioquímica y genética, constituidos especialmente en los últimos años. Los hongos se dividen actualmente en tres reinos separados y distintos. Es erróneo y podría ser mal interpretado refiriéndose a los hongos como “plantas sin clorofila” (FAO, 2014). Los hongos proveen una gran gama de metabolitos secundarios, algunos con actividad biológica que se puede usar en medicina (Carlile y col, 2001). Investigaciones demuestran que la cantidad diversa de macromicetos producen compuestos antimicrobianos, antifúngicos, antivirales y citostáticos. Actualmente las identificaciones de los hongos se hacen a nivel molecular amplificando la región ITS del ADN ribosomal. De lo anterior deriva la importancia de conocer el género y especie de diferentes macromicetos para a futuro estudiar sus metabolitos en beneficio del humano. Así el objetivo del presente trabajo fue purificar e identificar molecularmente a un hongo macroscópico colectado en la sierra Madre Oriental de San Luis Potosí.

¹Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Periférico Raúl López Sánchez y Carretera Santa Fe, S/N. CP 27054, Torreón Coahuila; MÉXICO. hermej05@hotmail.com

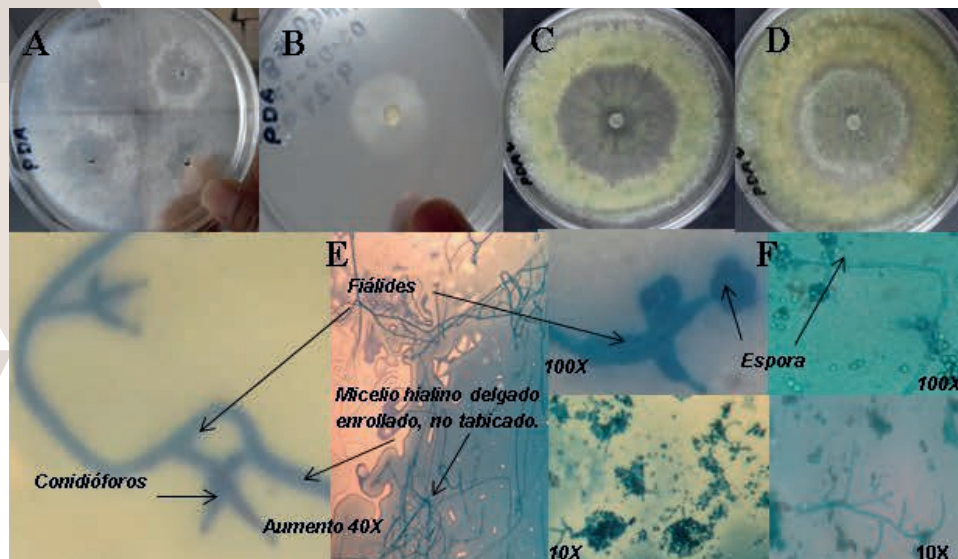
² Universidad Autónoma de San Luis Potosí Facultad de Enfermería. Av. Niño Artillero No. 130 C.P. 78240, San Luis Potosí, S.L.P., MÉXICO. yolandat@uaslp.mx; vgguaslp2@hotmail.com

METODOLOGÍA

De un macromicetos (denominado #8) colectado en la Sierra Madre Oriental en tiempos de secas (2014) y conservado a -30°C, se procedió a hacer la descripción morfológica (características de la superficie y borde, tamaño, color, etc.) De una laminilla del hongo (donde se encuentran los cuerpos fructíferos), se realizó la siembra primaria en caja de Petri con medio PDA dividida en 4 cuadrantes. A partir de la laminilla, se tomaron 4 segmentos pequeños para colocarlos uno en cada parte de la caja de cultivo, dejándolo crecer por tres días a temperatura ambiente, esto para purificar al hongo. Se observó el crecimiento cada 24 horas hasta obtener colonias idénticas al menos en tres de los 4 cuadrantes, como sucedió. De uno de los tres cuadrantes se tomó un bocado de 0.5 cm de diámetro y se hizo un re-aislado para corroborar la purificación. Fue establecida una curva de crecimiento en caja haciendo una resiembra y midiendo el aumento radial por día hasta que esta se llenó. Las características de la colonia fueron descritas. Todos los cultivos se incubaron a temperatura ambiente y se siguieron hasta por un máximo de 7 días. Para observar las características microscópicas se tomaron con cinta kristal muestras de micelio de cada día de crecimiento de una de las cajas, se tiñeron con verde de malaquita y se tomaron fotografías.

Para la Extracción de DNA se utilizó el kit comercial Wizard® (Genomic DNA Purification Kit). El DNA aislado se conservó a -20°C y posteriormente la relación de absorbancia 260/280 nm fue cuantificada por triplicado por espectrofotometría (NanoDrop-1000 Spectrophotometer). Para observar la integridad del mismo se corrió en un gel de agarosa al 1.2% previamente teñido con bromuro de etidio (5 µL/100 mL) con amortiguador TAE 1X a 80 V por alrededor de una hora y cuarenta y cinco minutos. El gel se fotografió en un fotodocumentador con luz UV (ENDURO™ GDS) y se procedió a su análisis.

Para la amplificación por PCR se usaron los cebadores ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG), directo, e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC), reverso (White *et al.*, 1990). El volumen total de la reacción se llevó a 25 µL, (0.2 µL de TaqPol 5 U/µL, 1.5 µL de MgCl₂ 50 Mm, 2.5 µL de buffer PCR 10X, 5 µL dNTPs 10 mM, 1 µL de DNA, 1 µL de cada cebador 10 µM y 7.8 µL de agua desionizada estéril). La amplificación se hizo en un termociclador 3PrimeG de Techne®, bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C por 6 min, desnaturalización a 94°C por 20 seg, alineamiento a 62°C por 15 seg, elongación a 72°C por 20 seg y elongación final a 72°C por 6 min, se realizaron 30 ciclos para la desnaturalización, alineamiento y elongación.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El macromiceto denominado #8 se encontraba unido a un árbol y asociado a otro hongo en el sitio de recolección (figura 1 A). Este presenta forma tipo repisa con borde doble y es de color café con aspecto leñoso. El olor que despidе recuerda al de los hongos comestibles.



Fig. 1 Característica macroscópica del macromiceto denominado #8. A. Fotografía den el lugar de recolección. B. Fotografía en el laboratorio.

Posteriormente se llevó a cabo la purificación del hongo haciendo un re-aislado a partir de una colonia de la siembra original (figura 2A). A las 8 horas tenía un diámetro de 2.7 cm (figura 2B). La a colonia presenta las siguientes características: crecimiento en olas, con colores inicialmente verde al centro y luego blanquecino transparente con una ola verde-amarillenta para terminar en borde blanco (cultivos de 24 a 48 horas), posteriormente se observa el centro con pigmento blanco-verde (cultivo de 72 a 96 horas). La colonia es seca y polvosa (figura 2 D). Microscópicamente se encuentran hifas hialinas retorcidas, conidios y esporas (Figura 2 E y F).

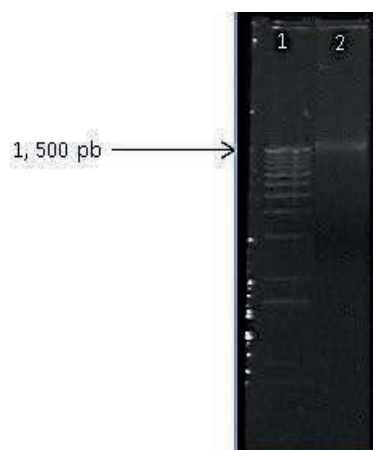


Fig. 2 Purificación del hongo #8 en medio de cultivo PDA, A; cuadrantes sembrados con fragmentos del hongo. B; re-siembra del hongo. C y D; crecimiento de las colonias a las 72 y 96 horas E; Estructuras microscópicas. Se observan los conidióforos, fiálides y esporas. Tinción verde malaquita. Aumento 10X, 40X y 100X.

En la figura 3 se observa la curva de crecimiento. A las 72 h la colonia choca con los bordes de la caja.

Fig. 3 Curva de crecimiento de macromiceto #8 en cultivo PDA. Incubación a temperatura ambiente por 72 h. Posteriormente se procedió a hacer la extracción del ADN del macromiceto y verificación de la calidad del mismo como primer paso para posteriormente hacer la amplificación. La integridad del ácido nucleico pudo observarse en un gel de agarosa al 1.2 % como puede verse en la figura 4.

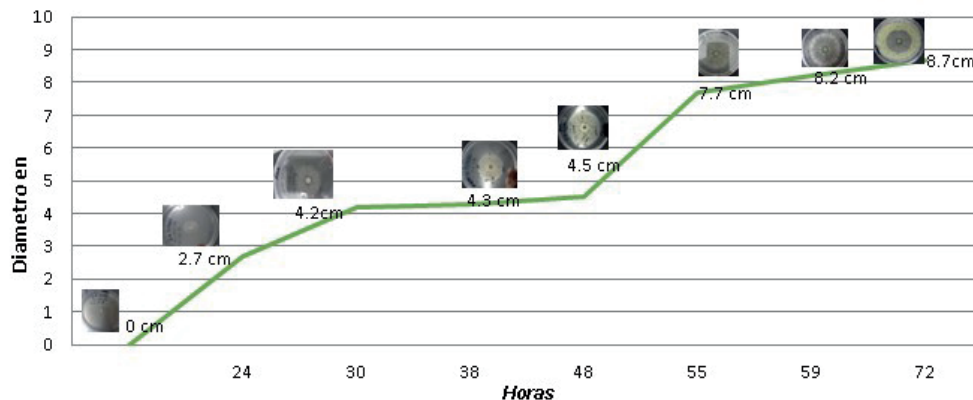


Figura 4. Comportamiento del ADN extraído del micromiceto. Carril 1, marcadores de tamaño; carril 2, ADN extraído.

La PCR para amplificar la región ITS del ADN ribosomal se hizo como se describe en la metodología, desafortunadamente no fue posible obtener el amplicón esperado, aun cuando se ensayaron varias modificaciones en las condiciones.

DISCUSIÓN

En la propagación de las especies de hongos en la Reserva, intervienen diversos vectores como aire, lluvia y algunos roedores que abundan en la zona. El sustrato sobre el cual se encontró al hongo fue la madera, por lo que puede presumirse que libera celulastas. Este hongo, al igual que todos los otros encontrados en el área, tiene una importancia ecológica que ha sido poco estudiada. En esta ocasión se amplía el conocimiento de dicho macromiceto al hacer una purificación. Por otro lado, se deja como perspectiva la identificación molecular, ya que como se mencionó, no fue posible obtener el amplicón esperado. Esta es más confiable debido a su repetitividad (ya que se

basa en la comparación de un carácter invariable) y tiene su fundamento en la comparación de secuencias provenientes de organismos que han sido identificados morfológicamente (Feregrino-Feregrino y col, 2013). Además es posible obtener tanto el género como la especie.

CONCLUSIONES

- Fue posible purificar al hongo y describirlo macro y microscópicamente.
- No fue posible obtener el amplicón esperado como producto de la PCR utilizando los oligos ITS1 e ITS4.
- Se deja como perspectiva buscar las condiciones adecuadas para la amplificación de la región ITS del ADN ribosomal del hongo para poder posteriormente secuenciar y hacer comparaciones en bases de datos, de tal manera que pueda hacerse la identificación molecular del mismo.

REFERENCIAS

ALEXOPOULOS, C.J., MIMS, C.W., & BLACKWELL, M.M. (1996). *Introductory Mycology*, 4th Edition. Wiley, Nueva York.

CARLILE, M. J., WATKINSON, S. C., & GOODAY, G. W. (2001). *The Fungi. Academic Press*. San Diego, CA. USA. 586 p.

FAO (2014). Food and Agriculture Organization of the United Nations.

FEREGRINO-FEREGRINO, CH.A., MORALES-GARZA, M.R., MARTÍNEZ-GARCÍA, M., MONSALVO-REYES, A., & CAMPOS-CONTRERAS, J.E. (2013). Molecular description of macromicete fungi of the genera *Amanita* from Villa del Carbón, Mexico using the LSU rDNA. *Investigación Universitaria Multidisciplinaria*. 12: 86-94.

WHITE, T. J., BRUNS, T., LEE, S., & TAYLOR, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A guide to Methods and Applications*. 38: 315-322.

MOSCAS DE LA FAMILIA SARCOPHAGIDAE EN EL MUNICIPIO DE TORREÓN, COAHUILA

Taurino Velasco Hernández¹ y Fabián García Espinoza²

RESUMEN

Es de suma importancia estudiar tanto la taxonomía como la biología de los sarcófagidos ya que en esta familia de dípteros se encuentran especies que son de las principales colonizadoras de cadáveres además de que pueden presentar diversos hábitos, se pretende coleccionar los especímenes mediante uso de trampas cebadas tipo wot redes entomológicas y trampas de vacío o aspirador, los especímenes montados en alfileres entomológicos se usaran para la identificación a nivel género en el laboratorio de parasitología de la UAAAN UL así mismo estos especímenes una vez identificados se hará una descripción de su morfología externa tomando en cuenta las características principales para cada una de las regiones corporales cabeza tórax y abdomen.

Palabras Clave: Sarcófagidos, Moscas, Comarca Lagunera, Taxonomía, Familias.

ABSTRACT

It is of utmost importance to study both the taxonomy and the biology of the sarcophagidae, since in this family of dipterans there are species that are the main colonizers of corpses, besides that they can present different habits, it is tried to collect the specimens through the use of trapped traps type wot entomological networks and vacuum traps or vacuum cleaner, the specimens mounted on entomological pins will be used for the identification at the level of the laboratory in the parasitology of the UAAAN UL as well these specimens once identified will be made a description of their external morphology taking into account the main features for each of the body regions head thorax and abdomen.

Key words: Sarcophagidae, Flies, Lagoon region, Laxonomy, Families.

INTRODUCCIÓN

Los dípteros conforman uno de los más grandes órdenes de insectos, con más de 86,000 especies descritas, las cuales son comúnmente conocidas como moscas. Más de 16,000 de estas especies ocurren en Norteamérica. Aunque existen grandes diferencias entre los dípteros, ellos se caracterizan por poseer un sólo par de alas usadas para volar y un segundo par de alas muy reducidas, con forma de un pequeño mazo llamadas hálteres, las cuales son utilizadas para estabilizar el vuelo (Byrd y Castner, 2010).

Las moscas son carroñeras importantes, alimentándose y por lo tanto reciclando material vegetal y animal en descomposición. Algunas son depredadoras y parásitos de otros insectos (Byrd y Castner, 2010).

Los dípteros se encuentran dentro de los principales grupos de insectos que colonizan los cuerpos en descomposición y han sido definidos por muchos investigadores como los primeros en llegar, inclusive, pocos minutos después de haber ocurrido la muerte (Liria, 2006; Yousseff, 2007).

La importancia de los dípteros en estudios de entomología forense radica en que las especies de este orden son las primeras en llegar a colonizar la materia en descomposición (Valdés, 2009) o como puntualiza Salazar-Ortega (2008), que existen especies que se presentan a los pocos minutos del deceso o incluso durante la agonía. Los califóridos pueden ser encontrados prácticamente en cualquier lugar y muchas especies son de considerable importancia económica. Por lo general son de colores metálicos. La mayoría de las especies de esta familia son carroñeras, las larvas viven en carroña, excremento y otros materiales similares (Triplehorn y Johnson, 2005).

En la Comarca Lagunera se han enlistado alrededor de 13 géneros y una probable especie de la familia Sarcophagidae, entre los cuales están: Euboeettheria, Neobellieria, Paraphrissopoda, Tytanogrypa, Aracnidomyia, Comasarcophaga, Boettcheria, Kellymyia, Bellieria, Bercaea, Liopygia, Oxisarcodexia, Eumacronychia y Archimimus camatus Reinhard (García, 2011; García-Espinoza et al., 2011; Valdés et al., 2010).

Entre los insectos, las moscas representan un grupo de particular interés por la gran capacidad y eficiencia biológica para adaptarse a diversos ecosistemas, además de presentar una amplia distribución geográfica y capacidad reproductiva. Entre las familias de dípteros que se asocian al proceso de descomposición de carroña se encuentran: los califóridos (Calliphoridae), sarcófagidos o moscas de la carne (Sarcophagidae), los múscidos (Muscidae), los fánidos (Fanniidae) y los fóridos (Phoridae) (Gautreau, 2007; Gennard, 2007).

Las moscas de la familia Sarcophagidae son casi cosmopolita con más de 2,000 especies descritas en alrededor de 400 géneros; aproximadamente 327 especies están consignadas para Estados Unidos y Canadá. Representantes de esta familia son encontrados alrededor del mundo, con la mayoría de especies en regiones tropicales o de clima templado (Shewell, 1987; Byrd y Castner, 2010).

Las hembras de Sarcophagidae no ovipositan sino que son larvíparas, y por lo tanto las masas de huevos encontrados en restos humanos no pueden ser atribuidas a éstas. El periodo de tiempo necesario para el desarrollo del huevo debe también ser eliminado cuando se calcula un IPM basado en datos e indicios de sarcófagidos (Shewell, 1987; De Arriba y Costamagna, 2006; Byrd y Castner, 2010).

La sistemática de la familia Sarcophagidae es debatida y poco clara. Algunos especialistas que objetan el empleo de estructuras no comunes a ambos sexos y siguen la nomenclatura tradicional, distinguen sólo dos géneros: Sarcophaga y Wohlfahrtia. Otros, separan a Sarcophaga en varios géneros diferentes reconociendo alrededor de 400, los cuales resultan imposibles de identificar únicamente con el estudio de las hembras. Los órganos sexuales del macho en la

mayoría de los casos, presentan la prueba final de la relación entre las especies y entre los géneros (De Arriba y Costamagna, 2006).

MÉTODOS Y MATERIALES

El estudio se llevará a cabo en la Comarca Lagunera, conformada por municipios de los estados de Coahuila y Durango. La Comarca Lagunera se sitúa en un área biogeográfica conocida como Desierto Chihuahuense, presentando una elevación promedio de 1120 msnm. El clima que predomina en esta zona es semiárido, con lluvias muy escasas durante el verano, llegándose a registrar en promedio precipitaciones anuales de 250 mm.

La Comarca Lagunera o La Laguna, como también es conocida, está conformada por 15 municipios, 5 del Estado de Coahuila (Torreón, Matamoros, San Pedro de las Colonias, Francisco I. Madero y Viesca) y 10 del Estado de Durango (Gómez Palacio, Lerdo, Tlahualilo de Zaragoza, Mapimí, San Pedro del Gallo, San Luis del Cordero, Rodeo, Nazas, General Simón Bolívar y San Juan de Guadalupe). Para el año 2017, se propone trabajar en los municipios de Torreón, Matamoros y Viesca en Coahuila y Gomez Palacio y Lerdo en Durango.

Las colectas se llevaron a cabo en dos localidades del municipio de Torreón.

Para coleccionar adultos se utilizarán trampas “West Australian” (tipo WOT) modificadas según Cole (1996), éstas trampas son útiles en la captura de moscas adultas. Las trampas se cebarán con una mezcla de estiércol bovino, carne de pescado, carne de res y agua, a razón de 150 gramos de cada ingrediente (Becerril, 2013; Chirino, 2013; García 2013).

Tres trampas serán colocadas en cada sitio de muestreo. Las trampas serán colocadas en el sitio de colecta y serán recogidas en la tarde del segundo día o a más tardar en la mañana del tercer día, se revisarán y se recogerán las moscas colectadas.

También se usarán redes entomológicas (ligeras y de golpeo) para coleccionar moscas en un radio de 20 metros alrededor del sitio donde se colocarán las trampas. Con las redes entomológicas se coleccionarán tanto en el día de la colocación de las trampas WOT, como el día de retirar las mismas.

Los especímenes coleccionados se colocarán en frascos con etanol al 100% con su respectiva etiqueta y serán transportados al Laboratorio del Departamento de Parasitología de la UAAAN UL.

Etapas de estudio

Las colectas se harán en dos etapas, debido a que la diversidad y abundancia de éstos dípteros tratando de abarcar así las cuatro estaciones del año para tener registro de los sarcófagos que ocurren en cada una de ellas. Las colectas de primavera y verano, abarcarán preferentemente los meses de marzo a julio, mientras que las colectas de otoño e invierno se harán durante los meses de septiembre a enero.

Preservación y montaje

Se harán anotaciones durante cada colecta sobre el sitio de estudio en particular, esto con la finalidad de registrar el hábitat de los especímenes coleccionados.

Una parte de los especímenes coleccionados serán montados con alfileres entomológicos, cada uno con su respectiva etiqueta y colocados en cajas para colecciones entomológicas y se registrarán en la base de datos de insectos de importancia forense de la Comarca Lagunera.

Identificación de géneros y/o especies

La otra parte de especímenes que no fue montada será conservada en etanol al 100% para su posterior envío y corroboración de los expertos en este taxón.

Los especímenes montados en alfileres entomológicos se usarán para la identificación a nivel género en el laboratorio de Parasitología de la UAAAN UL, así mismo, estos especímenes una vez identificados, se hará una descripción de su morfología externa, tomando en cuenta las características principales para cada una de las regiones corporales (cabeza, tórax y abdomen).

Se describirán a los especímenes tomando en cuenta características cualitativas (como coloración, microtomentosidad, tipo de hábitos y hábitat, entre otros) y datos cuantitativas (longitud del cuerpo y sus partes, tamaño del cuerpo, número de setas/pelos, entre otros).

Revisión de colecciones

Se revisarán las colecciones entomológicas que contienen dípteros de interés forense, y en especial sarcófagos para referencias y comparaciones de los géneros y especies coleccionados.

Se pretende revisar la colección entomológica existente en el Colegio de Posgraduados, la colección de insectos de interés forense del Departamento de Parasitología de la UAAAN Saltillo, la colección de insectos de interés forense depositada en el INECOL, A.C. y la colección de dípteros de interés forense del Departamento de Parasitología de la UAAAN UL.

Manejo y uso de datos

Con los datos que se obtengan y las descripciones de los géneros y/o especies, se presentará una clave taxonómica específica para Sarcophagidae de la Comarca Lagunera. Además se obtendrá como resultado también un listado de géneros de sarcófagos de la Comarca Lagunera (parte del Desierto Chihuahuense).

RESULTADOS Y DISCUSION

Se revisó la colección entomológica en el Departamento de Parasitología de la UAAAN UL, de igual manera se fueron acomodando por órdenes para así llevar los registros ordenados los insectos que estaban deteriorados se quitaban de la colección ya que no tenía caso conservarlos.

Se realizaron colectas en dos localidades del municipio de Torreón.

Se identificaron 13 géneros de moscas.

Dentro de los sarcófagos presentes en la Comarca Lagunera, la subfamilia Sarcophaginae es la más abundante. Esta subfamilia contiene las moscas más grandes dentro de la familia Sarcophagidae, raramente pequeñas (Pape, 1987); es la subfamilia más grande de las tres subfamilias acá mencionadas, ésta comprende 2200 especies dentro de 51 géneros (Pape et al., 2011).

De todos los géneros reportados por Shewell (1987) para la región neártica, en la Comarca Lagunera han sido consignados alrededor de 13 géneros de sarcófagos (García-Espinoza y ValdésPerezgasga, 2012). De esos 13 géneros acá se revisan cuatro de ellos, a saber, Euboeotheria, Kellymyia, Liopygia y Neobellieria.

El cuadro 3 enlista las subfamilias y géneros de sarcófagos recolectados en Torreón, Coahuila, mismo que incluye los especímenes obtenidos a partir de larvas LIII coleccionadas en restos humanos durante el año 2008.

Tabla 1. Lista de géneros recolectados durante cuatro años en distintas épocas del año en la Comarca Lagunera

Subfamilia	Genero	Cebo (origen de colecta)	Estadio colectado
Sarcophaginae	<i>Neobellieria</i>	Se colectaron en todas las etapas y cebos mencionados	LIII, Prepupa, Adulto
	<i>Paraphrissipoda</i>		LIII, Prepupa, Adulto
	<i>Tytanogrypa</i>	Febrero/2007 Juni y julio 2009	LIII, Prepupa
	<i>Aracnidomyia</i>		LIII, Prepupa
	<i>Comasarcophaga</i>		LIII, Prepupa
	<i>Boettcheria</i>		LIII, Prepupa
	<i>Kellymyia</i>		LIII, Prepupa
	<i>Bellieria</i>	Restos humanos	LIII, Prepupa
	<i>Bercaea</i>	Restos humanos	LIII, Prepupa
	<i>Liopygia</i>	Febrero/2007 y en restos humanos	LIII, Prepupa
	<i>Oxisarcodexia</i>	Restos humanos	LIII, Prepupa
	<i>Oxisarcodexia</i>	Restos humanos	Adulto
	<i>Reinhard</i>		
	<i>Eumacronychia</i>	Febrero/2007	Adulto
Miltogramminae			

Liopygia. Es la tercera en cuanto a cantidad de especímenes de los cuatro géneros seleccionados. Es un poco más grande que *Neobellieria*, de cuerpo más delgado y alargado que los dos géneros anteriores, *Liopygia* se distingue fácilmente de los otros géneros presentes en la región por los pelos blancos abundantes en la gena (anterior y posterior). Le hembra tiene el terguito 6 doblado en medio, puede verse un ángulo en la parte superior incluso en el terguito 5 (tanto del macho como de la hembra). El esternito 7 se encuentra cubierto pos el terguito 6 doblado y los abundantes pelos que éste presenta.

Neobellieria. Es una mosca grande, casi del mismo tamaño que *Euboeettcheria*, sin embargo, ésta es un poco más amplia en el tórax y abdomen. Ocupa el segundo lugar en cantidad de especímenes en la colección. Puede distinguirse la hembra del macho ya sea por las setas escutelares apicales que presenta el macho o por la forma del cuerpo, el macho es de cuerpo más adelgazado que la hembra. La terminalia de la hembra es muy distintiva, el terguito 6 se encuentra dividido en medio por una membrana, un dobléz muy pronunciado. El esternito 7 se encuentra casi oculto.

Liopygia. Es la tercera en cuanto a cantidad de especímenes de los cuatro géneros seleccionados. Es un poco más grande que *Neobellieria*, de cuerpo más delgado y alargado que los dos géneros anteriores, *Liopygia* se distingue fácilmente de los otros géneros presentes en la región por los pelos blancos abundantes en la gena (anterior y posterior). Le hembra tiene el terguito 6 doblado en medio, puede verse un ángulo en la parte superior incluso en el terguito 5 (tanto del macho como de la hembra). El esternito 7 se encuentra cubierto pos el terguito 6 doblado y los abundantes pelos que éste presenta.

Kellymyia. Finalmente en el género *Kellymyia* se encuentran las moscas más pequeñas que los tres géneros anteriores. Los especímenes son de apariencia más grisáceas que los otros de apariencia negruzca. Machos y hembras son de tamaño similar. Le hembra puede ser separada fácilmente por la forma que tiene su terminalia, presenta dos hendiduras, una a cada lado del terguito 6, dándole éstas una apariencia de “carita feliz” ya que las hendiduras parecen ojos y el sinterogosternito 6+7 toma forma una curva o “sonrisa”.

CONCLUSIONES

Se trabajó en el Departamento de Parasitología de la UAAAN UL, en el acomodo de los insectos para una mejor facilidad su búsqueda de cada uno de ellos o por familias. Se realizaron colectas en dos localidades del municipio de Torreón. Se identificaron 13 géneros de moscas.

BIBLIOGRAFIA

- García-Espinoza F. y M.T. Valdés-Perezgasga. 2012. Listados de los géneros de la familia Sarcophagidae (Diptera) asociados a carroña en Torreón Coahuila. *Entomología Mexicana*. 2:897-901.
- Pape, T. 1996. Catalogue of the Sarcophagidae of the world (Insecta: Diptera). *Memoirs on Entomology, International* 8:1-558.
- Pérez, R. M. 2010. Cuantificación y biotipos de géneros de la familia Sarcophagidae. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro – Unidad Laguna. 61 pp.
- Rognes, K. 1986. The Sarcophagidae (Diptera) of Norway. *Fauna Norvegica Ser. B. Norwegian Journal of Entomology* 33(1):1-26.
- Salazar-Ortega, J. 2008. Estudio de la entomofauna sucesional asociada a la descomposición de un cadáver de cerdo doméstico (*Sus scrofa*) en condiciones de campo. *Revista de la Facultad de Ciencias* 13(1):21-32.
- Shewell, G. E. 1987. Sarcophagidae. En: J. F. McAlpine (Ed.). *Manual of Nearctic Diptera*. Ottawa, Ontario, CA, Biosystematics Research Center, Research Branch Agriculture Canada 2:1159-1186.
- Szpila, K. y Pape, T. 2005. The first instar larva of *Apodaca pulchra* (Diptera: Sarcophagidae, Miltogramminae). *Insect Systematics and Evolution* 36:293-300.
- Aldrich, J. M. 1916. *Sarcophaga and allies in North America*. Vol. I. Thomás Say Foundation, Ent. Soc. Am. La Fayette, Indiana. 301 pp.
- Byrd, H. J., y J. L. Castner. 2010. Insects of forensic importance. En: Byrd y Castner (Eds.). *Forensic Entomology. The Utility of Arthropods in Legal Investigations*. Second edition. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. 681 pp.
- De Arriba, A. V. y. S. R. Costamagna. 2006. Desarrollo post-embrionario de *Microcerella acrydiorum* (Diptera: Sarcophagidae) bajo condiciones de laboratorio. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina* 65(1-2):55-61.
- Downes, W. L. Jr. 1955. Notes on the morphology and classification of the Sarcophagidae and other calyptates (Diptera). *Proc. Iowa Acad. Sci.* 62:514-538.
- García, E. F. 2008. Identificación y abundancia estacional de géneros de la familia Sarcophagidae sobre carroña de cerdo en un área semidesértica de Coahuila. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro – Unidad Laguna. Torreón, Coahuila. 47 pp.

- Becerril, O. E. 2013. Dípteros (Insecta: Diptera) saprófagos y coprófagos de Matamoros, Coahuila. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro – Unidad Laguna. Torreón, Coahuila. 78 pp.
- Byrd, H. J., y J. L. Castner. 2010. Insects of forensic importance. En: Byrd y Castner (Eds.). Forensic Entomology. The Utility of Arthropods in Legal Investigations. Second edition. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. 681 pp.
- Chirino, L. A. C. 2013. Dípteros (Insecta: Diptera) saprófagos y coprófagos de Torreón, Coahuila. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro – Unidad Laguna. Torreón, Coahuila. 70 pp.
- De Arriba, A. V. y. S. R. Costamagna. 2006. Desarrollo post-embionario de *Microcerella acrydiorum* (Diptera: Sarcophagidae) bajo condiciones de laboratorio. Revista de la Sociedad Entomológica Argentina 65(1-2):55-61.
- García, E. F. 2008. Identificación y abundancia estacional de géneros de la familia Sarcophagidae sobre carroña de cerdo en un área semidesértica de Coahuila. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro – Unidad Laguna. Torreón, Coahuila. 47 pp.
- García, E. F. 2011. Estudio del desarrollo y ciclo vital de califóridos y biotipificación de géneros de sarcófagidos de Torreón, Coahuila. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro – Unidad Laguna. 143 pp.
- García-Espinoza, F., M. T. Valdés-Perezgasga y M. Pérez-Ramírez. 2011. Géneros de sarcófagidos (Diptera: Sarcophagidae) carroñeros colectados en Torreón, Coahuila. Memorias del I Congreso Regional de Diversidad Biológica de la Comarca Lagunera, Gómez Palacio, Durango.
- García-Espinoza F. y M.T. Valdés-Perezgasga. 2012. Listados de los géneros de la familia Sarcophagidae (Diptera) asociados a carroña en Torreón Coahuila. Entomología Mexicana 2:897-901.

ACTIVIDAD CEREBRAL EN EL ESTABLECIMIENTO DE PREFERENCIA DE ALIMENTO POR INTERACCIÓN SOCIAL EN RATONES

Angela Elena De Luna Marmolejo y Raúl Gerardo Paredes Guerrero

RESUMEN

En los ratones, la elección de comida se ve influenciada por la transmisión social de información de un alimento. El aprendizaje adquirido en STFP genera cambios plásticos en diferentes estructuras cerebrales, demostrados a través de técnicas histológicas, teniendo como limitación la realización de estudios longitudinales rigurosos. Una de las técnicas más recientes para la localización de la actividad cerebral, es la imagenología por resonancia magnética con manganeso como medio de contraste (MEMRI por sus siglas en inglés), que permite el análisis de cambios estructurales y funcionales cerebrales sin ser invasivo. Se emplearon ratones C57 hembra ovariectomizadas de edad de 3 meses, como observadores (OBS) y ratones CD1 hembra ovariectomizadas de 3-4 meses de edad, como demostradores (DEM). Se administró $MnCl_2$ (intraperitoneal OBS), 24 horas previas a la evaluación de aprendizaje, que consistió en la interacción de un DEM, que previamente consumió un alimento, con un OBS, seguido por la adquisición de imágenes (MEMRI); dos semanas después se evaluó la memoria mediante exposición y 24hrs después se realizó una prueba de preferencia de alimento.

INTRODUCCIÓN

La transmisión de información es un mecanismo utilizado por diversos organismos con la finalidad de favorecer la supervivencia y adaptación al medio. La transmisión social de preferencia de alimento (STFP, por sus siglas en inglés) permite a los sujetos de una especie aprender a través de sus congéneres los alimentos que son benéficos y cuales pueden implicar daños. La transmisión social de preferencia de los alimentos se ha estudiado en modelos humanos como animales, siendo los ratones uno de los más utilizados; cuando los ratones se enfrentan con diferentes opciones de comida, la preferencia que muestran hacia un determinado alimento se ve influenciada por la información adquirida de un conspecífico que previamente haya consumido ese alimento (Galef y Wigmore, 1983), este modelo se describe con el ratón observador que adquiere las referencias del alimento vía olfatoria, del conspecífico (demostrador).

El aprendizaje en STFP genera cambios plásticos en diferentes estructuras cerebrales, lo cual ha sido demostrado a través de técnicas de inmunohistoquímica. Uno de los marcadores utilizados en esta prueba es *c-fos*, siendo este un gen de expresión temprana, el cual se manifiesta después de una experiencia o estimulación (Countryman, Kaban y Colombo, 2005). Se encontró que existe un aumento de *c-fos* en el hipocampo ventral y dorsal al exponer a los roedores en STFP, (Countryman, Orłowski, Brightwell, Oskowitz, y Colombo, 2005) debido a que en la STFP, el hipocampo juega un papel importante para la generación de memoria a largo plazo (Chuangz, Lee y Silva, 2009). Sin embargo una de las limitaciones de los estudios histológicos es el impedimento para realizar estudios longitudinales, pues se requiere el sacrificio de sujeto experimental para el posterior análisis del tejido de interés (Countryman et al 2005). En tanto que la imagenología por resonancia magnética (MRI, por sus siglas en inglés) permite el análisis de cambios estructurales y funcionales sin ser invasivo. Tanto la inmunohistoquímica como MRI han demostrado ser técnicas equiparables para investigar la activación neuronal (Moirta, Ogino, Seo, et al. 2002).

El estudio con MRI utiliza manganeso (Mn^{2+}) como medio de contraste (MEMRI por sus siglas en inglés) lo cual permite localizar las áreas y vías cerebrales activadas mediante un estímulo (Galef et al 1983; Cacace et al 2014). El manganeso es un análogo del calcio (Ca) el cual entra a las neuronas activas, mediante canales de calcio dependientes de voltaje (Lin, y Koretsky, A. 1997); además el manganeso es un agente paramagnético, similar a la hemoglobina (McRobbie, Moore, Graves y Prince, 2016) que al acumularse produce una alteración en el campo magnético local, acortando los tiempos de relajación longitudinal (T_1) y produciendo una mejora en el contraste de las imágenes ponderadas a T_1 (Chuang et al. 2009). El Mn^{2+} permanece en neuronas de 2-3 meses (Moirta et al 2002; Brunnquella, et al 2016), teniendo un pico máximo de concentración a las 24 horas, con vía de administración sistémica (Brunnquella et al. (2016)

El presente estudio tiene como objetivo identificar las áreas cerebrales activadas por la interacción de los demostradores hacia los observadores durante la STFP, en los procesos de aprendizaje y memoria.

MÉTODOS

Animales

Se utilizaron 30 ratones criados en condiciones de bioterio; temperatura ($21^{\circ}\pm 1$), humedad al 50%, ciclo de luz-oscuridad 12:12 (luces son encendidas a 8 am), aire acondicionado, agua y alimento *ad libitum* (LabDiet 5001 rodent diet)

Se emplearon 13 ratones hembra ovariectomizadas C57 de edad de 3 meses, como observadores (OBS) y 13 ratones hembra ovariectomizadas CD1 de 20 a 21 gramos, como demostradores (DEM).

Al inicio del experimento cada observador fue emparejado con un demostrador elegido aleatoriamente. Durante el experimento, las parejas de observadores- demostradores fueron puestas en cajas, durante tres días, como periodo de adaptación, con acceso libre a agua y alimento (LabDiet 5001)

Administración de Mn^{2+}

La administración de Mn fue realizada en los ratones observadores, 24 horas previas a la adquisición de imágenes mediante resonancia magnética. Se realizará administración vía intraperitoneal de 8nM/kg (8nM/kg/10ml) de cloruro de manganeso ($MnCl_2$) (Manganese (II) chloride SIGMA-ALDRICH, Núm. De producto 244589, St. Louis) preparado en solución fisiológica.

Procedimiento

Aprendizaje: comenzó con la separación de las parejas, cada ratón fue colocado en cajas diferentes, tanto observador como demostrador se expusieron a un periodo de ayuno de 12 horas. Posterior a esto, se crearon 4 grupos (n= 3-4 ratones/grupo); (1) ratones control, (2) ratones que no se expusieron a ningún alimento (NF), (3) ratones expuestas a cocoa al 2% (Hershey's cocoa) (4) ratones alimentadas con canela al 1% (McCORMICK canela molida) Dependiendo el grupo, al DEM se le permitió comer durante una hora con alimento LabDiet 5001 pulverizado combinado con cocoa al 2% o canela al 1% o NF. A lo subsecuente se colocó al OBS y DEM en una caja durante 15 min, se grabó con cámara (Sony) la interacción entre las parejas, al término del lapso de tiempo el OBS fue inmediatamente introducido al resonador. Al finalizar la resonancia se colocó en las ratones un arete con numeración, para la identificación de las ratones en los siguientes experimentos. Los ratones OBS fueron colocados en una sola caja.

Memoria se realizó dos semanas posteriores a la prueba de aprendizaje. Se colocó individualmente a los sujetos OBS usados en el anterior experimento en una caja con un recipiente que contenían el alimento previamente consumido por su demostrador dos semanas atrás (LabDiet 5001 combinado con cocoa al 2% o canela al 1% o NF).

Preferencia: se evaluó 24 horas posteriores a la valoración de memoria. Se colocó a los sujetos OBS usados en el anterior experimento en una caja con dos recipientes que contenían alimento LabDiet 5001 combinado con cocoa al 2% y otro con canela al 1%, el pesaje de los recipientes se realizó antes y después a la 1, 2, 3, 4, a 6 hora de la interacción del animal, para conocer que alimento fue el más consumido.

Adquisición de imágenes: Resonador y anestesia

Una vez concluida la actividad, se llevó a los sujetos al Laboratorio Nacional de Imagenología por Resonancia Magnética (LANIREM), al resonador para especies pequeñas de 7T (BioScan Bruker® PharmaScan). Los sujetos fueron anestesiados en una cámara de inducción usando isoflurano (Sofloran® Vet) al 4%, una vez sedados, se montó al ratón en la plataforma del resonador y se mantiene la anestesia (1.5-2%); se registra la frecuencia respiratoria (normal 90-110) respiraciones por minuto; se monitorea la temperatura del animal vía rectal; manteniéndose una de temperatura 37°.

Se utilizó una bobina que brinda mayor homogeneidad a la señal. Se utilizarán dos secuencias pesadas a T1 (T1-3DFLASH, 24min y T1-MDEFT, 24min), de las cuales se utilizará la secuencia que sea más sensible a los cambios en la intensidad de señal causada por el cloruro de manganeso.

RESULTADOS

Aprendizaje

En alimento consumido por los DEM, de acuerdo al grupo experimental, se observó que en el grupo de COCO el consumo de los ratones fue mayor a .6 g exceptuando el número 26, mientras que el grupo CIN tuvo un consumo por debajo de los .6 g en tres de los ejemplares. (Figura 1 y 2)

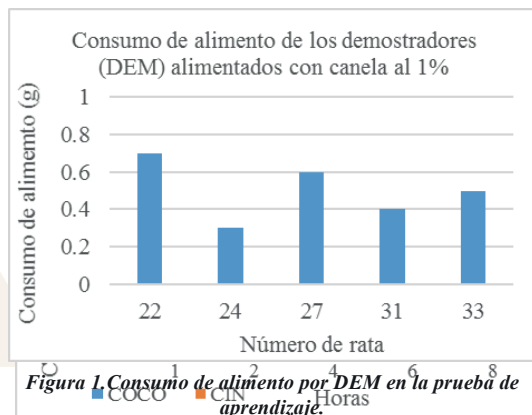


Figura 3. Promedio del consumo de alimento en las ratones del grupo sin alimento, en la prueba de preferencia.

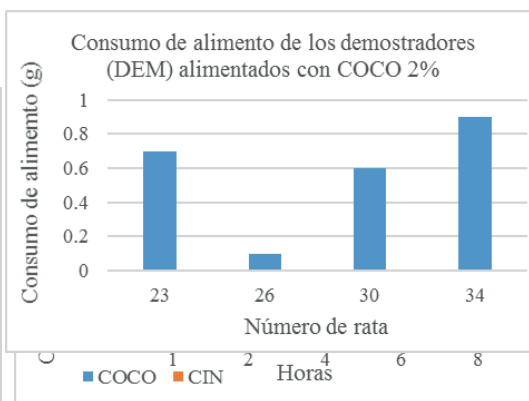


Figura 4. Promedio del consumo de alimento en las ratones del grupo con exposición a canela al 1%, en la prueba de preferencia.

Preferencia:

Los sujetos observadores que no fueron expuestos a la transmisión de información de ningún tipo de alimento por sus demostradores, mostraron una preferencia por la canela, dicho consumo se observó a partir del segundo pesaje hasta el último, dado que en el primer intervalo de tiempo el consumo para la canela y la cocoa fue el mismo (Figura 3).

Se observó que los ratones expuestos a canela al 1%, mostraron una preferencia hacia este alimento (Figura 4), este comportamiento se observó desde el primer pesaje, exceptuando el de las 4 horas, siendo el único en que los ratones mostraron una predilección por la cocoa.

Los ratones OBS expuestos a cocoa al 2% por sus demostradores, mostraron una ligera preferencia por la cocoa (Figura 6), variando el consumo entre la cocoa y canela en el transcurso del lapso de tiempo (figura 5)

Tanto en el grupo de los ratones expuestos a canela como las que no fueron expuestas a ningún alimento por sus DEM mostraron una preferencia notoria por el consumo de este alimento (figura 6)

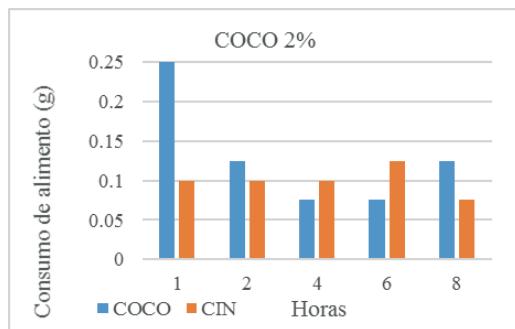


Figura 5. Promedio del consumo de alimento en las ratones del grupo con exposición a cocoa al 2%, en la prueba de preferencia.

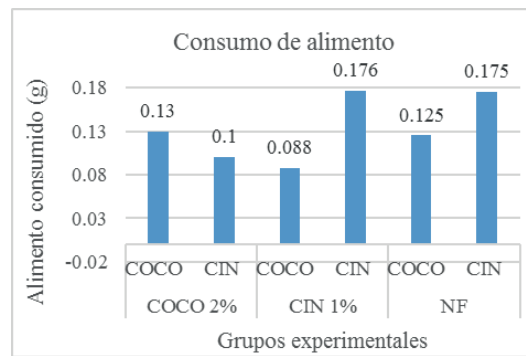


Figura 6. Media de consumo del alimento, por los tres grupos experimentales en la prueba de preferencia.

Análisis de imágenes:

Debido al tiempo que implica el análisis de las imágenes de resonancia magnética con manganeso como medio de contraste, no se presentan datos relacionados a la activación cerebral en los sujetos de cada grupo. Solo se muestran datos preliminares de las imágenes obtenidas.

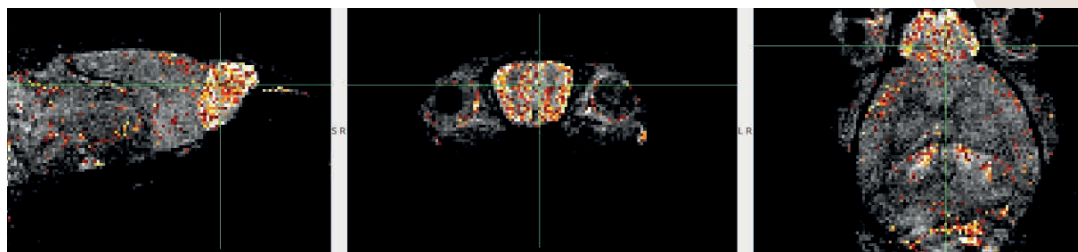


Figura 7. Imágenes de sujeto experimental en corte sagital, coronal y axial. Son resultados parciales de pre procesamiento de los escaneos, donde los píxeles marcan la intensidad de señal en una escala de colores (Rojo oscuro, 0.5; amarillo claro 2.5), donde se puede observar una clara hiperintensidad en las áreas del bulbo olfatorio. Es necesario continuar con el análisis para obtener datos comparativos entre grupos.

DISCUSION

La preferencia de alimento por los OBS obtenida de la información transmitida por los DEM, mostro una tendencia al consumo del alimento conocido por el conspecifico, teniendo una relación con el consumo del DEM en la prueba de aprendizaje. Sin embargo esto no se observó en el grupo experimental de OBS con DEM sin comida (NF), dado a que los sujetos consumieron más canela que cocoa, con excepción del primer pesaje en donde el consumo por ambos alimentos fue el mismo.

CONCLUSIONES

La transferencia social de preferencia alimento nos permite conocer los mecanismos neurales que subyacen el establecimiento del aprendizaje transmitido de sujeto a sujeto, pudiendo identificar los estímulos sensoriales (olfativos, principalmente) que tienen influencia en el observador. El utilizar la IRM nos permite explorar nuevas áreas y tener una aproximación a estudios de conectividad que brinden nueva información sobre la jerarquía e importancia que tiene cada una de las estructuras involucradas en esta conducta.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Brunnquella, C., Hernandez, R., Graves, S., Smit-Oistad, I., Nicklesa, R., Cai, W., Meyeranda, M. y Suzukib, M. (2016) "Uptake and retention of manganese contrast agents for PET and MRI in the rodent brain. Contrast media and molecular imaging". *Contras Media y Molecular Imaging* Núm. 10, Vol. XV, [pp. 15-20].
- (2) Cacace, A., Brozoski, T., Berkowitz, B., Bauer, C., Odintsov, B., Bergkvistf, M., Castracane, J., Zhang, J. y Holt, A. (2014). Manganese enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI): A powerful new imaging method to study tinnitus. *Hearing Research* Núm. 311, Vol. VI, [pp. 49-62].
- (3) Chuang, K., Lee, J., Silva A., Belluscio, L. y Koretsky (2009) Manganese enhanced MRI reveals functional circuitry in response to odorant stimuli. *NeuroImage*, Núm. 44, Vol. X, [pp. 363-372].
- (4) Countryman, R., Kaban, N. y Colombo, P. (2005) Hippocampal c-fos is necessary for long-term memory of a socially transmitted food preference. *Neurobiology of Learning and Memory*, Núm. 84, Vol. XII, [pp. 175-183].
- (5) Countryman, R., Orlowski, J., Brightwell, J., Oskowitz, A. y Colombo, P. (2005) CREB Phosphorylation and c-Fos Expression in the Hippocampus of Rats During Acquisition and Recall of a Socially Transmitted Food Preference. *Hippocampus*, Núm. 15, Vol. II, [pp. 56 - 67].
- (6) Galef, B. y Wigmore, S. (1983) Transfer of information concerning distant foods: a laboratory investigation of the 'information-centre' hypothesis. *Physiology & Behavior*, Núm 42, Vol. V [pp. 11-124].

- 
- (7) Lin, Y. y Koretsky, A. (1997) Manganese Ion Enhances T1-Weighted MRI during Brain Activation: An Approach to Direct Imaging of Brain Function. *ISNMR Young Investigators Rabi Award Papers*, Núm. 17, Vol. XX, [pp. 102-155].
 - (8) McRobbie, D., Moore, E., Graves, M. y Prince M. (2016) MRI from Picture to Proton. Cambridge editorial.
 - (9) Moirta, H., Ogino, T., Seo, Y, et al. (2002) Detection of hypothalamic activation by manganese ion contrasted T1-weighted magnetic resonance imaging in rats. *Neuroscience Letters*, Núm. 326, Vol. XVI [pp. 101–104].

EXPRESIÓN DE UNA MUTANTE DE LA ENZIMA TRANS-SIALIDASA DE *Trypanosoma cruzi* (TcTS) PARA LA GENERACIÓN DE ANTICUERPOS PROTECTORES CONTRA LA TRIPANOSOMIASIS

Darío de Jesús Dávila Pasillas¹, Arianna Núñez Beltrán² y Juana Elizabeth Reyes Martínez^{2*}

1. Departamento de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Av. Universidad # 940, Ciudad Universitaria, 20131 Aguascalientes, Ags.

2. Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato, Noria Alta S/N, Guanajuato, Gto. C.P. 36050.

RESUMEN

La enfermedad de Chagas, es una enfermedad parasitaria causada por *Trypanosoma cruzi*. El ácido siálico tiene un rol crucial durante el ciclo de vida y supervivencia en el hospedero. Sin embargo, *T. cruzi* es incapaz de sintetizar *de novo* este azúcar. El ácido siálico es obtenido de los glicoconjugados del hospedero mediante una enzima denominada trans-sialidasa (TcTS). Ya que el humano carece de proteínas similares a ésta, la TcTS es un blanco potencial para el diseño fármacos y vacunas. En este proyecto de investigación se identificó una mutante inactiva de ésta enzima con la finalidad de ser postulada para el desarrollo de métodos de diagnóstico o nuevas terapias contra la tripanosomiasis. Además, se estandarizó un método colorimétrico con el cual se logró determinar la actividad de la enzima nativa y las enzimas mutantes.

Palabras clave: trans-sialidasa, ácido siálico, proteína recombinante.

ABSTRACT

Chagas disease is a parasitic disease caused by *Trypanosoma cruzi*. Sialic acid plays a crucial role during their life cycle and survival in the host. However, *T. cruzi* is unable to synthesize this sugar *de novo*. Sialic acid is obtained from the host by the action of an enzyme called trans-sialidase (TcTS). Since the human lacks proteins similar to this, it makes this enzyme a potential target for drugs and vaccines design. In this research project an inactive mutant of this enzyme was identified in order to be postulated to develop diagnostic tools and new therapies against trypanosomiasis. Also, a colorimetric method was established and was used to easily determine the activity of the native enzyme and mutants.

Key words: trans-sialidase, sialic acid, recombinant protein.

Introducción

Trypanosoma cruzi es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana. Este parásito flagelado es transmitido por el insecto *Triatoma infestans*. La tripanosomiasis es una enfermedad endémica en gran parte de América central, América del Sur y México. Un total 5.5 millones de personas se encuentran en riesgo y mundialmente se diagnostican aproximadamente 40,000 casos nuevos cada año (Carabarin-Lima, *et al.*, 2013).

Trypanosoma cruzi infecta las células del hospedero ocasionando su muerte, provocando daños irreversibles en corazón, aparato digestivo, y sistema nervioso periférico. En la fase aguda de la enfermedad se genera un proceso inflamatorio agudo, destrucción de células musculares y de células nerviosas (Cabello, 2007).

La actividad de una enzima denominada trans-sialidasa de *Trypanosoma cruzi* (TcTS) se describió por primera vez en 1992 por Schenkman y cols. en donde se determinó que tiene un rol crucial en el proceso infeccioso, la evasión del sistema inmune y el establecimiento de una infección persistente en células de mamíferos (Schenkman *et al.*, 1991, Buscaglia *et al.*, 2006). *T. cruzi* es incapaz de sintetizar ácido siálico *de novo* por lo que éste es obtenido de los glicoconjugados del hospedero, mediante la enzima trans-sialidasa (TcTS) (Schenkman, 1993). Cuando *T. cruzi* emerge de las células del hospedero, contiene muy poco o nada de ácido siálico en su superficie. Sin embargo, rápidamente después de entrar en circulación, expresa en su membrana la TcTS la cual se encarga de recubrir la superficie del parásito con ácido siálico. Este mecanismo le permite al parásito evadir la respuesta inmune y también a escapar hacia el citoplasma, donde se replica. (Schenkman, *et al.*, 1991, Rubin-de-Celis, *et al.*, 2006).

Actualmente hay tratamientos para combatir la enfermedad de Chagas, sin embargo son altamente tóxicos y poco eficientes sobretodo en pacientes con la enfermedad en fase crónica (Garg, & Bhatia, 2005), por lo que es necesario la generación de tratamientos alternativos contra éste parásito. Ya que no se han identificado proteínas similares a TcTS en humanos, la convierte en un blanco para el diseño y/o desarrollo potencial de fármacos y vacunas.

En este proyecto de investigación se estableció una reacción colorimétrica para la detección rápida de la actividad de trans-sialilación. De manera simultánea, se expresaron de forma recombinante varias mutantes de la TcTS así como la enzima nativa. Se logró identificar una mutante la cual carece de actividad de trans-sialidasa comparada con la enzima nativa. Esto representó un gran avance en el proyecto lo cual permitirá contribuir en el diseño de potenciales tratamientos contra la tripanosomiasis.

Materiales y métodos

Cultivo de *E. coli* BL-21- β GalKO

En el presente proyecto se trabajó con una cepa de *E. coli BL-21* deletante para la enzima β -galactosidasa. La cepa fue amablemente donada por el Dr. Josef Voglmeir del Centro de Investigaciones en Glicómica y Bioingeniería de Glicanos de la Universidad de Agricultura de Nanjing, China. A partir de una alícuota se sembró en medio Luria Bertani (LB) sólido a 37°C toda la noche, para obtener colonias aisladas. Se tomó una colonia con la que se inocularon 5 ml de medio LB líquido y se cultivó a 37°C toda la noche.

Generación de células competentes

Se tomaron 200 μ l de medio de cultivo previamente incubado toda la noche y que contenía *E. coli BL-21- β GalKO* y se añadieron a un matraz de 250 ml que contenía 50 ml medio LB fresco sin antibiótico. Este medio de cultivo se incubó a 37°C por 4 horas con agitación constante para alcanzar una densidad óptica (O.D.600) de 0.6. Una vez alcanzada la O.D. deseada se colocó el cultivo en hielo por 10 minutos. El cultivo se transfirió a tubos de 50 ml (Falcon) y después se centrifugó por 10 minutos a 4000 rpm a 4°C (5430R, Eppendorf). Se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla suavemente en buffer TB (solución de Pipes, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y KCl, pH 6.7). Las células se colocaron nuevamente en hielo por 10 minutos. Se centrifugó nuevamente para recolectar las células, se desechó el sobrenadante y se resuspendió en 1.6 ml de buffer TB, una vez resuspendido se añadieron 112 μ l de DMSO (TB DMSO 7%) y se realizaron alícuotas las cuales se conservaron a -70°C hasta su posterior uso.

Obtención de DNA plasmídico

Se obtuvo por el método de TENS en donde los cultivos se centrifugaron a 4500 rpm (5430R, Eppendorf) por 10 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendió la pastilla suavemente y se transfirió a tubos de 1.5 ml. Posteriormente, se añadió a cada tubo 2 μ l de RNAasa (100ng/ml) (Thermo-Fisher) mezclando por inversión. Se añadieron 300 μ l de solución TENS (Tris/HCl 10 mM, pH 7.5; EDTA 1Mm; NaCl 0.1 M; SDS 0.5%) agitando nuevamente y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Después se agregó 150 μ l de acetato de sodio (3M, pH 5.2) resuspendiendo la muestra y se incubó nuevamente por 10 minutos en hielo. Posteriormente los tubos se centrifugaron a 11000 rpm en una centrifuga mini spin (Eppendorf) por 10 minutos a temperatura ambiente. Se colocó el sobrenadante en tubos de 1.5 ml nuevos estériles a los cuales se les se agregó 900 μ l de etanol absoluto frío (Karal) y se incubaron en hielo durante 20 minutos. Los tubos se centrifugaron nuevamente a 11000 rpm por 10 min desechando sobrenadante. Se realizaron 3 lavados con etanol al 70 % posteriormente se secó la pastilla a temperatura ambiente y se resuspendió en 30 μ l de agua inyectable estéril.

Electroforesis horizontal

Para la electroforesis horizontal, se utilizaron geles de agarosa al 0.8 % p/v grado biología molecular (Bioline) conteniendo Gel Red 0.01 μ g/ml en TAE 1X (Tris base 40mM, Ácido acético 20mM y EDTA 1mM, pH 8.3). Las muestras se mezclaron en una relación 2:1 con regulador de carga (colorante Orange G, 0.25% p/v; glicerol 30% v/v) y se aplicó una corriente de 90 V durante 2 horas en una cámara de electroforesis Galileo (BioScience). Los geles se observaron en un transiluminador de luz UV y la imagen fue capturada con el digitalizador de imágenes Chemidoc® de BioRad.

Transformación de células *E. coli BL-21- β GalKO*

Se utilizó el método de choque térmico, en donde las células competentes de *E. coli BL-21- β GalKO* se descongelaron y se añadieron de 50 a 100ng de DNA plasmídico pTrcHis el cual alberga el gen que codifica para la TcTS nativa o bien las TcTS-mutantes. Dichos constructos fueron donados por la Dra. Sabine L. Flitsch de la Universidad de Manchester, Reino Unido. Posteriormente, el tubo se colocó en hielo durante 15 minutos y se dio un choque térmico a 42 ° C por 30 segundos y se regresó al hielo por 2 minutos, posteriormente se adicionó 1 ml de LB y se incubó a 37 ° C por una hora. Se sembraron las células en medio LB sólido con ampicilina y las placas se incubaron toda la noche a 37°C. La eficiencia de transformación se calculó utilizando las ecuaciones de los incisos 1 y 2 de esta sección.

$$(1) \text{ UFC} = \frac{(\# \text{ de colonias})(\text{Factor de dilución})(\text{Volumen de células competentes})}{\text{Volumen utilizado en la placa}}$$

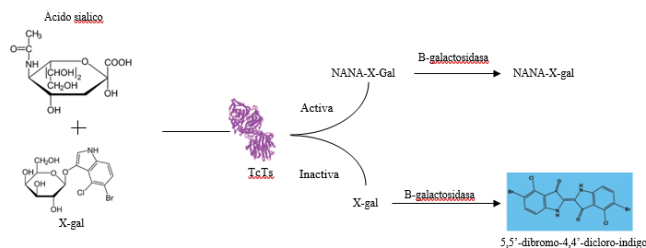
$$(2) \text{ Eficiencia} = \frac{\text{UFC}}{\mu\text{g de DNA plasmídico}}$$

Expresión de proteínas recombinantes y lisis celular

Una colonia de las células transformadas se inoculó en 5 ml en medio LB líquido y se incubó durante toda la noche. Posteriormente, de éste cultivo se tomaron 0.5 ml para inocular 50 ml de medio LB fresco adicionado con ampicilina en un matraz de 250 ml hasta alcanzar una O.D.600 de 0.6. Una vez alcanzada esta densidad se adicionó Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) (Sigma-Aldrich) a una concentración final de 1mM. El cultivo se incubó a 26 ° C con agitación constante a 150 rpm durante 4 horas. Posteriormente las células se colectaron mediante centrifugación y se lisaron con buffer de lisis (20mM Tris-HCL pH 7.5, 50mM NaCl, 0.2 % Triton X-100 y 1mg/ml de lisozima). La mezcla se incubó en hielo durante 15 minutos y se centrifugó a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C para recuperar el sobrenadante el cual contenía a la proteína TcTS nativa o mutantes.

Determinación de la actividad de trans-sialidasa

Para la determinación de la actividad enzimática se utilizó suero fetal bovino (SFB) como donador de ácido siálico y 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-Gal) (Sigma-Aldrich) como aceptor a una concentración final de 1mM. A esta mezcla de reacción se añadieron 20 μ l del sobrenadante que contenía la enzima recombinante y se incubó toda la noche a 25°C. Posteriormente se agregaron 2.5 μ l de la enzima β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* (Sigma), ésta última remueve la galactosa del compuesto X-Gal favoreciendo la formación de complejos indólicos lo que genera la aparición de la coloración azul (Esquema 1). Posteriormente se determinó su absorbancia la cual se midió por espectrofotometría a 630nm (Epoch, BioTek). Cada reacción se realizó por triplicado.



Esquema 1. Reacción de colorimetría para la determinación de la actividad enzimática de la enzima TcTS nativa y mutantes. SFB como donador de ácido siálico, X-Gal como molécula aceptora y la enzima TcTS.

RESULTADOS

La TcTS es una proteína que se encuentra en la superficie de *T. cruzi* la cual se ha demostrado que juega un papel importante en su ciclo de vida del parásito ayudándolo a evadir la respuesta inmune e invadir a las células del hospedero (Buschiazzi, *et al.*, 2012, Schenkman, 1993). En el presente proyecto se prepararon células competentes y se utilizaron para su transformación con el plásmido pTrcHis-TcTS y mutantes de las cuales se obtuvieron las siguientes eficiencias de transformación: TcTS nativa= 104, TcTS mut 5= 141, TcTS mut 6= 388, TcTS mut 7= 104, TcTS mut 8 = 113, TcTS mut 9= 70 y TcTS mut 10= 44. Aunque las eficiencias de transformación fueron bajas comparadas con los datos reportados en las casas comerciales ($1-5 \times 10^7$ -New England Biolabs) se logró aislar al menos una colonia de cada transformante. De ellas posteriormente se extrajo DNA plasmídico y se determinó su integridad mediante electroforesis en geles de agarosa (Fig. 1).

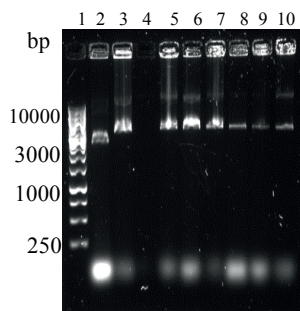
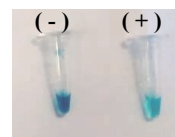


Figura.1. Electroforesis en gel de agarosa del DNA plasmídico del vector pTrcHis-TcTS y mutantes. Se observa el vector pTrcHis vacío en el carril 2 posteriormente se cargaron los plásmidos de la enzima nativa y varios mutantes respectivamente (carriles 3 al 10). En el carril 1 se cargó el marcador de peso molecular de 1kb de Invitrogen.

Posteriormente se estandarizó una reacción colorimétrica que nos permitiría determinar la actividad de las enzimas TcTS nativa y mutantes. Dicha reacción genera un compuesto azul (figura 2), de esta forma se podrán obtener datos semicuantitativos tras la determinación de su absorbancia a 630nm. En dicha reacción, la intensidad de la coloración será inversamente proporcional a la actividad de trans-sialilación. Esto es, que entre más colorida este la muestra menor actividad presentará la enzima.

Figura 2. Reacción colorimétrica para detección de la actividad de trans-sialidasa. La reacción contiene X-Gal, SFB, TcTS nativa en el control positivo y solamente X-Gal y SFB en el control negativo, a ambas reacciones posteriormente se les añadió β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* generando una coloración azul en la solución.



Se realizó la expresión de la enzima TcTS nativa y mutantes en las células *E. coli* BL-21- β GalKO, las cuales se lisaron para posteriormente determinar su actividad observando variaciones en la intensidad de la coloración. Para obtener una imagen de mejor calidad se tomó una fotografía utilizando el digitalizador de imágenes Chemidoc® de BioRad bajo luz UV, observando la aparición de fluorescencia debido a la presencia de anillos aromáticos del compuesto X-Gal en solución, esta fluorescencia disminuye cuando éste compuesto sufre una modificación debida a la actividad de la β -galactosidasa. Por lo que en este caso, la aparición de fluorescencia será directamente proporcional a la actividad de trans-sialilación (figura 3). De esta forma se llegó a la misma conclusión que cuando se observó la visualmente la aparición de la coloración azul.

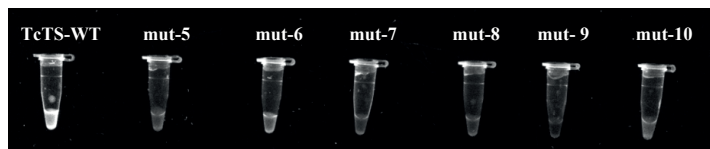


Figura 3. Presencia de fluorescencia en las reacciones positivas para la actividad de trans-sialidasa. Cada tubo contiene X-Gal, SFB, TcTS nativa o TcTS mutante, a todas las muestras se les añadió β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis*.

Una vez estandarizada la reacción colorimétrica, se midió la absorbancia de todas las muestras a 630nm. De los datos obtenidos se sacó un promedio del cual se graficó su inverso y desviación estándar obteniendo así una gráfica con la actividad enzimática de TcTS nativa y mutantes (figura 4). Esta gráfica confirmó lo que se había observado en la figura 3 en donde la TcTS nativa presentó actividad y también se observó que la mutante 9 fue la que presentó menor actividad. De manera interesante se observó que la mutante 10 presenta mayor actividad que la enzima nativa, sin embargo estos resultados no concuerdan con los observados en la figura 3 por lo que se requiere que sean corroborados.

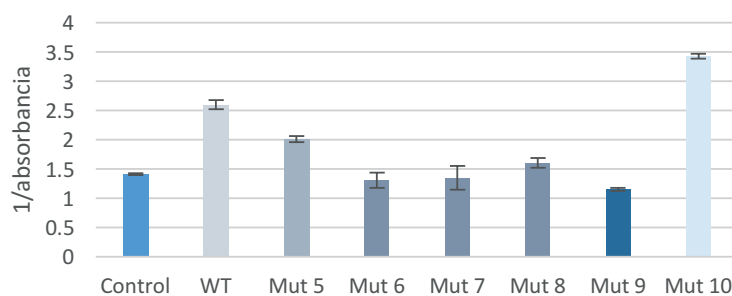


Figura 4. Actividad relativa de trans-sialilación de las enzimas TcTS nativa y mutantes. La absorbancia se midió a 630nm, cada reacción se realizó por triplicado.

CONCLUSIONES

Se logró transformar células de *E. coli BL-21-βGalKO* para producir la enzima TcTS nativa y varias mutantes. Se determinó la actividad enzimática de dichas mutantes y se observó que la mutante 9 es la que presenta menor actividad, por lo que se propone ésta podrá ser usada en el futuro para el desarrollo de herramientas de diagnóstico o para la producción de anticuerpos para combatir la infección causada por este parásito. Los resultados obtenidos de este proyecto representan un gran avance y nos acerca un poco más a la generación al diseño de tratamientos novedosos para combatir la tripanosomiasis.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la UG por el apoyo institucional para fortalecer el conocimiento científico y el desarrollo personal de los estudiantes. Se agradece también a la UG por el apoyo para fortalecer la excelencia académica convenio 89/2016. Se agradece al Dr. Voglmeir y la Dra. Flitsch por la donación de cepas y plásmidos respectivamente. Se agradece al Dr. Mario Pedraza y a la Dra. Eva Ávila por el apoyo poniendo a nuestra disposición β-galactosidasa y SFB usados en el presente proyecto. ANB agradece el financiamiento otorgado por CONACYT por el apoyo para la realización de posgrados nacionales.

BIBLIOGRAFIA

- Buscaglia Carlos A, *et al.* (2006). Trypanosoma cruzi Surface mucins: host-dependent coat diversity. *Nature reviews Microbiology*, 4(3), 229-236.
- Buschiazzi, A., *et al.* (2012). Trypanosoma cruzi trans-sialidase in complex with a neutralizing antibody: structure/function studies towards the rational design of inhibitors. *PLoS pathogens*, 8(1), e1002474.
- Cabello, R. R. (2007). *Microbiología y parasitología humana/Microbiology and Human Parasitology: Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias/Etiological Basis of Infectious and Parasitic Diseases*. Ed. Médica Panamericana.
- Carabarin-Lima, A., *et al.* (2013). Chagas disease (American trypanosomiasis) in México: an update. *Acta tropica*, 127(2), 126-135.
- Garg, N., & Bhatia, V. (2005). Current status and future prospects for a vaccine against American trypanosomiasis. *Expert review of vaccines*, 4(6), 867-880.
- Rubin-de-Celis, *et al.* (2006). Expression of trypomastigote trans-sialidase in metacyclic forms of Trypanosoma cruzi increases parasite escape from its parasitophorous vacuole. *Cellular microbiology*, 8(12), 1888-1898.
- Schenkman, S., & Eichinger, D. (1993). Trypanosoma cruzi trans-sialidase and cell invasion. *Parasitology Today*, 9(6), 218-222.
- Schenkman, S., *et al.* (1991). A novel cell surface trans-sialidase of Trypanosoma cruzi generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells. *Cell*, 65(7), 1117-1125.

ANÁLISIS DE DISTINTOS REFORZADORES EN UNA TAREA DE CONDICIONAMIENTO OPERANTE DE PALANQUEO EN RATAS WISTAR

Esparza- Reyes Diana ¹, Gabriela Santana-Chavez² y Rojas- Piloni Gerardo²

RESUMEN

Se analizaron diferentes tipos de condicionamiento en ratas para la realización de una tarea de palanqueo, que involucra la realización de un movimiento voluntario. Asimismo, se analizaron distintos reforzadores (agua o sacarosa). De esta manera el grupo con más eficacia de aprendizaje fue el de reforzador con restricción de agua por 22 horas seguido del grupo restringido por 23 horas. Finalmente, el grupo, con el reforzador de sacarosa no tuvo un buen desempeño en el aprendizaje de la tarea de palanqueo. Concluimos que la restricción de agua es el mejor método para un condicionamiento operante que involucra un movimiento voluntario.

ABSTRACT

Different types of conditioning were analyzed in rats for the accomplishment of a task of palanqueo, that involves the realization of a voluntary movement. Also, different reinforcers (water or sucrose) were analyzed. In this way, the group with the most efficacy of learning was the reinforcer with restriction of water for 22 hours followed by the restricted group for 23 hours. Finally, the group, with the sucrose enhancer did not perform well in learning the task of pounding. We conclude that water restriction is the best method for an operant conditioning involving a voluntary movement

PALABRAS CLAVE: condicionamiento, palanqueo, aprendizaje, reforzador y agua durante

INTRODUCCIÓN

El condicionamiento operante se refiere a un proceso en el cual la frecuencia con que está ocurriendo una conducta, se modifica o se altera debido a las consecuencias que esa conducta produce (Reynolds, 1968). El condicionamiento operante, tiene como objetivo fortalecer o debilitar alguna conducta en función a las respuestas obtenidas por la realización de ésta. Cabe mencionar que tiene una gran diferencia con el condicionamiento clásico, ya que éste es en función de la respuesta biológica de un ser vivo ante un estímulo determinado (Feldman, 2014).

La identificación de cual reforzador resulta ser el más efectivo en diferentes grupos de ratas, para generar un aprendizaje de palanqueo es un estado motivacional que tiene una gran influencia en el condicionamiento, la cual es alterada por medio de la de privación de comida o agua, a lo cual se le denomina reforzador (Tabbara et al; 2016). Existen diferentes tipos de reforzadores y uno de los reforzadores más utilizados en el condicionamiento de roedores es de agua con sacarosa, ya que es preferible por ellos en las tareas de condicionamiento (Díaz et al; 2004).

En este estudio se realizó la medición del desempeño de una tarea de palanqueo y se compararon 3 grupos experimentales con reforzadores diferentes. El primero otorgaba agua durante la tarea con una restricción por 23 horas; el segundo el reforzador era agua con sacarosa durante la tarea (sin restricción); el último grupo obtuvo agua como reforzador con una restricción por 22 horas. Estos grupos estuvieron sometidos a dos diferentes fases de aprendizaje: la primera fue una asociación del palanqueo y el reforzador y en la segunda fase, el palanqueo debía asociarse a un estímulo luminoso.

¹Universidad Autónoma de Aguascalientes. Departamento de Biología. Av. Universidad # 940, Ciudad Universitaria, C. P. 20131, Aguascalientes, Ags. México

d.l.esparza76@gmail.com

²Instituto de Neurobiología¹ Integración sensoriomotora, Boulevard Juriquilla #3001, C.P 76230, Querétaro, México. piloni@unam.mx

METODOLOGIA

Sujetos y reforzador

Para la etapa preliminar de condicionamiento se utilizaron 11 ratas Wistar hembras de 21 días. Las cuáles se separaron en tres grupos. El primero se reforzó con agua simple y se restringió de agua 24 horas previas al condicionamiento. El segundo se restringió por 22 horas y solo obtuvo agua durante la tarea y una hora posterior a la tarea. El tercer grupo contó con libre acceso de agua y fue reforzado durante la tarea con sacarosa al 8%. Ambos grupos fueron mantenidos en condiciones de iluminación de 12 horas luz y 12 oscuridades con libre acceso al alimento.

Instrumentos

La caja utilizada para el programa de condicionamiento fue armada dentro del laboratorio con partes especializadas para cajas de Skinner, siguiendo el protocolo de elaboración de Escobar y Kennon (2010). Para la programación de la caja se utiliza el lenguaje de programación Visual Basic®, equipada con la tarjeta de Arduino® con el cual se realizó manualmente el programa de condicionamiento.

Los tres grupos se sometieron a 2 diferentes etapas de realización de la tarea. Para el condicionamiento, se procedió a una sesión diaria de 60 minutos en la caja de Skinner, reforzando con 18 μ L de agua por cada conducta correcta.

1er etapa del condicionamiento: asociación del palanqueo con el suministro del reforzador. En esta etapa los animales estarán en libre movimiento y recibieron agua únicamente cuando presionaron la palanca.

2da etapa del condicionamiento: asociación luz-palanqueo y suministro del reforzador. En esta etapa los animales se encontraron en libre movimiento y sólo recibieron agua cuando la luz se encontraba encendida.

RESULTADOS

Para la fase uno, el grupo de restricción de agua durante 22 horas mostro cambios significativos (comparación múltiple de Tukey-Kramer $p < 0.05$) a partir de la sesión 4 mientras que el de restricción de 23 horas mostro hasta la sexta sesión. El grupo de agua con sacarosa no mostro cambios hasta la sesión 18. (fig 1).

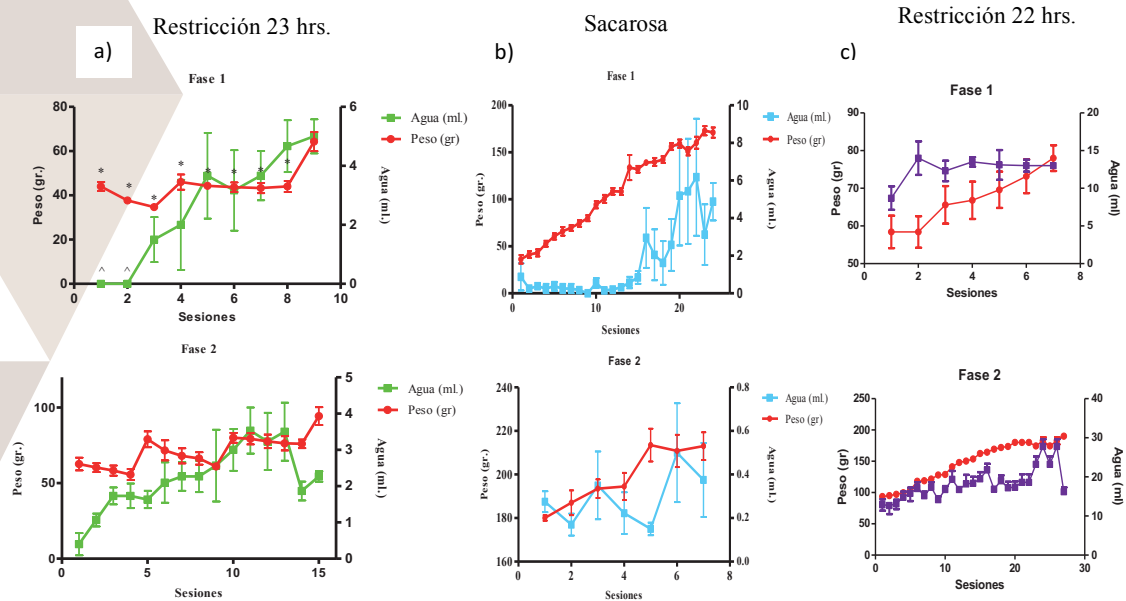


Figura 1.- a) grupo de agua con restricción de 23 hrs. b) grupo con sacarosa, c) agua con restricción de 22 hrs. Cada uno con ANOVA seguida de una comparación múltiple de Tukey-Kramer.

La relación entre el peso corporal y consumo de agua de los tres grupos mostró también diferencias. El que grupo que posee un incremento de peso más estable conforme avanzan las sesiones es el grupo que obtuvo sacarosa como reforzador; en el grupo de restricción de agua por 23 hrs se observó una variación en el peso durante las dos fases del condicionamiento, mientras el grupo de restricción de 22 horas mantuvo un peso estable y consumo de agua durante las sesiones (fig 2).

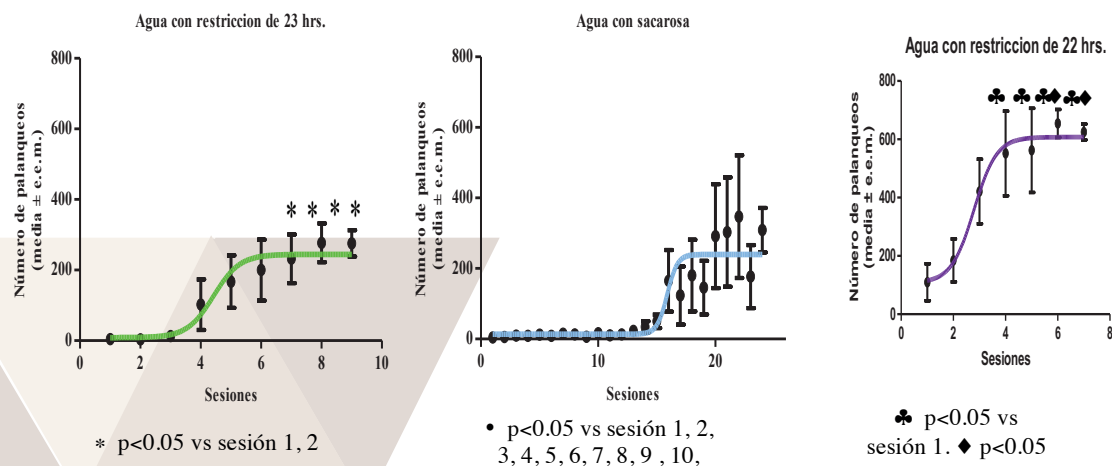


Figura 2.- comparación consumo agua vs pesos de la fase uno y dos, en los tres diferentes grupos, agua con restricción de 23 hrs, sacarosa y agua con restricción de 22 hrs. Cada uno con ANOVA seguida de una comparación múltiple de Tukey-Kramer).

Con la finalidad de estimar el desempeño en el aprendizaje. Se estimaron los porcentajes de palanqueos correctos e incorrectos para cada grupo en las dos fases, durante el total de sesiones. Así el grupo con restricción de 22 horas fue el que mayor porcentaje de aciertos en palanqueos correctos mostró (figura 3) y simultáneamente decrecían los errores en palanqueos incorrectos (figura 4). El grupo con restricción de agua por 23 horas también mostró un incremento gradual en el número de palanqueos correctos, sin embargo el grupo de sacarosa no demostró cambios significativos durante las sesiones en las dos fases.

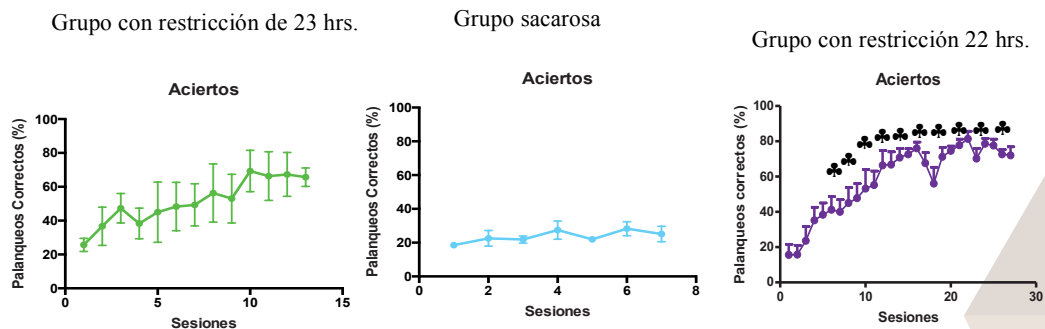


Figura 3.- comparación consumo aciertos de palanqueos correctos en las dos fases en los tres diferentes grupos, ♣ $p < 0.05$ vs sesión 1- 6 (ANOVA seguida de una comparación múltiple de Tukey-Kramer).

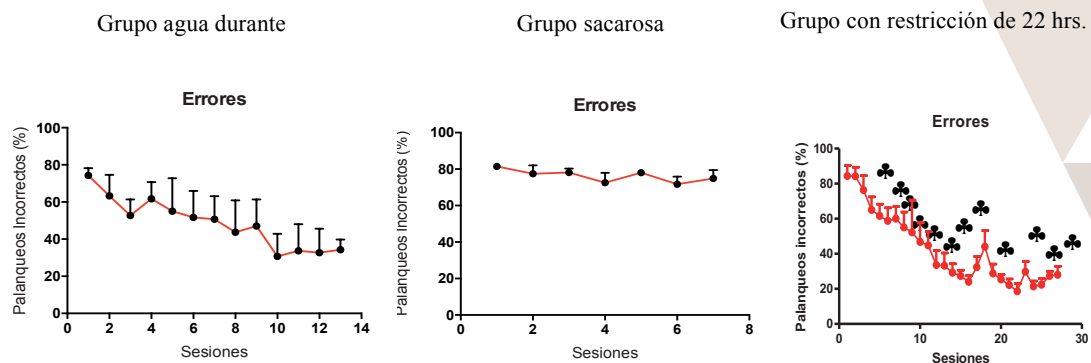


Figura 4.- comparación consumo aciertos de palanqueos correctos en las dos fases en los tres diferentes grupos, ♣ $p < 0.05$ vs sesión 1, 2 y 3 (ANOVA seguida de una comparación múltiple de Tukey-Kramer).

Un análisis detallado del desempeño de cada grupo experimental donde se compara el número y porcentaje de palanqueos correctos e incorrectos cada 10 minutos de las sesiones, mostró que en la primera sesión el grupo de agua con restricción de 22 horas mostró ser el que tiene mayor porcentaje palanqueos correctos, mientras que en la última sesión, los grupos de restricción de agua de 23 y 22 hrs muestra un incremento considerable, siendo el de 22 hrs de restricción el que posee mayor porcentaje y estabilidad durante la sesión.

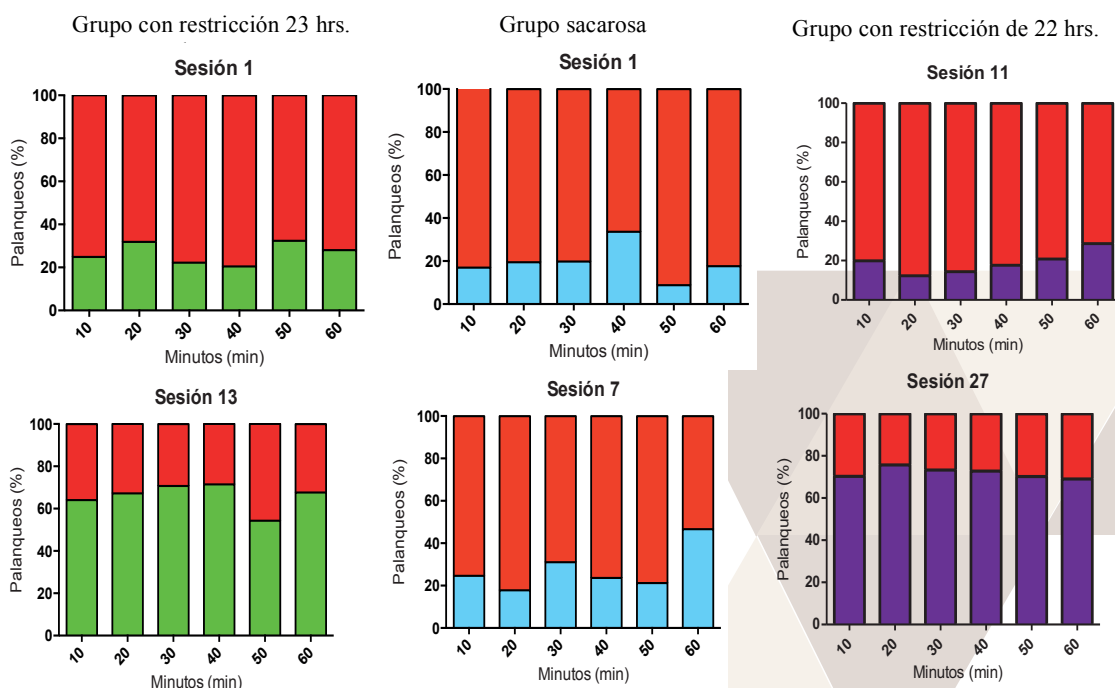


Figura 4.- número y porcentaje de palanqueos correctos e incorrectos (rojo) de cada grupo en su última sesión.

DISCUSIÓN

Se demostró que el grupo con la mayor eficacia en el aprendizaje fue el de restricción de 22 hrs esto sugiere que los animales presentan una mayor para realizar la tarea. Esto concuerda con Bruner y Ávila (2002) quienes encontraron para el condicionamiento operante el agua es un eficaz reforzador. Además se analizó que el grupo de agua con restricción de 23 hrs tuvo una gran disminución de peso, comparados con los animales restringidos solo por 22 hrs. En este sentido McSweeney (1974) demuestra que existen variaciones importantes en el peso corporal producto de diferentes programas de privación de agua, y esto puede afectar el desempeño conductual.

El grupo de sacarosa mostró tener poca eficacia en el aprendizaje en ambas fases del estudio, (figuras 4, 5 y 6) posiblemente debido a que la sacarosa no resultó ser lo suficiente atractiva como reforzador. Esto concuerda con los hallazgos reportados por Suárez et al (2012) la sacarosa, tiene diferentes resultados en el aprendizaje de acuerdo al porcentaje utilizado, siendo más efectivo el de porcentaje elevado.

Un aspecto importante a considerar es que el estrés hídrico puede afectar el desempeño conductual Claro et al; (2009) demostró que las ratas pueden tener un menor aprendizaje de alguna tarea bajo efectos de estrés hídrico o calórico, lo cual consiste en la baja respuesta en los primeros minutos de las sesiones en los palanqueos por las ratas con restricción de agua por 23 y 22 horas.

CONCLUSIÓN

El desempeño en el aprendizaje en una tarea de condicionamiento operante de palanqueo es mayor en animales restringidos en el consumo de agua. Asimismo, el agua como reforzador es más eficaz que la sacarosa para este tipo de condicionamiento.

BIBLIOGRAFÍA

Bruner, C. A., & Ávila, R. (2002). "Adquisición y mantenimiento del palanqueo en ratas sin privación explícita del reforzador". *Revista Mexicana de Análisis de la Conducta*, Núm. 28, [pp 107-130]

Claro, S., Gamba, M., Múnera, A., & Lamprea, M. (2009). "Efecto de la restricción calórica en el aprendizaje y la recuperación de una tarea espacial en ratas expuestas a estrés agudo". *Suma psicológica*, Núm. 1, Vol XVI. [pp 130-140]

Díaz, E., De la Casa, L., Ruiz, G. & Baeyens, F. (2004). "Aprendizaje sabor-sabor en la adquisición de preferencias gustativas". *Psicológica*, Núm. 25, [pp135-146].

Feldman (2014). *Psicología con aplicaciones a países de habla hispana*. México DF: Mc Graw Gill.

González-Sastre, F., Turet, M. S., & Tobella, J. S. (1976). "Efectos de la desnutrición precoz sobre la capacidad de aprendizaje de la rata". *Anuario de psicología/The UB Journal of psychology*, Núm. 14, [pp 105-116].

McSweeney, F. K. (1974). "Variability of responding on a concurrent schedule as a function of body weight. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*, Núm. 21, [pp 357-359]

Reynolds, G. (1968). *Compendio de condicionamiento operante*, EUA: Universidad de california.

Tabbara, R., Maddux, J., Beharry, P., Iannuzzi, J. & Chaudhri, N. (2016). "Effects of Sucrose Concentration and Water Deprivation on Pavlovian Conditioning and Responding for Conditioned Reinforcement. *Behavioral Neuroscience*", Núm. 2, vol. 130 [pp 231-242].

Suárez, A., Mustaca, A., Pautassi, R., & Kamenetzky, G. (2012). "Discriminación de sabores en procedimientos de cambios sorpresivos del reforzador durante la temprana ontogenia de la rata". *Suma Psicológica*, Núm.19 Vol. I. [pp. 70-75]

IDENTIFICACIÓN DE LA SUBUNIDAD ALFA DE CANALES BK EN RETINAS DE RATAS WISTAR

Erika Márquez Padilla¹, Ricardo Espinosa Tanguma² y Alma Rosa Barajas Espinosa²

RESUMEN

La diabetes mellitus es una enfermedad en la que la hiperglucemia es la principal característica y ésta se da por falta de secreción y/o desarrollo de resistencia de la hormona insulina y, de no controlarse adecuadamente, trae como consecuencia bastantes complicaciones y alteraciones en el cuerpo, especialmente en ojos, corazón, riñones y vasos sanguíneos. Dentro de las complicaciones sistemáticas se encuentra la retinopatía diabética, siendo ésta la principal causa de ceguera, que se presenta cuando los vasos sanguíneos sufren un deterioro por causa de la diabetes. Un controlador importante de las arteriolas es la actividad de los canales iónicos en las membranas plasmáticas de las células del músculo liso vascular. Los canales de BK tienen un papel importante en la regulación del tono del músculo liso. Estos canales están compuestos por subunidades α y β . El objetivo de la presente investigación fue identificar la localización de la proteína BK_{Ca} y, para ello, se trabajó con retinas de ratas wistar, normales y ratas inducidas a diabetes y así comparar el resultado de ratas control con el de ratas diabéticas, mediante técnicas de western blot e inmunohistoquímica (MK McGahon *et al.*, 2007).

ABSTRACT

Diabetes mellitus is a disease in which hyperglycemia is the main characteristic and this is due to lack of secretion and / or development of resistance of the hormone insulin and, if not properly controlled, leads to many complications and alterations in the body, Especially in eyes, heart, kidneys and blood vessels. Among the systematic complications is diabetic retinopathy, which is the main cause of blindness, which occurs when blood vessels deteriorate because of diabetes. An important controller of arterioles is the activity of ion channels in the plasma membranes of vascular smooth muscle cells. BK channels play an important role in the regulation of smooth muscle tone. These channels are composed of α and β subunits. The objective of the present investigation was to identify the location of the BK_{Ca} protein and, for this purpose, it was worked with retinas of wistar rats, normal and rats induced to diabetes and thus to compare the result of control rats with that of diabetic rats, by means of techniques of Western blot and immunohistochemistry (MK McGahon *et al.*, 2007).

Palabras Clave: Diabetes mellitus, retina, BK.

INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus (DM) es un trastorno endocrino causado por la incapacidad de producir o de utilizar insulina. Es una enfermedad que se caracteriza por hiperglucemia crónica debido a la falta de secreción de insulina o falla en su acción; por lo tanto, una persona con hiperglucemia presenta alteración en los niveles de insulina. Debido a que la insulina es incapaz de promover el transporte de la glucosa hacia las células del cuerpo, el nivel de glucosa sanguínea es alto. Existen dos tipos de DM, el tipo 1 y tipo 2. El tipo 1, el nivel de insulina es bajo porque el sistema inmunitario de la persona destruye las células beta del páncreas, por lo que se produce poco o nada de insulina. La diabetes tipo 2, es en la que las células diana se vuelven menos sensible a la insulina por la regulación por decremento de los receptores de insulina. (Tortora y Derrickson, 2013).

La DM se puede asociar a diversas complicaciones en el cuerpo y ha alcanzado proporciones epidémicas, siendo la DM tipo 2, responsable del 90% de los casos. A pesar de los avances en el tratamiento y prevención, la prevalencia de la diabetes ha aumentado de manera más drástica de lo esperado: en el año 2000 se esperaba una cifra de 150 millones de personas diabéticas; sin embargo, llegó a 177 millones, lo que proyecta que en 2025 se espera una estimación de 333 millones de personas con DM en el mundo (López, 2009).

Dicha enfermedad causa diversos daños en el cuerpo como neuropatía y enfermedades macro y microvasculares. La diabetes causa cambios en la estructura y función de los vasos sanguíneos y, en la retina, conduce a la deficiencia visual. Una vía principal a través de la cual se cree que la hiperglucemia contribuye a la microangiopatía, es la interrupción del flujo sanguíneo de la retina. Los estudios basados en pacientes han demostrado que las anomalías hemodinámicas de la retina ocurren antes del inicio de la retinopatía diabética clínica y que el desarrollo y progresión de la retinopatía se correlaciona con el grado de los cambios observados en el flujo sanguíneo (McGahon *et al.*, 2007).

La retinopatía diabética es una enfermedad degenerativa de la retina causada por diabetes mellitus, en la cual los vasos sanguíneos de la retina sufren un deterioro, lo que puede causar ceguera. A medida que la diabetes avanza, las arteriolas comienzan a dilatarse y el flujo sanguíneo retiniano en masa aumenta en proporción a la gravedad de la retinopatía y, por tanto, el grado de isquemia retiniana. La retina es una capa profunda de la parte posterior del globo ocular formada por tejido nervioso, donde comienza el proceso de visión, y una capa pigmentada de células epiteliales que están en contacto con la coroides (Tortora y Derrickson, 2013).

Un factor importante que controla el estado contráctil de las arteriolas es la actividad de los canales iónicos en las membranas plasmáticas de las VSMC (Células del Músculo Liso Vascular). Se sabe que los canales BK desempeñan un papel crucial en la regulación del tono del músculo liso arterial desde el bloqueo de estos canales utilizando el inhibidor específico iberitoxina, provocando la despolarización de la membrana y la vasoconstricción en recipientes aislados a presión. Los canales BK son activados por la liberación de Ca^{2+} , resultantes de la apertura de los canales del receptor de ryanodina (RyR) en el retículo sarcoplásmico. La activación de los canales BK produce una corriente de K^+ hacia el exterior que se opone a la contracción de las VSMC al causar hiperpolarización de la membrana. Esto reduce la afluencia de Ca^{2+} mediante la reducción de la activación de la dependencia de la tensión de canales de Ca^{2+} . Los canales BK están compuestos de subunidades α y β . La subunidad α forma el poro selectivo de K^+ , mientras que las subunidades β influyen en la cinética, la farmacología y la sensibilidad al Ca^{2+} de las corrientes BK. (MK McGahon *et al.*, 2007).

Se trabajó con ratas Wistar normales (control) y ratas inducidas a diabetes con estreptozotocina (STZ), sustancia química que destruye las células β del páncreas, única fuente de insulina en el cuerpo. Estos animales posteriormente presentan muchos de los cambios vasodegenerativos asociados con la retinopatía diabética humana. Se asumió la hipótesis que la diabetes provoca disminución de la subunidad α , reduciendo así la capacidad de los canales BK de hiperpolarizar las VSMC retinianas y resistir la vasoconstricción. Esto sugiere que los cambios en la composición molecular de los canales BK en VSMC de retina durante la diabetes podrían contribuir a la aparición y progresión temprana de la retinopatía diabética. Por lo que, en este proyecto, se buscó identificar la proteína BK_{Ca} en retinas de ratas wistar, utilizando técnicas de western blot e inmunohistoquímica para su localización e identificar una posible disminución de la proteína en ratas diabéticas.

MÉTODOS Y MATERIALES

Obtención de retinas: Las retinas utilizadas fueron de ratas Wistar macho, inyectadas con pentobarbital sódico (130 mg/kg) como anestesia.

Western blot: Las muestras de retina se congelaron y se pasaron a tubos de eppendorf, agregando 30 μl de Ripa, sonicando 3 veces por 10 segundos y dejando incubarse en hielo por 30 minutos. Posterior a la incubación, las muestras se centrifugaron a 14.8 RPM durante 15 minutos. Al término de la centrifugación, se tomaron los sobrenadantes y se pasaron a otros tubos diluyendo la solución e incubando a 37°C durante 30 minutos. Las muestras se llevaron al espectrofotómetro para realizar la cuantificación. En seguida, los tubos se colocaron en agua a temperatura de 60 a 100°C durante 10 minutos para su desnaturalización y, posteriormente, se cargaron las muestras en geles de poliacrilamida. A continuación, se hizo la transferencia a membrana, lavando 3 veces con TBS- Tween y se bloqueó por una hora con leche. Luego se agregó el anticuerpo primario a dilución de 1:5000 y se dejó con él durante toda la noche a una temperatura de 4°C. Se hicieron tres lavados con TBS-Tween por 10 minutos cada uno y se agregó el anticuerpo secundario en una solución de 1:5000 con leche por una hora. Al término, se hicieron 3 lavados con TBS por 10 minutos y se colocaron los reactivos de revelado durante 1 minuto donde después se prosiguió con el revelado en un fotodocumentador.

Aislamiento de vasos sanguíneos en retinas: Una vez obtenidas las retinas directamente del animal, se diseccionaron y se pasaron a solución para mantener el tejido. Después, se separó la membrana retino-vítrea y se cortó el borde de cada retina. Posteriormente se incubaron a 30°C por 24 minutos en una solución preparada con 2.5 ml de solución Earle, 1 cristal de cisteína y 7.5 μl de papaína. Se utilizaron cubreobjetos redondos para la impresión de vasculatura, dejando en etanol al 50% y se dejaron secar por 15 minutos. Las retinas fueron cortadas en cuadrantes y los cubre objetos secados se colocaron sobre cada uno de los cuadrantes y después se colocaron en solución para seguir preservado el tejido.

Inmunohistoquímica: Una vez realizado el aislamiento de vasos sanguíneos, los portaobjetos redondos fueron cubiertos con 1 ml de paraformaldehído al 4%, echo con PBS sin Ca dejándolos en solución por 10 minutos para su fijación. Pasado el tiempo de fijación, se realizaron tres lavados de 10 minutos con PBS sin Ca, para después agregar tritón al 0.1% y 1 μl de anticuerpo primario. Se plasmó una cámara de humedad en una caja Petri sellada y se dejó durante toda la noche en anticuerpo primario a temperatura de 4°C. Posteriormente se hicieron 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBS, para quitar excesos de anticuerpo primario y se agregó el anticuerpo secundario por 1 hora con PBS, tapando completamente las muestras de la luz. Se hicieron nuevamente tres lavados con PBS de 10 minutos cada uno, cubriendo las muestras. En seguida, quitó el exceso de PBS y se agregó una gota de Fluoroshield with Dapi y los portaobjetos circulares se colocaron en un portaobjetos rectangular, estos portaobjetos fueron sellaron alrededor, dejando secar por 30 minutos, tapando de la luz. Las muestras obtenidas fueron analizadas en un microscopio de fluorescencia, permitiendo captar las imágenes mediante el programa informático "QCapture", así como su composición con el programa "Imagej".

RESULTADOS

Al hacer el revelado de western blot, se observó que existe la presencia de la proteína BActina, la cual se utilizó como control positivo en dicha experimentación. Se pudo observar en las 4 muestras cargadas en la técnica de western blot; se obtuvo 3 muestras de retina y 1 de cerebro, esta última seleccionada como muestra control, ya que existe evidencia de que la proteína de interés se encuentra ahí.

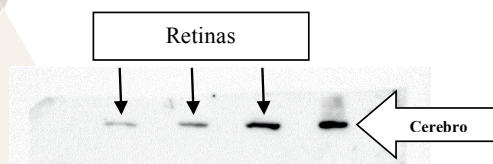


Figura 1. BActina en revelado de Western blot

En la muestra de cerebro, la proteína BK_{Ca} se encontró con mayor señal de existencia, como se muestra en la **figura 2**. En cambio, en las muestras de retinas, se pudo ver ligeramente señal de la presencia de la proteína.

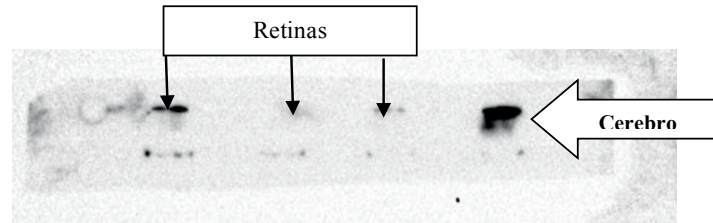


Figura 2. Revelado de Western blot. Se observó mayor intensidad de la proteína BK_{Ca} en cerebro.

Esta experimentación permitió observar la presencia de la proteína de interés buscada en retinas de ratas. Uno de los objetivos de este experimento era realizar la misma metodología en ratas inducidas a diabetes, con la finalidad de ver si la enfermedad afectaba en la degeneración de tal proteína, pero debido a la falta de tiempo de dicha investigación, no fue posible llevar a cabo el procedimiento.

La experimentación de la inmunohistoquímica se realizó primero con retinas completas, pero al realizarla no se obtuvieron los resultados esperados.

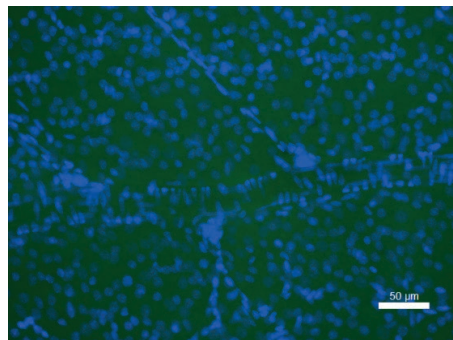


Figura 3. Inmunohistoquímica en retinas sin aislar vasos sanguíneos. En esta experimentación no se observó la señal de la proteína de interés, por tal motivo, se optó por aislar vasos sanguíneos y hacer la inmunohistoquímica con ese protocolo.

Debido a que no se obtuvieron los resultados esperados, se optó por usar otro protocolo en donde primero se aislaron vasos sanguíneos de las retinas y después se prosiguió con metodología descrita desde un inicio. Al hacer la inmunohistoquímica, no se logró ver una señal significativa. En la **figura 4**, se puede observar que solo hay una señal, pero no se sabe con precisión si realmente la proteína de interés se encuentra en vasos sanguíneos. Se tenía planeado seguir con las experimentaciones en ratas control y ratas diabéticas para ver la diferencia con los animales enfermos, pero al igual que con el western blot, no se contó con el tiempo suficiente dentro del lapso destinado para dicha investigación.

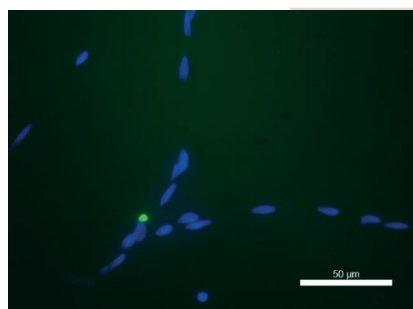


Figura 4. Inmunohistoquímica en vasos sanguíneos aislados en rata control.

CONCLUSIONES

Al realizar las experimentaciones se comprobó mediante la técnica de western blot que la proteína BK_{Ca} está presente en retinas de rata wistar. Al realizar la inmunohistoquímica en vasos sanguíneos aislados, se esperaba que hubiera una mayor señalización de la proteína de interés, pero no se obtuvieron los resultados deseados, y no se puede asegurar con certeza que la proteína se encuentre en la microvasculatura de la retina.

Cabe destacar que el propósito de dicha investigación era llevar a cabo las mismas experimentaciones con ratas inducidas a diabetes, pero por falta de tiempo, no se permitió llevarlas a cabo. Se espera que este proyecto siga en pie en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, para dar conclusiones más concretas sobre este tema.

BIBLIOGRAFIA

López, Gloria. (2009). Diabetes mellitus: classification, pathophysiology, and diagnosis. *MEDWAVE*. Recuperado en: <https://www.medwave.cl/link.cgi/Medwave/PuestaDia/APS/4315> (Fecha de consulta: 22/07/2017).

McGahon, M., Dash D., Arora A., Wall N., Dawicki J., Simpson D., Scholfield C., McGeown J., Y Curtis T. (2007). Diabetes downregulates BK β 1 potassium channel subunit in retinal arteriolar smooth muscle. *National Center for Biotechnology Information*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2596350/>. (Fecha de consulta: 22/07/2017).

Tortora, G. Y Derrickson B. (2013). Sentidos especiales. *Principles of anatomy and physiology, thirteenth edition*. 646-675.

HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE UN CONCENTRADO DE PROTEÍNAS DE SUERO DE LECHE Y EVALUACIÓN DE SUS PROPIEDADES TENSOACTIVAS

Indra Betsabé Oliva Rodríguez¹ y Mario Avila Rodríguez²

RESUMEN

En el presente trabajo se realizó la hidrólisis de un concentrado de proteínas de suero de leche, para obtener péptidos con propiedades tensoactivas y además se evaluaron dichas propiedades. Para llevar a cabo eso, se realizó la hidrólisis con pepsina y se purificó la muestra, después se realizó su caracterización fisicoquímica y se evaluaron sus propiedades de espumado, en las que se analizó la estabilidad de las espumas formadas con la muestra a través del tiempo. También se prepararon emulsiones aceite en agua (con un contenido del 70% en peso de agua) estabilizadas con los péptidos obtenidos a partir de la hidrólisis de proteínas de suero de la leche, a las cuales se les midió el tamaño de gota. Finalmente se midió la tensión interfacial (usando como segunda fase al aceite) y la tensión superficial (segunda fase el aire) para las muestras analizadas.

ABSTRACT

In the present work the hydrolysis of a whey protein concentrate was performed to obtain peptides with tensoactives properties. The hydrolysis was performed with pepsin and the sample was purified. The characterization of the hydrolysate was carried out and its foam properties were evaluated as stability over time. Oil-in-water emulsions (containing 30% oil) stabilized with whey proteins hydrolysate were also prepared, at which the particle size was measured. Finally, the interfacial tension (Interface oil-water) and surface tension (Interface oil-water) were measured for the analyzed samples.

Palabras clave

Lactosuero, péptidos, tensoactivos, emulsiones, espumas.

INTRODUCCION

El suero de leche líquido es un subproducto que durante muchos años ha sido considerado como un desecho industrial; actualmente es utilizado por sus múltiples nutrientes y propiedades funcionales. Existe un interés creciente por parte de la industria de alimentos debido a los beneficios y propiedades del lactosuero, ya que además de ser una excelente fuente de nutrientes e incrementar el valor nutricional, sirve para dar estabilidad a los alimentos, esto es porque sus proteínas sirven como tensoactivas, dando estabilidad a espumas y emulsiones alimenticias. Las proteínas del suero, que son beta lactoglobulina, alfa lactalbumina, inmunoglobulinas, seroalbúmina, entre otras. Para llevar a cabo la hidrólisis enzimática de éste grupo de proteínas se utilizó la pepsina, que es segregada por las células de la mucosa gástrica en forma de zimógeno, un precursor inactivo que se activa en presencia de HCl o de forma autocatalítica por la propia pepsina. Su pH óptimo está entre 1.5 y 2.5.

El mercado de los productos alimenticios ha experimentado un cambio sustancial en los últimos años. Ello ha conducido al uso de cada vez más aditivos entre los que se encuentran los agentes tensoactivos utilizados no solo como emulsionantes sino también por sus otras variadas funciones. Una emulsión se considera generalmente la formada por dos líquidos no miscibles, aceite en agua o agua en aceite (Ruiz, 1987). El emulsionante seleccionado tiene un papel esencial en estos productos, dado que confiere a las emulsiones la estabilidad requerida, mediante la formación de una barrera protectora alrededor de las gotas de aceite (Dickinson, 1994), determinando las propiedades de la película interfacial de la que forman parte. Adicionalmente, las proteínas son buenos estabilizantes de espumas. La formación de espumas con proteínas implica un proceso de desnaturalización controlado, ya que la molécula debe desdoblarse para que oriente sus aminoácidos hidrófobos hacia el interior de la burbuja y los hidrófilos hacia el exterior, en contacto con la fase acuosa (Macías, 2017).

Los objetivos de este proyecto fueron llevar a cabo la hidrólisis enzimática de las proteínas de suero de leche con el fin de obtener péptidos con propiedades tensoactivas, y evaluar las propiedades funcionales e interfaciales de los hidrolizados obtenidos.

METODOLOGIA

1. Materia prima

Concentrado de proteínas de suero ácido por MYPROTEIN, azida de sodio (NaN_3), ácido clorhídrico 2 M (HCl), hidróxido de sodio 1.5 M (NaOH).

2. Cuantificación de concentración de proteína.

Se realizó una curva de calibración mediante espectroscopia UV-Vis tomando como solución stock a la proteína albúmina de suero bovino (ASB) 1000 ppm (mg/L) y se hicieron diluciones de 200 ppm a 1000 ppm.

3. Preparación de la muestra

Se preparó una solución al 3% de WPC, tomando en cuenta que el concentrado de proteínas del suero contenía un 82% de proteínas. A la solución se le agregó 0.02% de azida de sodio como agente antimicrobiano. Se dejó hidratar en agitación constante a 40°C por 40 min. La muestra control se preparó bajo las mismas condiciones excepto la adición de la enzima para la hidrólisis enzimática.

¹Universidad Autónoma de Aguascalientes, Departamento de Ingeniería Bioquímica; Av. Universidad No. 940, C.P: 20131, Aguascalientes, Aguascalientes, indrabetsabe@hotmail.com

²Universidad de Guanajuato, Departamento de química sede Pueblito de Rocha; Cerro de la Venada sin número, C.P: 36040, Guanajuato, Guanajuato, avilam@ugto.mx.

a. Purificación de la muestra

A ambas muestras se les realizó una microfiltración en una celda Amicon con una membrana de poro de 0.45 µm para eliminar la presencia de sólidos suspendidos en la disolución.

b. Desnaturalización de las proteínas de WPC

La muestra de WPC hidrolizada y purificada (WPC-HP) y la muestra WPC control (WPC-C) se sometieron a calentamiento para ser desnaturalizada, para esto se utilizó un baño de arena a 95°C y la muestra se colocó en un matraz bola a reflujo, durante 15 minutos.

c. Hidrólisis enzimática

La relación de Enzima-Sustrato fue de 1:50, por lo que con la absorbancia obtenida previamente se calculó la concentración de proteínas contenidas, a partir de lo cual se calculó la cantidad en gramos de proteína presente en la muestra. Una vez calculados los gramos, se calcularon los gramos de enzima necesaria para llevar a cabo la reacción. Se llevó a 2 el pH de la muestra con HCl 2M, después se puso la muestra a calentar en un vaso de precipitados hasta llegar a 38°C, se le agregó la enzima y se mantuvieron esas condiciones de reacción por 30 minutos. Al término de los 30 minutos, se dejó enfriar la muestra y se elevó el pH con NaOH 1.5 M para inactivar la enzima y que se detuviera la reacción. A la muestra de WPC-C se le realizó el mismo tratamiento sin añadirle la enzima.

d. Segunda purificación de la muestra

Se realizó una ultrafiltración (UF) ya que la solución era una mezcla de proteínas no hidrolizadas, de enzimas y de péptidos. La ultrafiltración fue con una membrana de 10 KDa, a 30 PSI. Se obtuvieron dos soluciones, el permeado y el retenido. El permeado contenía los péptidos y el retenido las enzimas y proteínas no hidrolizadas, por lo que la solución de interés fue el permeado. Después se prosiguió con una segunda ultrafiltración, con una membrana de 1 KDa, a 40-50 PSI en donde se obtuvo en el retenido los péptidos obtenidos de la hidrólisis. Se detuvo la UF cuando se tuvo una concentración de 3 % en el retenido. A la muestra de WPC-C no se le realizó ninguna de las UF debido a que no había enzimas y péptidos que filtrar, por lo que sólo se corroboró que existiera una concentración de 3%.

4. Caracterización de la muestra: densidad, viscosidad, conductividad

A ambas muestras (WPC-HP y WPC-C) se les realizó la caracterización fisicoquímica. El cálculo de la viscosidad se llevó a cabo con un viscosímetro Cannon Fenske. La densidad se midió con un densímetro y la conductividad en un conductómetro Metrohm 712. La densidad y la conductividad se midieron una vez y la viscosidad se calculó por triplicado.

1. Propiedades espumantes

Las espumas se realizaron en un dispersor IKA T18 digital ULTRA-TURRAX, a 7000 rpm por 2 minutos. Se realizaron espumas; con el WPC control y con el WPC hidrolizado purificado. Las pruebas se realizaron por duplicado.

a. Índice de espumado

La manera de calcular el índice de espumado es a través de la siguiente fórmula:

$$\text{índice de espumado} = \frac{\text{Volumen final} - \text{Volumen inicial}}{\text{Volumen inicial}} * 100$$

Esta fórmula indica la cantidad de espuma formada por determinado volumen de muestra líquida.

b. Estabilidad

Después de hacer a espuma, se vaciaron 25 ml de espuma en una probeta inmediatamente y se contabilizó por 60 minutos el volumen de líquido formado y el volumen total de líquido y espuma contenidos en la probeta. Al término de esto, calculó:

$$\% \text{ de espumado} = \frac{\text{Volumen máximo} - \text{Volumen mínimo}}{\text{Volumen máximo}} * 100$$

2. Emulsiones

Las emulsiones se realizaron en el dispersor IKA T18 digital ULTRA-TURRAX, a 24,000 rpm por 3 minutos. Al igual que las espumas, se realizaron dos emulsiones aceite en agua (O/W) de 50 ml, con una relación 30/70, el aceite usado fue aceite de canola y como fuente acuosa se usaron las soluciones de WPC-C y WPC-HP, respectivamente.

a. Medición de tamaño de partícula

Se utilizó el granulómetro de dispersión láser, Mastersizer, Malvern, para medir el tamaño de gota obtenido y evaluar las mejores propiedades emulsificantes en ambas emulsiones (WPC-C y WPC HP), en donde se obtuvieron 5 valores: Dv10, Dv50, Dv90, D [3,2], D [4,3], los cuales indican diámetros de partícula en µm.

3. Tensión interfacial y superficial

Para realizar las mediciones se usó el equipo de ángulo de contacto, se trabajó a 27°C y una humedad de 15%. Se realizó por triplicado cada experimento para ambas muestras. Para la tensión superficial se usó un volumen de gota de 6.8 µL, mientras que para la tensión interfacial se usó un volumen de gota de 20 µL. El método empleado fue el de la gota colgante, el cual está basado en la ecuación de Laplace-Young, la cual relaciona el perfil de una gota colgante con la tensión superficial, que son el diámetro ecuatorial, el diámetro de cuello y el radio de curvatura en el ápice de la misma (Fuentes, 2001).

RESULTADOS Y DISCUSION

1. Caracterización fisicoquímica

En la tabla 1 se muestran los resultados de densidad, viscosidad cinemática y dinámica y conductividad de las dos muestras analizadas. Se puede observar que la viscosidad entre ambas muestras no cambia mucho, esto puede ser debido a que la viscosidad no se modifica sustancialmente por el calentamiento.

Tabla 1. Valores de densidad, viscosidades y conductividad para la muestra de WPC-C y WPC-HP

Muestra	Densidad (gr/cm ³)	Viscosidad cinemática (cP)	Viscosidad dinámica (cSt)	Conductividad (mS/cm)
WPC-C	1.0051	1.0913	1.0975	4.948
WPC HP	1.0057	1.0840	1.0900	2.7530

2. Propiedades espumantes

En la tabla 2 se muestran los índices de espumado y la estabilidad de las espumas, que es el tiempo al cual el 50% de la espuma desaparece. Para la muestra control se obtuvo un índice de espumado del 76.62%, mientras que para el WPC HP se obtuvo un índice de espumado de 134.25%, lo que nos indica que se formó un volumen de espuma 1.34 veces mayor al volumen inicial líquido de muestra y para la muestra de WPC control, no se llegó ni al doble del volumen del líquido.

Tabla 2. Valores de propiedades espumantes para muestra de WPC-C y WPC HP

Muestra	Índice de espumado	Estabilidad
WPC Control	76.6170%	Minuto 10
WPC HP	134.2530 %	Minuto 9

Por otra parte, en la figura 3 se puede observar que el porcentaje de espumado a través del tiempo del WPC control fue muy poco, ya que para el minuto 20 se había completado la ruptura de la espuma, mientras que en la muestra de WPC-HP se mantuvo hasta el minuto 60, que fue cuando se completó la ruptura. La estabilidad fue al minuto 10 para la WPC-C y al minuto 8 para la WPC-HP. Estos resultados indican que los péptidos tienen mejores propiedades espumantes que las proteínas nativas contenidas en la muestra control, ya que mantienen la espuma por más tiempo y forman más volumen de espuma. Estas características se le atribuyen al hecho de que los péptidos se acomodan mejor entre la interfase de la burbuja, estabilizándola, ya que sus partes hidrofóbicas se colocan al interior de la burbuja y las partes hidrofílicas se ubican hacia el exterior de la burbuja, y las proteínas pueden tener ciertos impedimentos estéricos que no ayudan a que se acomoden sus aminoácidos hidrofóbicos o hidrofílicos entre la interfase.

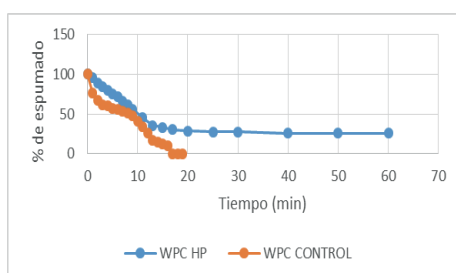


Figura 1. Gráfica del promedio del porcentaje de espumado en función del tiempo para WPC-C y WPC-HP-.

3. Emulsiones

Se realizaron experimentos para ambas muestras, los valores $D_v 10$, $D_v 50$, $D_v 90$ indican las esferas del mismo volumen que se encuentran presentes en la muestra analizada. Y los valores de $D(3,2)$ son medida del momento del área superficial, que es el diámetro medio “Sauter” y los $D(4,3)$ son una medida del momento del volumen o masa o el diámetro medio “de Brouckere”. Estas fórmulas indican sobre qué punto central de la frecuencia (en superficie o volumen) podría rotar la distribución. La fórmula no contiene el número de partículas y por tanto los cálculos de las medias y distribuciones no requieren el conocimiento del número de partículas de la muestra. La tecnología de difracción láser calcula inicialmente una distribución basada en términos de volumen y ésta es la razón por la que el valor $D(4,3)$ está reportado de una manera un poco especial a través de volúmenes relativos. Se observa a simple vista que hay más partículas de tamaño mayor en la muestra de WPC HP, lo cual puede ser debido a que no se realizó correctamente la hidrólisis y/o purificación de la muestra, o que los péptidos obtenidos no son capaces de estabilizar las emulsiones, por lo que los resultados no son los esperados.

Tabla 3. Valores promedio de tamaño de gota obtenido en las muestras de WPC-C Y WPC HP

Tamaño de gota			
Parámetro		WPC-C	WPC HP
Dv 10 (µm)	Valor	1.6667	2.58
	desviación	0.28	0.01
Dv 50 (µm)	Valor	11.3	23.2667
	desviación	0.1732	0.0577
Dv 90 (µm)	Valor	21.133	41.3
	desviación	1.3317	0.1
D [3,2]	Valor	4.7733	4.7733
	desviación	0.6553	0.0252
D [4,3]	Valor	11.5	23.2667
	desviación	0.4359	0.0577

4. Tensión interfacial y superficial

Se midió la tensión interfacial y superficial de ambas muestras. Se tiene registrado en la literatura que la tensión superficial del agua es de 72 mN/m, por lo que se observa notoriamente que los péptidos tienen propiedades tensoactivas ya que disminuyeron la tensión superficial, tanto en la muestra de WPC-C y en la muestra de WPC-HP. Sin embargo, se esperaba que la muestra de péptidos disminuyera la tensión superficial más que la muestra control, pero en los resultados se obtuvo lo contrario. Esto pudo ser debido a que la muestra tal vez no fue hidrolizada correctamente o por completo, llevando a un contenido bajo en péptidos, por lo que la tensión no se ve afectada en gran medida. Los valores de tensión interfacial difieren de los de tensión superficial en el hecho de que la tensión interfacial es la que se encuentra entre dos fases líquidas y en la tensión superficial es la que se encuentra entre una fase líquida y el aire.

Tabla 4. Valores de tensión superficial e interfacial para muestras de WPC-C y WPC HP

Muestra	Tensión superficial (mN/m)		Tensión interfacial (mN/m)	
	valor	desviación	valor	desviación
WPC-C	49.4667	0.032145503	11.9200	0.248797106
WPC-HP	50.3633	0.141421356	15.4467	0.025166115

CONCLUSIONES

Se cumplió el primer objetivo de proyecto, el cual era llevar a cabo la hidrólisis enzimática de las proteínas de suero de leche con el fin de obtener péptidos con propiedades tensoactivas. Esta hidrólisis fue llevada a cabo por la pepsina, después de la purificación previa de la proteína que se encontraba en el concentrado.

El segundo objetivo también se cumplió exitosamente, el cual era evaluar las propiedades funcionales e interfaciales de los hidrolizados obtenidos. Las propiedades medidas fueron el índice de espumado, el porcentaje de espumado, la estabilidad de las espumas, el tamaño de partícula en emulsiones y la tensión interfacial y superficial de las muestras purificadas. Este objetivo fue realizado para la solución control y para la solución de WPC HP al 3%, en donde se observó que la solución con péptidos resultó estable en un periodo de tiempo mayor a comparación de la solución control, que contenía las proteínas en su estructura nativa. Sin embargo, por errores prácticos, se obtuvo que la muestra de WPC HP no disminuía tanto la tensión superficial e interfacial como la muestra de WPC Control.

BIBLIOGRAFIA

- Díaz, D. (2010). Comportamiento y evaluación de las proteínas de la leche frente al tratamiento térmico y pH. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima.
- Dickinson, E. (1994). Progress and trends in rheology, IV, Gallegos C (ed) Steinkopff, Darmstadt.
- Fuentes, J., López de Ramos, A. (2001). “Nuevo método para medir la tensión superficial mediante la técnica de la gota colgante” en Centro de información tecnológica, Num 2, Vol. XII, Enero-Diciembre, [pp. 181-188].
- Macías, M. (2017). Componentes y propiedades de los alimentos. Universidad Autónoma de Aguascalientes. México.
- Ruiz, J., del Valle, M. (1987). “Agentes tensioactivos como aditivos alimentarios” en Instituto de la Grasa y sus derivados. Num 1, Vol 38, [pp. 45-55]

CELULASAS DE ORIGEN MICROBIANO

Melanie Lizbeth Ruvalcaba Villagrán.¹ y Morales Jiménez Jesús Israel.²

RESUMEN

El presente trabajo investiga la producción de celulasas por los hongos endófitos de muérdagos americanos. Los hongos endófitos se aislaron en agar PDA a partir de hojas sanas de *Phoradendron longifolium* y *P. velutinum*. La capacidad para producir celulasas de los hongos endófitos se realizó de manera cualitativa en placas de agar con carboximetilcelulosa teñidas con Rojo Congo. Los hongos que dieron positivo el ensayo cualitativo fueron cultivados en medio líquido para obtener el extracto enzimático. La cuantificación de la actividad enzimática de los extractos se determinó por el método de Miller. Los hongos H2SA2, PC3R6 y PC3R12 tuvieron una actividad de 0.01640, 0.06037 y 0.02718 UI.

ABSTRACT

This work investigates the production of cellulases by the endophytic fungi of American mistletoes. Endophytic fungi were isolated on PDA agar from healthy leaves of *Phoradendron longifolium* and *P. velutinum*. The ability to produce cellulases of endophyte fungi was performed qualitatively on carboxymethylcellulose agar plates stained with Congo Red. The positive fungal strains in the qualitative test were cultivated in liquid medium to obtain the enzymatic extracts. The enzymatic activity of the extracts was determined by the Miller method. The fungi H2SA2, PC3R6 and PC3R12 had an activity of 0.01640, 0.06037 and 0.02718 IU.

Palabras Clave: *Phoradendron longifolium*, *P. velutinum*, hongos endófitos, celulasas.

INTRODUCCIÓN

Los hongos endófitos habitan en los tejidos de las plantas sin causar síntomas de enfermedad aparente durante casi todo su ciclo de vida [1] y se localizan en los espacios intercelulares de los tejidos vegetales [2]. Se han aislado de diferentes órganos de las plantas y un diverso rango de huéspedes, incluyendo algas, briofitos, pteridofitos, gimnospermas y angiospermas. La mayoría de los hongos endófitos pertenecen al phylum Ascomycota, aunque también se han encontrado organismos pertenecientes a los phyla Basidiomycota, Zygomycota y Oomycota [3]. La estrecha relación que existe entre el hongo endófito y su planta hospedera se considera de gran importancia, ya que el hongo es capaz de producir metabolitos secundarios por su interacción con su planta hospedera y con otros endófitos. A medida que se han ido descubriendo nuevos productos naturales, el interés por los hongos endófitos ha ido en aumento, ya que estos microorganismos pueden convertirse en una fuente sostenible de dichos compuestos. La producción a gran escala de metabolitos secundarios a partir de microorganismos es más fácil y económica que su obtención por otros métodos o a partir de otras fuentes que los produzcan. El interés de explorar a los endófitos se debe a la diversidad química y biológica que cabe esperar y por el número de especies que podrían quedar por descubrir.

Las enzimas son consideradas de gran importancia no sólo en el sentido biológico, sino también por sus importantes aplicaciones en campos científicos e industriales. Por ello los investigadores se han centrado en el aislamiento de cepas microbianas que producen grandes cantidades de enzimas. A lo largo de la historia se han venido empleando las enzimas para usos industriales, una de las enzimas comúnmente utilizadas es la celulasa. Las celulasas y xilanasas son enzimas hidrolíticas que participan en el rompimiento de los enlaces glicosídicos β -1,4 presentes en los polisacáridos de la celulosa y hemicelulosa, respectivamente. El interés por las celulasas empezó alrededor de los años 50 debido a su enorme potencial para convertir la lignocelulosa en glucosa y azúcares solubles. [5]. La búsqueda de microorganismos productores de las enzimas celulolíticas es de gran importancia para desarrollo de nuevas tecnologías que implica el uso de celulosa como materia prima a tratar [6]. Para la determinación de enzimas se realizan ensayos enzimáticos fiables con cuantificación de azúcares reductores por el método de DNS. Este procedimiento se fundamenta en la reacción de los grupos reductores de los azúcares con el reactivo oxidante ácido dinitrosalicílico (DNS). El reactivo consiste en una disolución formada por los siguientes compuestos: ácido dinitrosalicílico (ácido 2-hidroxi-3,5-dinitrobenzónico), que actúa como oxidante; Sal de Rochelle (tartrato sódico-potásico), que impide la disolución de oxígeno en el reactivo e hidróxido sódico, que aporta el medio requerido para que se produzca la reacción redox. De esta forma, el ácido 2-hidroxi-3,5-dinitrobenzónico se reduce, en presencia del grupo reductor de la glucosa, formando el ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, mientras que el grupo aldehído reductor se oxida, para formar un grupo carboxílico. En este método analítico el DNS está en exceso frente a los grupos reductores y en todas las muestras se adiciona la misma cantidad, de tal forma que mayores concentraciones de azúcares reductores provocan una mayor coloración de la muestra. Estas diferencias de coloración pueden determinarse por espectrofotometría de luz visible, a la longitud de onda de máxima absorbancia de 540 nm.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico

Los muérdagos se colectaron de dos zonas de la Sierra de Álvarez, San Luis Potosí. *P. longifolium* se colectó en las coordenadas geográficas latitud 22°2' N y longitud 100°33' O y *P. velutinum* se tomó en latitud 22°4' N y longitud 100°38' O. De los muérdagos se tomaron hojas sanas, sin sintomatología de enfermedades causadas por hongos y se reunieron vástagos de cada muestra que fueron tomados al azar. El material vegetal

¹Instituto Tecnológico Superior de Purísima del Rincón, Ing. Bioquímica, Blvd. Del Valle #2301, Guardarrayas, C.P: 36413, Purísima del Rincón, Guanajuato, meel-ruvalcaba27@hotmail.com

²Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, Biología Molecular, Camino a la presa San Jose #2055 Lomas 4ª. Sección, C.P: 78216, San Luis Potosí, San Luis Potosí, jesus.morales@ipicyt.edu.mx

se colocó en bolsas ziploc y se conservó a 4°C hasta su procesamiento en el laboratorio dentro de las 24 h siguientes.

Aislamiento de hongos endófitos.

La desinfección superficial de las hojas se realizó por inmersión consecutiva durante 1 min en hipoclorito de sodio 10%, 1 min en etanol al 70% (v/v) y cinco lavados de 1 min cada uno con agua destilada estéril. La efectividad del proceso se comprobó mediante la inoculación de 100µL de agua sobrante del último lavado en una caja con agar papa dextrosa (PDA). Después, las hojas se cortaron en secciones pequeñas (1-3 mm²) entre la nervadura central y el borde de la hoja y se colocaron en cajas con PDA. En cada caja se colocaron 10 fragmentos de hoja por triplicado. Las cajas se incubaron a 28 °C durante 5-7 días. Cada colonia de hongos se transfirió a medio fresco para tener cultivos axénicos.

Ensayo cualitativo de actividad de celulasa.

La actividad de celulasa en placa se midió en medio CMC (9g levadura Extracto; 0,4g K₂HPO₄; 0,001g ZnSO₄ 7H₂O; 0,6g KH₂PO₄ ; 0,05g FeSO₄ 7H₂O; 0,05g MnSO₄ H₂O; 0,5 g MgSO₄ 7H₂O; 10g Carboximetilcelulosa; en g / L), (Téllez-Téllez et al. 2008). Las placas se inocularon y se incubaron a 28 °C durante 5 a 7 días. La actividad de celulasa se reveló con Rojo Congo al 0.2%. Las cajas se tiñeron durante 30 min a temperatura ambiente y el exceso de colorante se eliminó con NaCl 1 M. La actividad de celulasa se observa como un halo transparente o amarillo alrededor de la colonia.

Obtención de extracto enzimático (EE)

Matraces de 250mL con medio CMC líquido se inocularon con los hongos con un mayor halo de actividad de celulasa y se incubaron por 7 días a 28°C en agitación constante a 120. Después del periodo de incubación los cultivos se colocaron en tubos falcón de 50 mL y se centrifugaron a 10,000g por 10 min a 4°C. Finalmente el sobrenadante (EE) se separó de la biomasa.

Determinación de azúcares reductores por el método DNS

Para evaluar la actividad enzimática celulolítica del EE se cuantificaron los azúcares reductores liberados por los extractos fúngicos utilizando el método DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) (Miller 1959). Las mezclas de reacción contenían 475µl de sustrato y 25µL de EE, 250µl de sustrato y 250µL de EE y 400µl de sustrato y 100µL de EE. Las reacciones se realizaron en tubos eppendorf de 1.5mL y se incubaron en un baño de agua caliente en un equipo Heating Bath B-100 a 50 °C por 1 h y por 24 h. Posteriormente, los tubos eppendorf fueron colocados en hielo. La determinación de los azúcares reductores se realizó con 50µl de la mezcla de reacción y 150µl de reactivo de DNS. Las reacciones de DNS se incubaron en un termociclador Veriti durante 10 minutos a 95°C. Una curva patrón de Glucosa desde 50µg/mL hasta 1000µg/mL se realizó para interpolar las lecturas de las reacciones de DNS. La absorbancia de las reacciones de DNS se leyeron a 540nm en un espectrofotómetro para microplacas BIORAD Benchmark Plus.

Cuantificación de proteína

El contenido proteico de los extractos enzimáticos de los hongos endófitos se cuantificó por el método de Bradford modificado a 595nm (Zor y Selinger, 1996).

RESULTADOS

Hongos endófitos

Un total de 10 cepas de hongos endófitos fueron aisladas de las especies de muérdago estudiadas. A partir de hojas de *Phoradendron longifolium* se aislaron 8 cepas (PL3H1, PL3H2, PL3H3, PL3H4, PL3H5, PL3H7, PL3H9 y PL3H10) y de *Phoradendron velutinum* se aislaron 2 cepas (PV3H2 y PV3H4).

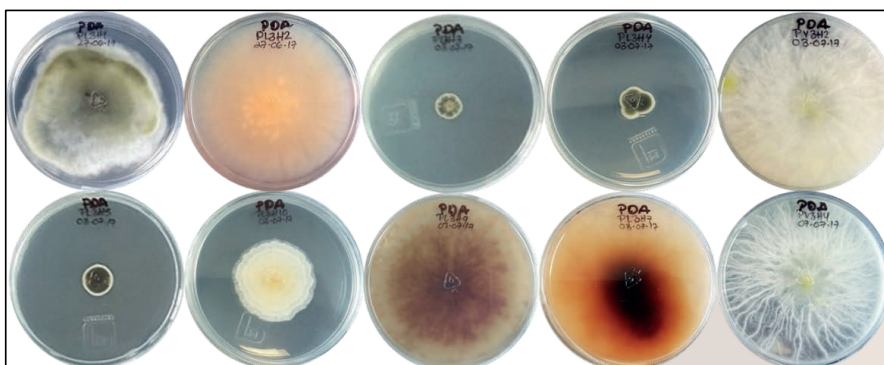


Figura 1. Cepas de hongos endófitos aislados de *Phoradendron longifolium* y *Phoradendron velutinum*.

Ensayo de actividad enzimática

A partir de una colección de cepas de hongos endófitos de *Phoradendron velutinum* se detectó que la cepa HIVM1 de *Epicoccum* sp. Presento actividad celulolítica en medio de CMC teñido con Rojo Congo. De la misma manera, 4 cepas asociadas a *Psittacanthus calyculatus* (PC3CH5, PC3R12, PC3R7, PC3R6) presentaron actividad. También, la cepa HISA2 aislada a partir de hojas de *Salvia amarissima* presento actividad celulolítica. A partir de la rizosfera de encino se aislaron 4 cepas fúngicas y 2 (Rea Y Reß) de ellas degradaron la celulosa. La Figura 2. Muestra la actividad celulolítica de las cepas fúngicas visualizada por medio de un halo de hidrólisis de color amarillo-transparente alrededor de la colonia.

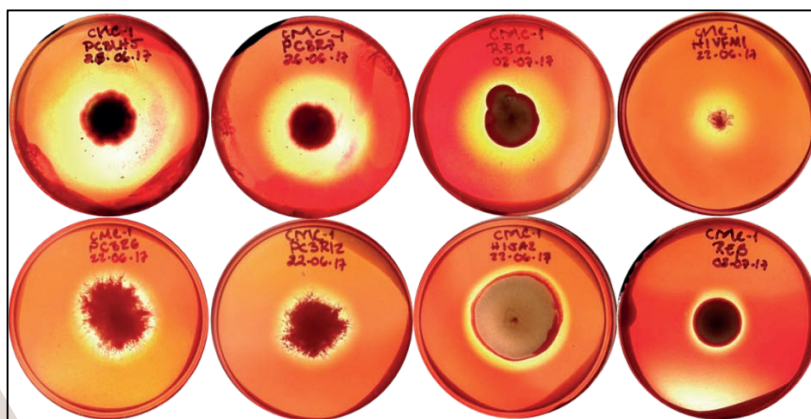


Figura 2. Actividad Celulolítica de microorganismo fúngicos.

Actividad enzimática

Los hongos H2SA2, PC3R6 y PC3R12 tuvieron una actividad de celulasa de 0.01640, 0.06037 y 0.02718 UI. Una unidad internacional (UI) se define como la cantidad de enzima en mg necesaria para producir un μmol de glucosa por minuto.

CONCLUSIONES

Mediante pruebas cualitativas y cuantitativas se logró comprobar que existen hongos endófitos de muérdagos con actividad celulolítica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kusari S., Hertweck C., Spiteller M. (2012). *Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites*. Chem Biol. 19: pp 792-798.
2. Strobel G. y Daisy B. (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. Microbiol Mol Biol R. 67 (4): pp 491-502.
3. Rosa L.H. et al (2011). Drug Development, Acase study based insight into modern strategies. Ed. Rundfeldt, C. pp 1-18
4. Ramírez, P. y Coha, J. "Degradación de celulosa por actinomicetos termófilos: aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celulolítica". Rev. Peru. biol.1. (1):67-77(2003).
5. Ponce, T. y Pérez, O. (2002) "Celulasas y xilanasas en la industria", Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Cinvestav.
6. Sinicin A.P; Chernoglasov V.M; Gisakov A.B (1993) Métodos de estudio y propiedades de las enzimas celulolíticas. Moscú, 150 pp
7. T.K. Ghose. Measurement of cellulase activities, 1987.
8. Anamaria Negrulescu, Viorica Patrulea, Manuela M. Mincea, Cosmin Ionascu, Beatrice Vlad-Oros, Vasile Ostafe (2012) "Adapting the Reducing Sugars Method with Dinitrosalicylic Acid to Microtiter Plates and Microwave Heating".

AMPLIFICACIÓN DE UN FRAGMENTO DEL GEN DE LA FOSFOLIPASA A1 EN TEOCINTE

Juan Carlos Rivera Navarro¹ y Rubén Rellán Álvarez²

RESUMEN

Se realizó un muestreo de diversas plantas de teocinte durante sus etapas iniciales de crecimiento de un campo de cultivo experimental, cuyas muestras se procesaron para amplificar un fragmento del ADN genómico. Los experimentos estuvieron encaminados a la amplificación de dos fragmentos de un gen del cromosoma 3 que codifica para una fosfolipasa A1, para determinar el material de estudio de interés para secuenciar. Se realizaron PCRs con distintas polimerasas en muestras de ADN extraído, utilizando oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia mismo gen en el maíz B73. Se encontró que el fragmento de interés solo se amplifica con polimerasas de baja fidelidad, las mismas muestras tratadas con polimerasas de alta fidelidad no amplifican fragmento alguno del ADN de teocinte.

ABSTRACT

A number of teocinte plants were sampled during their initial stages of growth of an experimental crop field, whose samples were processed to amplify a fragment of genomic DNA. The experiments were directed to the amplification of two fragments of a chromosome 3 gene encoding a phospholipase A1, to determine the study material of interest for sequencing. PCRs with different polymerases were performed on extracted DNA samples, using oligonucleotides designed from the same gene sequence in B73 maize. It was found that the fragment of interest is only amplified with low fidelity polymerases, the same samples treated with high fidelity polymerases do not amplify any fragment of teocinte DNA.

Palabras Clave: Lipasa, amplificación, teocinte.

INTRODUCCIÓN

Una de las características más importantes del teocinte es su alta similitud con las especies del maíz ya que se le considera un antepasado o la especie de la cual derivó la diversificación genética en el maíz; se creó que la domesticación de esta especie ocurrió hace aproximadamente 10 000 años a partir del teocinte anual *Zea mays ssp. Parviglumis*, mediante un evento individual en la región de la Cuenca del Balsas (Matsuoka, et al., 2002; Doebley, 2004; Ruiz, et al. 2011), el cual se diversificó y dio lugar a la adaptación de nuevas especies, ya que las condiciones ambientales de México varían mucho entre sí; la heterogeneidad ambiental promueve el incremento de la diversidad genética intraespecífica (Linhart y Grant, 1996; Ruiz, et al. 2011).

Sin embargo no toda la diversidad del teocinte fue pasada al maíz, debido a que el habitante de Mesoamérica recurrió y recurre hasta nuestros días al retrocruzamiento del domesticando con el teocinte local, como parte de su proceso de dispersión y adaptación en Mesoamérica (Wellhausen, 1952; Wilkes, 1977; Benz et al., 1990; Fernández, 2011).

Las regiones tropicales son únicas en diversidad de formas complejas en áreas relativamente pequeñas y contiguas, esto hace que exista mayor segregación, expresión genética, adaptaciones específicas, alta variabilidad y rapidez en el hallazgo de formas nuevas (Cardona, 2010).

La clasificación de los ambientes de cultivo indicando el área y características requeridas por el germoplasma es indispensable para cultivar exitosamente el maíz, de ahí radica la importancia del estudio de la adaptación de las variedades del maíz; los genotipos del maíz se clasifican en tropicales de tierras bajas, subtropicales de tierras bajas y de media altitud y tropicales de tierras altas (Paiwal, 2001).

El metabolismo de glicerolípidos es una forma de adaptación de las plantas que emplean cuando ocurren cambios en el ambiente: Uno de los mecanismos más comunes de las plantas es la desaturación de glicerolípidos para compensar el decremento en la fluidez de la membrana (Williams et al., 1988; Weltietal., 2002; Tassevaetal., 2004; Szymanski et al. (2014), que se ha observado en especies de plantas tolerantes a zonas frías (Szymanski et al., 2014).

Uno de los rasgos determinantes de adaptación genotípica es la presencia de la fosfolipasa A1 del cloroplasto cuya función es desacilar la molécula de TAG (Matos and Pham-Thi, 2009), que en éste caso es fosfatidilcolina.

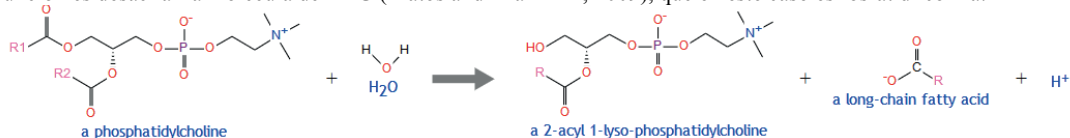


Figura1. Se muestra la reacción que cataliza la fosfolipasa A1 (3.1.1.32.) en la ruta metabólica del maíz para procesar la fosfatidilcolina.

En el genoma del maíz ésta enzima está codificada en el gen GRMZM2G353444, de cuya secuencia de diseñaron 6 pares de oliganucleótidos para estudiarlo en fragmentos.

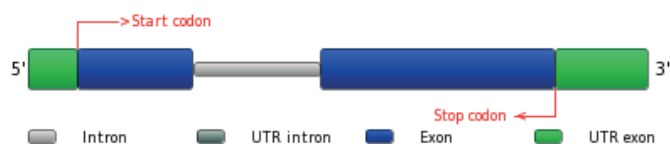


Figura2. Se muestra un diagrama del gen GRMZM2G353444 que codifica para la lipasa.

Con fines de generar nuevo material para analizar en el laboratorio, se determinó que el fragmento que se debía secuenciar era el número 5 de los 6 que incluyen la región UTR. Sin embargo los experimentos demostraron que los primers 5 forward y reverse eran inespecíficos; en la electroforesis habían bandas diferentes a la esperada, que correspondían a los fragmentos de ADN amplificados debido a la similitud de la secuencia de los oligonucleótidos con otras lipasas codificadas del mismo genoma.

Así que se optó por utilizar el oligonucleótido 5 forward y 6 Reverse para aumentar la selectividad: el oligonucleótido 6 Reverse se aparea con las bases de la región '5 UTR, cuya secuencia es específica de la lipasa del cromosoma 3, y posteriormente, secuenciar únicamente el fragmento 5. Por lo tanto el fragmento 5 de 734pb y el 6 con 774 se juntaron para amplificar uno de 1508 pb.

MÉTODOS Y MATERIALES

Se muestrearon los primeros 100 especímenes de teocinte durante sus etapas iniciales de crecimiento, de las cuales se analizaron las primeras 17, su altura oscilaba entre los 15 y 30 cm. Éstas se encontraban plantadas en un campo de cultivo experimental dentro de las instalaciones del CINVESTAV Irapuato, cuya nomenclatura se les otorgó antes de iniciar el proyecto. Se utilizó un sacabocado para la recolección de tejido vegetal que se almacenaron en nitrógeno líquido; tres círculos por cada planta en tubos eppendorf de 2 ml. Con un Mixer Mill MM 301 Retsch® se pulverizaron las muestras a 30 Hzs por 30 segundos.

Siguiendo el protocolo de Edward K., et al 1991, se extrajo el ADN, resuspendido en 50 µl de agua inyectable. Para realizar la PCR se utilizaron oligonucleótidos T4 Oligo® sintetizados a partir de la secuencia del gen GRMZM2G353444 de la especie de maíz B73, y cuatro enzimas polimerasas diferentes: kapa biosystem® KAPA taq, Thermo Scientific® pfu, New England Biolabs, Thermo Scientific® Phusion High Fidelity e Invitrogen® Platinum Taq High Fidelity.

En todas las amplificaciones realizadas se utilizó una solución de Betaina 5M y DMSO al 100%, adicionales a los reactivos sugeridos por los fabricantes para cada polimerasa, para tener una concentración de 0.5 M y 4% respectivamente en cada tubo para PCR. Se programó la termocicladora con las condiciones y tiempos requeridos por cada polimerasa.

RESULTADOS

Antes de determinar la estrategia de amplificar el fragmento 5 y 6, se probó el ADN de las muestras realizando la PCR de ambos fragmentos por separado como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. El número seguido por una F mayúscula representa el fragmento amplificado en cada muestra. El color verde representa una electroforesis exitosa, es decir que se observó una banda de 1500 pb, el amarillo bandas tenues, poco visibles y el rojo a ninguna banda observada.

Muestra de teocinte	Polimerasa					
	Kapa	Kapa	Pfu	Platinum	Phusion	Phusion
RS17-6001	Sin planta					
RS17-6002						
RS17-6003	F 6	F 6	F 5	-	-	-
RS17-6004	F 6	F 6	F 5	-	-	-
RS17-6005	F 6	F 6	F 5	-	-	-
RS17-6006	F 6	F 6	F 5	-	-	-
RS17-6007	F 6	F 6	F 5	-	-	-
RS17-6008	F 5-6	-	F 5-6	-	F 5-6	-
RS17-6009	F 5-6	-	-	F 5-6	F 5-6	F 5-6
RS17-6010	Sin planta					
RS17-6011	F 5-6	-	F 5-6	-	F 5-6	-
RS17-6012	F 5-6	-	F 5-6	-	F 5-6	-
RS17-6013	F 5-6	-	F 5-6	-	F 5-6	-
RS17-6014	F 5-6	-	F 5-6	-	F 5-6	-
RS17-6015	F 5-6	-	F 5-6	-	F 5-6	-
RS17-6016	F 5-6	-	-	F 5-6	F 5-6	F 5-6
RS17-6017	F 5-6	-	-	F 5-6	F 5-6	F 5-6
RS17-6018	F 5-6	-	-	F 5-6	F 5-6	F 5-6
RS17-6019	F 5-6	-	-	F 5-6	F 5-6	F 5-6
RS17-6020	F 5-6	-	-	F 5-6	F 5-6	F 5-6

En general se observaron las bandas en la electroforesis cuando se utilizó la kapa polimerasa, que no se observaron al utilizar el mismo ADN pero con una polimerasa de alta fidelidad.

Probablemente esto ocurrió debido a que los oligonucleótidos utilizados fueron diseñados en base a la secuencia del maíz B73, específicamente en la región de la secuencia pudo ser diferente a la del teocinte. Por ejemplo en los experimentos de Doebley et al., 1985 se evaluaron mediante isozimas, una muestra de la biodiversidad en 23 loci de 34 razas nativas de maíz mexicano, donde el número promedio de alelos por locus fue 7, con variación de 3 a 18 (Fernández, a. t. et al. 2011), es decir que es un fenómeno bastante frecuente que haya diferencia en la secuencia del gen que codifica para la misma proteína en distintas razas.

Se cree que el alineamiento de los primers fue menos exigente para las polimerasas de baja fidelidad, por lo que fue posible observar las bandas de 1508 pb del fragmento 5 y 6, que en las polimerasas de alta fidelidad el proceso fue

más selectivo y no fue posible amplificar el mismo fragmento, es decir que las bases de los oligonucleótidos no pudieron aparearse por la diferencia de algún nucleótido en la secuencia.

CONCLUSIONES

La amplificación del fragmento 5 y 6 del gen que codifica para la lipasa tipo A1 del cromosoma 3, presente en cloroplasto no puede realizarse con polimerasas de alta fidelidad, por lo tanto los productos de PCR amplificados exitosamente no son adecuados para secuenciar, ya que se realizaron con kapa polimerasa. Existe la posibilidad de que los fragmentos tengan errores de transcripción, la secuenciación deberá realizarse con los productos de PCR obtenidos con polimerasas de alta fidelidad, como la phusion.

No se pudo generar el material de estudio para la secuenciación del fragmento 5, por lo que se deberán realizar estudios para determinar la causa de los resultados negativos con las polimerasas de alta fidelidad, puede ser el caso de diseñar nuevos oligonucleótidos o modificar las condiciones y concentraciones de los reactivos propuestos para la amplificación.

BIBLIOGRAFIA

CARDONA J. O. (2010). “Análisis de diversidad genética de las razas colombianas de maíz a partir de datos Roberts et al., (1957) usando la estrategia Ward-MLM” en *CienciAgro*, Núm. 1, Vol. 2, [pp. 199-207].

EDWARDS, K. et al. (1991). “A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis” en *Nucleic Acids Research*, Núm. 6, Vol. 19. Enero, [pp. 1349].

FERNÁNDEZ, A. T. et al. (2011). “Diferencias entre el mejoramiento genético clásico del maíz y el mejoramiento por ingeniería genética” en *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, Núm. 6, Vol. 2, Noviembre - Diciembre, [pp. 955-969].

MATOS A. R., PHAM-THI, A. T. (2009). “Lipid deacylating enzymes in plants: Old activities, new genes” en *Plant Physiology and Biochemistry*, Núm. 47, [pp. 491-503].

PAIWAL R. L. and FAO (2001). *El Maíz en los trópicos: mejoramiento y producción*, Roma: Food & Agriculture Org. Editorial

RUIZ, C. J A. et al. (2011). “Razas mexicanas de maíz como fuente de germoplasma para la adaptación al cambio climático” en *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, Núm. 2, Septiembre-Octubre, [pp. 365-379].

SZYMANSKI J. et al. (2014). “Linking Gene Expression and Membrane Lipid Composition of Arabidopsis” en *The Plant Cell*, Vol. 26, March, [pp. 915-928].

CARACTERIZACIÓN DE LA PERMEABILIDAD INTESTINAL DE CRÍAS LACTANTES CARENTES DEL RECEPTOR DE PROLACTINA PROVENIENTES DE MADRES ALIMENTADAS CON UNA DIETA ALTA EN GRASAS

Sandra Leticia González López¹, Ericka A. de los Ríos² y Yazmín Macotela Guzmán²

RESUMEN

La obesidad materna durante la lactancia afecta la producción y la composición de la leche, lo que tiene consecuencias metabólicas en su progenie, como el desarrollo de resistencia a la insulina. Se ha relacionado a la obesidad con un estado de inflamación crónica que condiciona el desarrollo de resistencia a la insulina. Por otra parte, se ha reportado que la prolactina, hormona reguladora de la lactancia, favorece la sensibilidad a la insulina. Recientemente se encontró que el consumo de una dieta alta en grasas por madres lactantes aumenta la permeabilidad intestinal de las crías y favorece resistencia a la insulina mientras que la administración de prolactina en crías de madres alimentadas con este tipo de dietas aminora o previene dichos efectos. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue analizar las características histológicas del intestino de crías del ratón carente del receptor de prolactina para evaluar el papel de la PRL sobre la permeabilidad intestinal como mecanismo protector contra el desarrollo de resistencia a la insulina derivada del consumo materno de una dieta alta en grasas. Se encontraron diferencias histológicas asociadas a cambios de la permeabilidad entre cada porción intestinal.

ABSTRACT

Maternal obesity during lactation alters breast milk production and composition, leading to metabolic alterations in their progeny, like the development of insulin resistance. Obesity has been related to a state of chronic inflammation that conditions the development of insulin resistance. On the other hand, it has been reported that prolactin, the hormone that regulates lactation, promotes insulin sensitivity in obesity conditions. It was recently discovered that the consumption of a high fat diet by lactating mothers increases the intestinal permeability of the offspring and promotes insulin resistance, whereas the administration of prolactin in the offspring of mothers fed with this type of diet prevents or ameliorates those effects. Thus, the aim of this study was to analyze the histological characteristics of the intestine of lactating mice null for the prolactin receptors to evaluate the role of prolactin in intestinal permeability as a protective mechanism against the development of insulin resistance derived from the maternal consumption of a high fat diet. Histological differences related with changes in intestinal permeability were found between each intestinal portion.

Palabras clave: prolactina, obesidad, lactancia, permeabilidad intestinal, receptor de prolactina.

INTRODUCCIÓN

El rápido aumento en la prevalencia de obesidad a nivel mundial y su asociación con el desarrollo de múltiples complicaciones, tales como diabetes, enfermedades cardiovasculares, hígado graso, cáncer, entre otras, han vuelto a esta condición un problema de salud pública. La obesidad y sus consecuencias afectan a todos los sectores de la población, pero su presentación en etapas críticas del desarrollo, como en la lactancia, es un asunto de especial interés por la relevancia de sus implicaciones en la progenie. Los efectos de la obesidad materna en la lactancia se relacionan con un retardo en su inicio, intensidad y duración, afectando el propio desempeño de la lactancia; además de alteraciones en la composición de la leche materna, tales como un mayor contenido de ácidos grasos saturados de cadena larga y de carbohidratos, lo que entre otros efectos produce mayor ganancia de peso en el lactante (Turksin, Bel, Galjaard y Devlieger, 2014; Rolls, Gurr, Duijvenvoorde, Rolls y Rowe, 1986; Del Prado, Delgado y Villalpando, 1997). Por lo cual, un estado nutricional de características obesogénicas en la mujer en período de lactancia provoca cambios en la composición de la leche que idealmente debería proporcionar los nutrientes necesarios para el adecuado desarrollo del menor, produciendo un impacto adverso en la salud metabólica del infante.

El impacto de la nutrición materna sobre el lactante se ha demostrado incluso a largo plazo. Algunos trabajos muestran que la descendencia de madres con obesidad, diabetes e hiperglicemia tiene predisposición a presentar obesidad, síndrome metabólico y otras complicaciones derivadas de la obesidad en la vida adulta (Vogt *et al.* 2014). Para poder evaluar los efectos de la dieta de la madre durante la lactancia sobre la función metabólica de su progenie de manera independiente a las condiciones del embarazo, es útil el empleo de modelos animales. En roedores, una alimentación materna alta en grasas en período de lactancia provoca en las crías mayor ganancia de peso, incremento de los niveles séricos de triglicéridos y leptina, disminución de adiponectina, hiperinsulinemia e intolerancia a la glucosa (Masuyama e Hiramatsu, 2014; Vogt *et al.*, 2014).

El consumo de dietas altas en grasa, así como la propia obesidad se han vinculado con alteraciones en la microbiota intestinal y a un deterioro en la función de barrera del intestino que conlleva a un aumento en la permeabilidad intestinal. En conjunto, estas dos situaciones permiten la translocación de bacterias y endotoxinas a la circulación lo que produce una endotoxemia metabólica, es decir, un estado de inflamación crónico característico de la obesidad. (Shen, Obin y Zhao, 2014; Carvalho y Saad, 2012; He, Shan y Song, 2015). Esta inflamación produce un daño en las células beta del páncreas y un aumento en las citocinas circulantes lo que provoca resistencia a la insulina (Kort, Keszthelyi y Masclee, 2011). Para contrarrestar esta alteración metabólica se ha sugerido corregir el desequilibrio bacteriano y la alteración de la permeabilidad intestinal (Carvalho *et al.*, 2012; He *et al.*, 2015).

La prolactina (PRL) es la principal hormona reguladora de la lactancia, estimula la producción de leche y regula la composición de la misma (Méndez, Cariño y Díaz, 2005), además ejerce efectos sobre el metabolismo. Por ejemplo, en modelos animales la PRL promueve la sensibilidad hepática a la insulina y tanto en animales como en humanos, estimula la secreción de insulina por las células beta pancreáticas (Freemark *et al.*, 2002; Yu, 2013). Asimismo, se

han encontrado niveles bajos de PRL en asociación con alteraciones metabólicas, como resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, síndrome metabólico y diabetes mellitus tipo 2 (Chirico *et al.*, 2013; Balbach *et al.*, 2013; Wagner *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2013). Además, la deficiencia del receptor de PRL (rPRL) en ratones C57BL/6 exacerba el desarrollo de alteraciones metabólicas derivadas de una alimentación alta en grasas y el tratamiento con PRL contrarresta la resistencia a la insulina en ratas con obesidad (Ruiz *et al.*, 2017). En nuestro laboratorio se encontró recientemente que la PRL promueve la sensibilidad a la insulina y reduce la permeabilidad intestinal en crías de madres alimentadas con una dieta alta en grasas (De los Ríos *et al.*, en preparación); sin embargo, se desconoce el mecanismo implicado.

La presencia de receptores para prolactina en todas las porciones del intestino delgado y en el colon apoyan que esta hormona tiene un efecto sobre la función intestinal (García *et al.*, 1996), por ejemplo, se ha demostrado que la PRL aumenta la permeabilidad intestinal, particularmente a iones como el calcio (Ajibade *et al.*, 2010). Considerando que una alimentación materna obesogénica provoca alteraciones metabólicas en las crías lactantes, que los bajos niveles de PRL y de su receptor favorece el desarrollo de resistencia a la insulina y que la administración de PRL contrarresta esta alteración, sugiriendo una asociación con la reducción en la permeabilidad intestinal, se planteó caracterizar cuáles son los efectos de la deficiencia del rPRL sobre la permeabilidad intestinal de crías lactantes provenientes de madres alimentadas con una dieta alta en grasas durante la lactancia. Para ello, en este experimento se evaluó la histología intestinal de ratones nulos para el receptor de prolactina (*Prlr* ^{-/-}) alimentados con leche proveniente de madres sometidas a un reto obesogénico.

MÉTODOS Y MATERIALES

Procedimiento experimental en ratones. Se emplearon ratones de la cepa C57BL/6 PRL (*Prlr* ^{+/+}) procedentes de siete camadas. Para ello, ratones hembra heterocigotas (*Prlr* ^{+/-}) se cruzaron con ratones macho silvestres (wild-type) (*Prlr* ^{+/+}, WT) y con ratones nulos (knock-out) para el receptor de PRL (*Prlr* ^{-/-}, KO) con la finalidad de obtener crías de ratones con el genotipo KO y WT. Durante la lactancia, las madres fueron alimentadas *ad libitum* con dieta control (DC) o con dieta alta en grasas (DO), consistentes en 28% de proteínas, 13.5% de grasa y 58% de carbohidratos y 20% de proteínas, 60% de grasa y 20% de carbohidratos, respectivamente. Las crías se alimentaron de manera normal con la leche de sus madres. Posteriormente las crías fueron sacrificadas al día 12 de lactancia. Se obtuvo el suero de los animales y el intestino en su totalidad y posteriormente se separaron sus diferentes porciones (duodeno, yeyuno, íleon y colon).

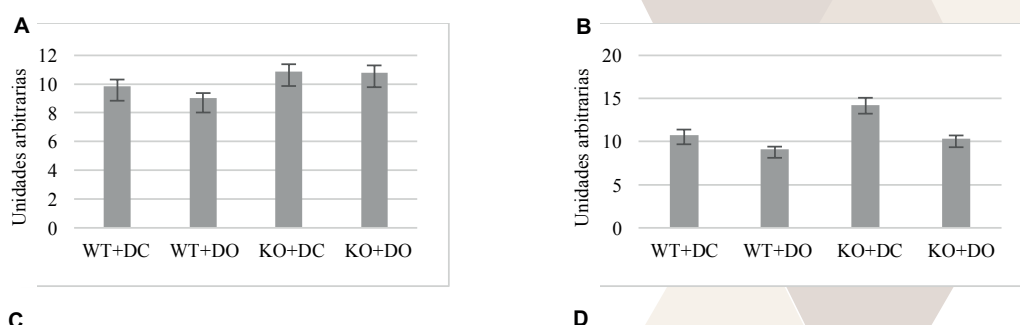
Histología del intestino. El intestino fue seccionado transversalmente para generar porciones en forma de anillo de 3 mm de grosor que, tras ser lavadas con agua para eliminar los residuos del contenido intestinal, fueron colocadas en cassetes de histología. Se procedió a la fijación del tejido en formalina al 4% durante una hora y se pasó a través de un tren de deshidratación para su inclusión en parafina. Al bloque resultante se le realizaron cortes de 3 µm de grosor, las láminas obtenidas se colocaron en portaobjetos para su tinción con hematoxilina-eosina.

El análisis de las imágenes se realizó a doble ciego y se consideraron nueve campos por laminilla visualizados con el objetivo de 40x. En cada campo capturado de duodeno, yeyuno e íleon se midió la longitud de vellosidades completas y bien orientadas y la profundidad de criptas abiertas a la luz intestinal en el caso del colon con un testigo métrico externo. Se calculó el promedio de las mediciones obtenidas por cada animal Y los promedios de las mediciones fueron clasificados en cuatro grupos según el genotipo de los ratones y la alimentación de sus madres (WT+DC, WT+DO, KO+DC Y KO+DO). Posteriormente, se obtuvo el promedio de la longitud de las vellosidades intestinales por grupo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con relación a todas las porciones del intestino delgado, se encontró una disminución en la longitud de las vellosidades intestinales de las crías WT alimentadas con leche de madres sometidas a una dieta alta en grasas (WT+DO). En el yeyuno de crías carentes del receptor de PRL (KO) provenientes de madres alimentadas con una dieta alta en grasas (KO+DO), también se redujo la longitud de las vellosidades intestinales; sin embargo, la longitud de las vellosidades de duodeno e íleon del grupo KO+DO no mostró diferencias respecto al grupo KO+DC (Figura 1 A-C). En el caso del colon, la dieta obesogénica en las madres no ocasionó cambios en la profundidad de las criptas intestinales en las crías de ninguno de los dos genotipos (Figura 1 D).

La disminución en la longitud de las vellosidades intestinales y un aumento de la profundidad de las criptas intestinales está descrita en condiciones que aumentan la permeabilidad intestinal (Drut, 2011; Ribeiro, Giusti, Souza, Franci y Saia, 2017). Puesto que se ha descrito que existe un aumento de la permeabilidad intestinal en las crías alimentadas con leche de madres sometidas a dietas altas en grasa, los hallazgos observados en la histología intestinal deberían coincidir con los mencionados. Esta situación se cumplió en el caso de la disminución de la longitud de las vellosidades de todas las porciones del intestino de los animales WT+DO (Figura 2) y para la porción del yeyuno de las crías KO+DO (Figura 3). No obstante, las demás porciones del intestino delgado de crías KO+DO y el colon de crías WT+DO ni KO+DO mostraron cambios respecto a los grupos con DC.



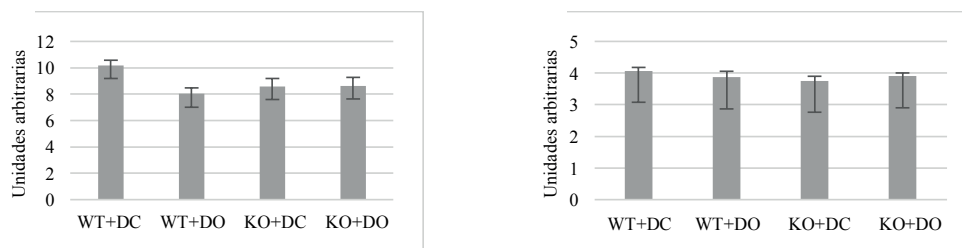


Figura 1. Promedio de la longitud de las vellosidades intestinales del duodeno (A), yeyuno (B) e íleon (C) y promedio de la profundidad de las criptas del colon (D) de crías lactantes.

En duodeno y yeyuno se encontró un incremento en la longitud de las vellosidades intestinales en ausencia del rPRL independiente de la dieta (Figura 1 A y B) respecto a los animales WT. En íleon, la longitud de las vellosidades intestinales fue menor en las crías sin rPRL alimentadas con leche de madres sometidas a dietas control (KO+DC) en comparación con el grupo de animales silvestres alimentados de la misma manera (WT+DC). No existió diferencia en la longitud de las vellosidades intestinales del íleon por la ausencia del rPRL cuando las crías se alimentaron de la leche de madres con reto obesogénico (Fig. 1 C). En el caso del colon, la ausencia del rPRL no produjo cambios en la profundidad de las criptas intestinales en ningún tipo de dieta (Figura 1 D).

Ya que la prolactina disminuye la permeabilidad intestinal, se esperaría que la ausencia de su receptor se traduzca en un incremento de la permeabilidad intestinal con los hallazgos histológicos correspondientes, es decir una disminución en la longitud de las vellosidades y mayor profundidad de las criptas. Por lo tanto, los resultados correspondieron a lo esperado sólo en el íleon de animales del grupo KO+DC (Figura 4). El resultado de la longitud de las vellosidades de duodeno y yeyuno de animales KO de madres con cualquier tipo de dieta fue opuesto a lo previsto.

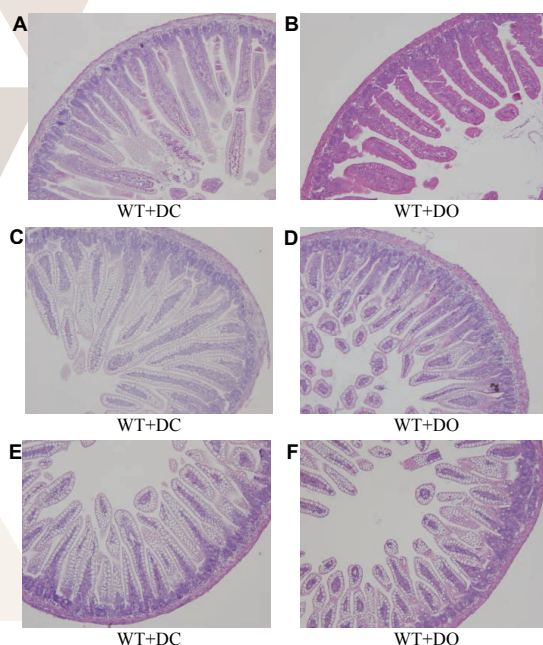


Figura 2. La alimentación de la crías WT con leche de madres sometidas a DO causó una disminución de la longitud de las vellosidades intestinales en todas las porciones del intestino delgado: duodeno (A y B), yeyuno (C y D) e íleon (E y F).

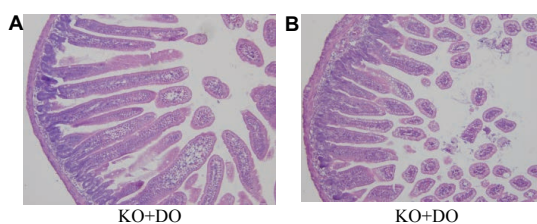


Figura 3. La alimentación de la crías KO con leche de madres sometidas a DO causó una disminución de la longitud de las vellosidades intestinales en yeyuno.

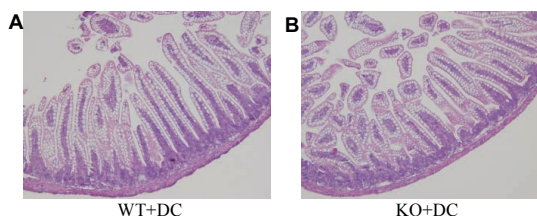


Figura 4. La ausencia del rPRL causó una disminución de la longitud de las vellosidades intestinales en el íleon en crías alimentadas con leche de madres sometidas a DC.

CONCLUSIONES

La histología muestra que la permeabilidad de cada una de las porciones del intestino se ve afectada de manera distinta por la ausencia del rPRL y por la alimentación con leche proveniente de madres sometidas a un reto obesogénico, sobre todo en el intestino delgado. Se presentó una reducción de la longitud de las vellosidades en todas las porciones del intestino delgado de los ratones WT alimentados con la leche de madres alimentadas con dietas altas en grasas. Independientemente de su genotipo, hubo una disminución de la longitud de las vellosidades intestinales del yeyuno de las crías como consecuencia de una dieta alta en grasas en las madres que señala un aumento de la permeabilidad intestinal. En el caso del duodeno y el íleon, la dieta obesogénica de las madres sólo causó una reducción en la longitud de las vellosidades intestinales de las crías en presencia del rPRL; esto evidencia que el rPRL interviene en la disminución de la longitud de las vellosidades intestinales en estas regiones y con ello en el aumento de la permeabilidad intestinal de duodeno e íleon de la progenie de madres lactantes sometidas a dietas altas en grasa. La presencia o ausencia del rPRL y el tipo de dieta de las madres tuvo poca implicación en la profundidad de las criptas del colon y por ello pocas consecuencias en la permeabilidad intestinal de esta región.

Esto sugiere que cada porción de intestino delgado podría contribuir de manera diferente en el desarrollo de resistencia a la insulina. Sin embargo, no todos los resultados coincidieron con lo esperado y aún falta mucho por investigar al respecto. Es necesario considerar otros parámetros en el análisis de la histología intestinal y utilizar otras técnicas para evaluar la permeabilidad intestinal, además de relacionar estos resultados con la sensibilidad a la insulina de crías de ratón sometidas a las mismas condiciones de alimentación.

BIBLIOGRAFÍA

- Ajibade, D., Dhawan, Fechner, A., Meyer, M., Pike, J., & Christakos, S. (2010). "Evidence for a Role of Prolactin in Calcium Homeostasis: Regulation of Intestinal Transient Receptor Potential Vanilloid Type 6, Intestinal Calcium Absorption, and the 25-Hydroxyvitamin D3 1 α Hydroxylase Gene by Prolactin" en *Endocrinology*, Núm. 7, Vol. 151, [pp. 2974-2984]
- Balbach, L., Wallaschofski, H., Völzke, H., Nauck, M., Dörr, M., & Haring, R. (2013). "Serum prolactin concentrations as risk factor of metabolic syndrome or type 2 diabetes?" en *BMC Endocrine Disorders*, Núm. 12, Vol. 13
- Carvalho, B. & Saad, M. (2013). "Influence of gut microbiota on subclinical inflammation and insulin resistance" en *Mediators of Inflammation*, Vol. 2013
- Chirico V, Cannavo S, Lacquaniti A, Mandolfino, M., Romeo, P., Cotta, O., ... Arrigo, T. (2013). "Prolactin in obese children: a bridge between inflammation and metabolic-endocrine dysfunction" en *Clinical Endocrinology*, Núm. 79, Vol. 2013, [pp 537-544]
- Del Prado, M., Delgado G, Villalpando S. (1997). "Maternal lipid intake during pregnancy and lactation alters milk composition and production and litter growth in rats" en *Journal of Nutrition*, Núm. 3, Vol. 127, [pp. 458-462]
- Drut, R. (2011). Contribución del patólogo en el diagnóstico de enfermedad celiaca. "Comentarios sobre recientes avances", en *Revista Española de Patología*, Núm. 3, Vol. 44, [pp. 179-181]
- Freemark M, Avril I, Fleenor D, Driscoll, P., Petro, A., Opara, E., ... Kelly, P. (2002). "Targeted deletion of the PRL receptor: effects on islet development, insulin production, and glucose tolerance" en *Endocrinology*, Núm. 4, Vol. 143, [pp. 1378-1385]
- García, T., Morel, G., Gallego, R., Fraga, M., Pintos, E., Gago, D., ... Beiras, A. (1996). "Cellular distribution of prolactin receptors in human digestive tissues" en *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolismo*, Núm. 5, Vol. 81, [pp. 1861-1866]
- He, C., Shan, Y., Son, W. (2015). "Targeting gut microbiota as a possible therapy for diabetes" en *Nutrition Research*, Núm. 5, Vol. 35, [pp. 361-367]
- Kort, S., Keszthelyi, D. & Masclee, A. (2011). "Leaky gut and diabetes mellitus: what is the link?" en *Obesity reviews*, Núm. 6, Vol. 12, [pp. 449-458]
- Masuyama, H. & Hiramatsu, Y. (2014). "Additive effects of maternal high fat diet during lactation on mouse offspring" en *Plos One*, Núm 3, Vol. 9
- Méndez, I., Cariño, C. & Díaz, L. (2005). "La prolactina en el sistema inmunológico: aspectos de síntesis y efectos biológicos" en *Revista de Investigación Clínica*, Núm. 3, Vol. 57, [pp. 447-456]
- Ribeiro, A., Giusti, H., Souza, A., Franci, C. & Saia, R. (2017). "Dexamethasone prevents lipopolysaccharide-induced epithelial barrier dysfunction in rat ileum" en *Shock*
- Rolls, B., Gurr, M., Duijvenvoorde, P., Rolls, B & Rowe, E. (1986). "Lactation in lean and obese rats: effect of cafeteria feeding and of dietary obesity on milk composition" en *Physiology & behavior*, Núm. 2, Vol. 38, [pp. 185-190]
- Ruiz, X., Ríos, E., Díaz, J., Lerma, R., Martínez, L., López, F., ... Macotela, Y. (2017). "Prolactin promotes adipose tissue fitness and insulin sensitivity in obese males" en *Endocrinology*, Núm. 1, Vol. 158, [pp. 56-68]
- Shen, J., Obin, M. & Zhao, L. (2013). "The gut microbiota, obesity and insulin resistance" en *Molecular Aspects of Medicine*, Núm. 1, Vol. 34, [pp. 39-58]
- Turksin, R., Bel, S., Galjaard, S. & Devlieger, R. (2014). "Maternal obesity and breastfeeding intention, initiation, intensity and duration: a systematic review" en *Maternal & Child Nutrition*, Núm. 2, Vol. 10, [pp. 166-183]
- Vogt, M., Paeger, L., Hess, S., Steculorum, S., Awazawa, M., Hampel, B., ... Brüning, J. (2014). "Neonatal insulin action impairs hypothalamic neurocircuit formation in response to maternal high fat feeding" en *Cell*, Núm. 3, Vol. 156, [pp. 495-509]
- Yu, J., Xiao, F., Zhang, Q., Liu, B., Guo, Y., Lv, Z., ... Guo, F. (2013). "PRLR Regulates Hepatic Insulin Sensitivity in Mice via STAT5" en *Diabetes*, Núm. 9, Vol. 62, [pp. 3103-3113]
- Wagner, R., Heni, M., Linder, K., Ketterer, C., Peter, A., Böhm, A., ... Fritsche, A. (2014). "Age-dependent association of serum prolactin with glycaemia and insulin sensitivity in humans" en *Acta Diabetologica*, Núm. 1, Vol. 51, [pp. 71-78]
- Wang, T., Lu, J., Xu, Y., Li, M., Sun, Zhang, J., ... Ning, G. (2013). "Circulating prolactin associates with diabetes and impaired glucose regulation" en *Diabetes Care*, Núm 7, Vol. 36, [pp. 1974-1980]

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Yazmín Macotela Guzmán por recibirme en su laboratorio y por todas las atenciones prestadas.
A la M. en C. Ericka Alejandra De los Ríos Arellano por su guía y su paciencia a lo largo de este proyecto.
A la tesista de Licenciatura en Nutrición Viridiana Tinoco Pantoja por su constante apoyo durante la estancia.
A todo el equipo del laboratorio de endocrinología por su amabilidad.

PRODUCCIÓN DE LISOZIMA DE HUEVO DE GALLINA EN *ASPERGILLUS NIGER* B1

Sofía Margarita Arellano Acosta¹ y Sergio de Jesús Romero Gómez²

RESUMEN

Aspergillus niger B1 es una cepa modificada genéticamente que contiene el vector G498:Lys, el cual posee un fragmento de DNA que codifica para la glucoamilasa de *Aspergillus niger* y la secuencia codificante de la lisozima de huevo de gallina, ésta última presenta distintas actividades biológicas como la actividad antibacterial, antiviral y antitumoral. Se llevó a cabo una fermentación en estado sólido utilizando poliuretano para producir lisozima debido a las ventajas que este método presenta. La producción de lisozima se pudo obtener a pesar del bajo crecimiento de la cepa B1 de *A. niger*, sin embargo, se produjo una cantidad mínima y con baja actividad enzimática.

ABSTRACT

Aspergillus niger B1 is a genetically modified strain that contains G498:Lys vector, which has a DNA fragment encoding *Aspergillus niger* glucoamylase and hen egg-white lysozyme coding sequence, this enzyme has antibacterial, antiviral and anti-tumor activity. A solid fermentation was carried out using polyurethane to produce lysozyme due to the advantages that this method presents. The production of lysozyme was obtained despite the low growth of B1 *A. niger*, nevertheless, a minimal amount of lysozyme was produced with a low enzymatic activity.

Palabras Clave: *Aspergillus niger* B1; Lisozima; Fermentación sólida

INTRODUCCIÓN

Aspergillus niger es un hongo filamentoso que pertenece al filo Ascomycete, del género *Aspergilli*. Este tipo de hongo se caracteriza por su rápida proliferación (3-5 días), por presentar conidios de color negro azabache y una coloración amarillo grisáceo al reverso de la colonia (Koneman, *et al.*, 2008). Este hongo es de gran interés industrial debido a que es utilizado para la elaboración de ácido cítrico, aunque también se ha utilizado para obtener hormonas y enzimas (Arenas, 2013). La importancia de *A. niger* radica en que es capaz de secretar proteínas a altos niveles, y a su estatus regulatorio GRAS (Estatus de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos), el cual considera a éste como un organismo seguro para la salud (Smith, 2013).

La lisozima, también llamada muramidasa, es una proteína que se ha visto presente en organismos como reptiles, aves y mamíferos, así como en tejidos y fluidos, incluyendo lágrimas, saliva y huevos de aves. En el ser humano, la lisozima es esencial, ya que es importante en la defensa contra infecciones. Se ha demostrado que la lisozima es un componente principal en los gránulos, tanto primarios como secundarios, de los neutrófilos y es el principal producto secretado por los macrófagos. Se han descrito diversas actividades biológicas de esta proteína como lo son: la actividad antibacteriana, la actividad antiviral y la actividad antiinflamatoria. Además, a la lisozima proveniente de huevo también se le han descrito actividades antioxidantes y actividades antifúngicas, así como la potenciación del efecto de antibióticos (Carrillo, 2013).

La lisozima de huevo de gallina (HEWL) ha sido la más estudiada, debido a que se presenta en una gran concentración (1-3g/L de clara de huevo), a su fácil manejo, y a su posibilidad de purificación por medio de cristalización en cloruro de sodio (NaCl) al 5% a un pH de 9.5. Esta proteína se compone de una secuencia de 129 residuos de aminoácidos y posee cuatro puentes disulfuro que le confieren una alta estabilidad. En el sitio catalítico se encuentran aminoácidos necesarios para que se lleve a cabo la catálisis, los cuales son: Glu 35 y Asp 52 (Carrillo, 2013).

Aspergillus niger B1 es una cepa que se encuentra modificada genéticamente debido a que contiene el vector G498:Lys, el cual se compone de una fusión de un fragmento de DNA de los primeros 498 codones de la glucoamilasa de *A. niger* y una secuencia codificante de HEWL, mediante un sitio de escisión endoproteolítico de tipo KEX2 (Jeenes, *et al.*, 1994).

La fermentación en estado sólido (FES) es un tipo de fermentación que se caracteriza por llevarse a cabo sobre un soporte sólido, el cual posee un bajo contenido de humedad (límite inferior al 12%) y ocurre en estado no aséptico y natural. La FES posee ciertas ventajas sobre otro tipo de fermentaciones debido a que produce una alta concentración de producto con un bajo requerimiento energético, por lo cual, ha sido explotada para producir alimentos, combustible y enzimas (Robinson, *et al.*, 2001). Los soportes inertes que se han utilizado para la fermentación en estado sólido han sido la amberlita IRA 900, el poliestireno, el uretano y el poliuretano (Domínguez de Luna, 2002).

Este proyecto se llevó a cabo con la finalidad de producir lisozima de huevo usando la cepa genéticamente modificada B1 proveniente de *Aspergillus niger*, mediante el uso de fermentación sólida con poliuretano.

El objetivo general fue producir lisozima de huevo utilizando la cepa *A. niger* B1. Los objetivos específicos consistieron en la reanimación de la cepa de *A. niger* B1 utilizando el medio de cultivo PDA (Agar-Papa-Dextrosa), la producción de una gran cantidad de esporas con el fin de inocular, la recuperación y el conteo de las esporas obtenidas, el cultivo de *A. niger* B1 para producir lisozima mediante fermentación con base sólida inerte (poliuretano), la

cuantificación de la proteína producida, y la medición de la actividad enzimática de la lisozima producida en la fermentación.

MÉTODOS Y MATERIALES

Para la reanimación de *A. niger* B1 se prepararon 25ml de medio de cultivo PDA en un matraz de 125 ml y se esterilizó a 121°C y 15 PSI durante 15 minutos. Posteriormente, la cepa *A. niger* B1 (la cual se encontraba en estado sólido, en polvo) se vertió en el medio aun estando líquido, y se dejó incubar a 30°C durante 72 hrs. Cabe resaltar que la cepa se encontraba en forma de polvo con el fin de preservarla; esto se logró utilizando leche descremada y sílica gel.

La producción de las esporas se observó después de las 72hrs de incubación, formando una capa gruesa de coloración negra en la superficie del medio.

Para la recuperación y el conteo de las esporas se vertió una solución de 25ml de Tween al 0.1% con un agitador magnético (previamente esterilizados) en el matraz que contenía las esporas; el agitador magnético sirvió para separar las esporas de las hifas. La solución que contenía las esporas se dejó agitar durante 3 minutos sin crear espuma. Después, se diluyó una cantidad de 250µl de la solución de esporas en 25ml de agua destilada y se utilizó la cámara de Neubauer para la cuenta, donde se obtuvo la concentración de esporas por mililitro de la solución, mediante el uso de la siguiente ecuación:

$$N^{\circ} \text{ de esporas/ml} = \frac{(N^{\circ} \text{ de esporas totales})(25)(FD)(1)(10^4)}{N^{\circ} \text{ de cuadros contados}} \quad (1)$$

El cultivo de *A. niger* B1 para producir lisozima se llevó a cabo utilizando poliuretano. El poliuretano fue previamente cortado en cubos de 5mm, lavado 2 veces con agua hirviendo, y secado en horno a 70°C durante 4-12hrs. Se preparó un medio especial para verterlo en los 5 matraces que contenían el poliuretano (1g de poliuretano por cada matraz). El medio estaba compuesto de almidón (50g/L), NH₄Cl (21.8g/L), sales de Cove (X1), KCl (2g/L), MgSO₄ (2g/L) y KH₂PO₄ (6g/L). El medio (previamente esterilizado) se inoculó con la solución de esporas (1x10⁷ esporas/g de fuente de carbono), y se vertieron 25ml de éste a cada matraz. Los matraces se dejaron incubando a 30°C durante 72 hrs.

Para la cuantificación de la proteína se preparó un buffer de fosfatos a un pH de 6.7 a 0.1M. Los fosfatos utilizados fueron el fosfato de potasio y su sal derivada. Después de la incubación de 72hrs para que se llevara a cabo la fermentación, los matraces fueron vertidos con 10ml del buffer y se dejaron reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Utilizando una jeringa de 60ml, el poliuretano se exprimió en tubos Falcon y se usó el método de Bradford descrito en los protocolos Sigma®.

Para determinar la actividad enzimática de la lisozima se realizó el ensayo enzimático utilizado por Archer, D. B., Jennes, D. J., MacKenzie, D. A., Brightwell, G., Lambert, N., Lowe, G., Radford, S.E., Dobson, C. (1990), sin embargo, hubo una modificación en el rango con la finalidad de que estuviera en éste la cantidad de lisozima producida.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A lo largo de la estancia de verano se llevaron a cabo cuatro lotes debido a que no existía crecimiento, o no había crecimiento suficiente de *A. niger* B1 en los matraces con poliuretano y medio de cultivo para poder realizar la cuantificación de la proteína y el análisis de actividad enzimática.

En el primer lote, no se observó la presencia de crecimiento de *A. niger* B1, por lo que se revisó a detalle el procedimiento hecho con anterioridad hasta ese punto, y se detectó que el medio de cultivo no contenía tres elementos: cloruro de potasio (KCl), sulfato de magnesio (MgSO₄) y fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄). El potasio, el magnesio y el fósforo son componentes esenciales en el medio de cultivo de *A. niger* B1 para producir lisozima, debido a que son componentes elementales en hongos. Alicia Hernández (2003) señala que el potasio es el 2.50% (p/v), el magnesio es el 0.30% (p/v), y el fósforo es el 1.70% (p/v) de peso en seco de este organismo. Además, afirma que “*Aspergillus niger* si se le restringe el suministro de hierro, cobre, manganeso y fosfato; se limita la reproducción del hongo.”

En el segundo lote, se llevó a cabo la preparación del medio de cultivo con los elementos faltantes del lote anterior, sin embargo, a pesar de que hubo crecimiento, el crecimiento fue mínimo. Se revisó de igual manera que todo se hubiera realizado correctamente, y se observó que la incubadora se encontraba descalibrada, marcando una temperatura de 34.4°C. La temperatura para que crezca este tipo de hongo es de 30°C, como lo dice Rubio (2014) “Su temperatura óptima de crecimiento está alrededor de 25-30°C (temperatura similar a la ambiente), pero puede llegar a crecer hasta una temperatura de 37°C”. Es debido a esto, que sí existió un crecimiento de *A. niger* B1, pero fue casi nulo.

En el tercer lote, se adecuaron las condiciones que estaban afectando el crecimiento del hongo en los lotes anteriores, y se esperaba que hubiera un crecimiento óptimo, a pesar de ello, no se pudo observar crecimiento de *A. niger* B1. Después de plantear las posibles respuestas a lo sucedido, se encontró que las tijeras utilizadas para cortar los cubos de poliuretano no eran 100% de acero, puesto que éstas eran de acero inoxidable. Pichardo, *et al.* (2012) nos señala que “Una fórmula de acero inoxidable muy utilizada es la que contiene 18/100 de cromo, 8/100 de níquel y 1.25 partes de molibdeno”, mientras que Dursun, *et al.* (2002) afirma que todas las concentraciones de cobre (II), plomo (II) y cromo (VI) causan inhibición del crecimiento de *A. niger*, y que este tipo de hongo es altamente sensible al cromo (VI). El crecimiento de *A. niger* B1 no se manifestó puesto que las tijeras contenían cromo, y éste es tóxico para la cepa.

En el cuarto y último lote se volvió a presentar poco crecimiento, pero éste era suficiente para llevar a cabo los análisis de cuantificación y medición de la actividad enzimática de la proteína producida. El pH medido, después de obtener la solución contenida en el poliuretano, fue de 2.65. Lo anterior puede deberse a la producción de ácidos orgánicos,

principalmente de ácido cítrico, puesto que *A. niger* es capaz de producirlo a un pH de 3.00 pero su producción óptima es de 2.0 según lo señala Andersen, *et al.* (2009).

Tabla 1. Crecimiento de *Aspergillus Niger B1*

No. de Lote	Crecimiento de <i>A. niger B1</i>
1	-
2	X
3	-
4	X

El promedio de la producción de la proteína fue de 7.72mg/L, lo cual es relativamente poco, debido a que Jeenes, *et al.* (1994) afirma que se puede producir hasta 70mg/L de lisozima. Además, se sabe que *A. niger* es uno de los hongos más empleados para la secreción de proteína por sus características, como lo señala Izarra, *et al.* (2010) “*Aspergillus niger* es uno de los microorganismos más utilizados en la producción de enzimas industriales principalmente por sus altos niveles de secreción de proteína.”, principalmente *A. niger B1* puesto que esta cepa contiene un péptido de activación, con un sitio de corte para una proteasa tipo KEX2 que genera que se puedan producir niveles altos de producción de la proteína, así lo afirma Pallás (2007) “Una estrategia común en la expresión heteróloga es la construcción de genes quiméricos con una porción 5' de una proteína fúngica que se expresa a una tasa de transcripción y traducción alta, separada de la proteína de interés por un sitio sensible a la proteasa KEX2, logrando niveles de producción muy altos.”

La actividad enzimática fue de 3.39×10^{-3} U/μg proteína, la cual también es baja si se compara con los resultados obtenidos por Archer, *et al.* (1990) donde se señala que se pueden obtener 83 ± 6.6 U/μg proteína. El hecho de que no se haya presentado una buena cantidad de proteína y una buena actividad enzimática puede deberse a la morfología de la cepa, como dice Barredo (2005) “Es muy importante que el inóculo tenga la morfología apropiada debido a que este parámetro puede determinar la cantidad de proteína secretada”.

Tabla 2. Cuantificación y actividad enzimática de lisozima

Cuantificación de lisozima (mg/L)	Actividad enzimática (U/μg proteína)
7.72	3.39×10^{-3}

CONCLUSIONES

La baja cantidad de lisozima obtenida, así como su baja actividad enzimática se debe principalmente a que no hubo suficiente crecimiento de *Aspergillus niger B1*. Algunos factores que pudieron haber influenciado en lo anterior, son que la morfología de la cepa no haya sido la adecuada, que hubiera la presencia de metales como el cobre, el plomo y el cromo antes y durante el proceso de fermentación, o que la temperatura de incubación no haya sido la óptima. Es importante conocer todos los factores que pueden influenciar en el desarrollo de la cepa, debido a que de esto depende que se obtenga la proteína de interés en altas concentraciones. Cabe resaltar que, a pesar de no haber tenido grandes concentraciones de la lisozima, sí se logró obtener cierta cantidad, lo que corrobora que *Aspergillus niger* puede utilizarse para secretar proteínas de interés, sobretodo *A. niger B1*.

BIBLIOGRAFÍA

Libros

- ARENAS, R. (2013). *Micología médica ilustrada*, (4ª ed.) México D.F.: McGraw-Hill México.
- BARREDO, J. (2005). *Microbial Processes and Products*, Nueva Jersey: Humana Editorial.
- HERNÁNDEZ, A. (2003). *Microbiología industrial*, San José: EUNED Editorial.
- KONEMAN, E., *et al.* (2008). *Diagnóstico microbiológico*, (6ª ed.) Buenos Aires: Médica Panamericana.
- PALLÁS, V., *et al.* (2007). *Herramientas biotecnológicas en fitopatología*, Madrid: Ediciones Mundi-Prensa.
- PICHARDO, S., *et al.* (2012). *Residuos de componentes de plásticos en alimentos*, Madrid: Ediciones Díaz de Santos.
- RUBIO, R. (2014). *Aplicación de normas y condiciones higiénico-sanitarias en la restauración, manipulación, higiene y seguridad alimentaria en un servicio de restaurante y bar*, Pontevedra: Ideaspropias Editorial.
- SMITH, J. (2013). *Food additive user's handbook*, Nueva York: Springer Science & Business Media.

Artículos de revista

- ARCHER, B., *et al.* (1990). “Hen egg white lysosyme expressed in, and secreted from, *Aspergillus niger* is correctly processed and folded” en *Nature Publishing Group*, Núm. 8, Vol. VIII, Agosto, [pp. 741-745].
- ANDERSEN, M., *et al.* (2009). “Systemic analysis of the response of *Aspergillus niger* to ambient pH” en *Genome Biology*, Núm. 5, Vol. X, Febrero-Mayo, [pp. 1-14].

CARRILLO, W. (2013). "Lisozima: Actividad Antibacteriana y Alergenicidad" en *Revista SAN*, Núm 4, Vol. XIV, Diciembre, [pp. 314-326].

DURSUN, A., *et al.* (2003). "Bioaccumulation of copper(II), lead(II) and chromium(VI) by growing *Aspergillus niger*" en *Process Biochemistry*, Vol. XXXVIII, Marzo, [pp. 1647-1651].

IZARRA, M., *et al.* (2010). "Influencia de la concentración de inóculo en la producción de celulasa y xilanasa por *Aspergillus niger*" en *Revista Colombiana de Biotecnología*, Núm. 2, Vol. XII, Noviembre, [pp. 139-150].

JEENES, D., *et al.* (1994). "Transcriptional and post-transcriptional events affect the production of secreted hen egg white lysozyme by *Aspergillus niger*" en *Transgenic Research*, Núm. 5, Vol. III, Septiembre, [pp. 297-303].

ROBINSON, T., *et al.* (2001). "Fermentación en estado sólido: una tecnología microbiana promisoría para la producción de metabolitos secundarios" en *Vitae*, Núm. 2, Vol. IX, Octubre, [pp. 27-36].

Artículos en línea

DOMÍNGUEZ DE LUNA, J. (2002). "Producción Comparativa de Proteasas por *Streptomyces sp.* en Cultivo en Estado Sólido y Cultivo Líquido" en UAAAN, pp. 1-63. Consultada en <http://repositorio.uaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/308/57453s.pdf?sequence=1> (fecha de consulta 16-08-2017).

EFFECTO CARDIOPROTECTOR DEL OMEGA 3 EN EL PROCESO DE ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN EN UN MODELO DE CORAZÓN AISLADO DE RATA

Acevedo Díaz, Zaira Valeria¹ y Torres Tirado, José David².

RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares ocupan el primer lugar de mortalidad a nivel mundial, originando la necesidad de nuevas estrategias preventivas y terapéuticas para disminuir su prevalencia. El omega 3 es un ácido graso poliinsaturado con efectos cardiovasculares como antiinflamatorio, antitrombótico, hipolipemiante y antiarrítmico. En este trabajo se evaluó el efecto cardioprotector del omega 3 en ischemia y reperfusión, utilizando un modelo de corazón aislado, evaluándose también la respuesta a la administración intracoronaria de agonistas como acetilcolina e insulina. Se encontró que los efectos de ischemia y reperfusión disminuyen la contractilidad vascular y miocárdica, así como la respuesta a los agonistas, mientras que el omega 3 protegió al tejido cardíaco de los efectos de la ischemia, obteniéndose respuestas cercanas a un tejido sano.

Palabras clave: Omega 3, acetilcolina, insulina.

ABSTRACT

Cardiovascular diseases are the first cause of mortality in the world, giving rise to research new preventive and therapeutic options to reduce their prevalence. Omega 3 is a substance of interest, which has cardiovascular anti-inflammatory, antithrombotic, lipid-lowering and antiarrhythmic effects. In this work we evaluated the cardioprotective effect of omega 3 in ischemia and reperfusion process, using an isolated heart model, also evaluating the response to intracoronary administration of agonist drugs such as acetylcholine and insulin. We found that effects of ischemia and reperfusion decrease the vascular and myocardial contractility, as well as their response to agonist drugs, being that treatment with omega 3 protected the heart tissue of the effects of ischemia, obtaining very close responses to a response without ischemia.

INTRODUCCIÓN

El grupo de enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en población mexicana (INEGI, 2016), las cuales han incrementado su prevalencia debido a inactividad física, obesidad e inadecuada alimentación basada en una dieta con un elevado contenido de grasas saturadas. De estas enfermedades, el infarto agudo al miocardio es el de mayor incidencia (OMS, 2015), generando altos costos de rehabilitación, tratamiento y hospitalización. El infarto agudo al miocardio se caracteriza por un estado de hipoxia tisular miocárdica, durante el cual se acumulan desechos celulares, se incrementa el dióxido de carbono, disminuye el oxígeno y se producen especies reactivas de oxígeno que en conjunto afecta negativamente las funciones inotrópica y cronotrópica del corazón, causando una ineficaz contracción cardíaca, reduciendo así la función de bombeo además de un daño endotelial importante.

Dentro de los problemas cardiovasculares se encuentran la ischemia la cual es una interrupción en el flujo o suministro sanguíneo, en este caso del tejido cardíaco, ocasionando una disminución en el aporte de oxígeno y dicho aporte es insuficiente para satisfacer las necesidades metabólicas del tejido, lo que ocasiona una transición de un metabolismo aeróbico a un metabolismo anaeróbico. De este modo la reperfusión es la restauración del suministro sanguíneo y por lo tanto del aporte de oxígeno al tejido cardíaco.

La ischemia es un proceso que puede ser reversible, pero de continuar se convierte en un proceso irreversible a tal grado de ocasionar muerte celular y necrosis y llevar a problemas cardiovasculares muy graves.

A pesar de presentar etiología multifactorial, es bien aceptado que la herencia y los hábitos alimenticios son los factores que tienen la mayor influencia para el desarrollo de dichas enfermedades. Debido a esto, la medicina se ha enfocado en prevención primaria de estas consistiendo en una alimentación balanceada baja en grasas y carbohidratos además de realizar actividad física regularmente, previniendo su desarrollo en poblaciones con un bajo factor de riesgo, disminuyendo el riesgo de reincidencia en pacientes quienes ya las presentan y retrasar su aparición en personas con un alto riesgo de presentarlas. Una sustancia que se ha asociado a una menor incidencia de problemas cardiovasculares es el omega 3. El Omega 3 pertenece al grupo de los ácidos grasos poliinsaturados esenciales, donde se encuentran el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA). La principal fuente de éste grupo de ácidos grasos es el pescado, como arenque, sardina, salmón, albacora, hígado de bacalao incluso puede encontrarse en forma de suplementos comercialmente. La dosis de ingesta diaria recomendada por la Federal Drug Administration de Estados Unidos de Norteamérica, que debe incluir la combinación de EPA y DHA, es de 1 gr/día, mientras que la American Heart Association recomienda consumir por lo menos dos porciones de pescado por semana (Roy y Le-Guenec, 2016).

El omega 3 puede formar parte de los fosfolípidos de la membrana celular, por otro lado se ha asociado que el omega 3 presenta muchas otras propiedades, destacando las propiedades de interés cardiovascular, como la antiinflamatoria, antiarrítmica (Endo y Arita, 2016), antitrombótica e hipolipemiante (Adkins y Kelley, 2010).

Con la realización de este trabajo se pretende determinar la participación del omega 3 sobre la contractilidad cardíaca y vascular en un proceso de ischemia y reperfusión, el grado de alteración a agonistas fisiológicos como insulina y acetilcolina, comparando la respuesta obtenida antes y después de ischemia y reperfusión en un modelo de corazón aislado de rata bajo la técnica de Langendorff.

MÉTODOS Y MATERIALES

Preparación de ratas control y ratas con tratamiento

Para este trabajo, se emplearon 8 ratas Wistar macho obtenidas del Bioterio General de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, en donde se aprobaron los procedimientos experimentales con animales.

Las ratas se mantuvieron durante tres semanas, una semana en aclimatación a una temperatura de 26°C, además de condiciones de humedad, ruido y ciclos de luz-oscuridad 12x12. Se administró alimento especial para rata y agua *ad libitum* durante todo momento. Una vez que los animales alcanzaron un peso entre 300-400 gramos, se distribuyeron en dos grupos: Ratas Control y Ratas en Tratamiento con omega 3, cada uno integrado por 4 ratas.

A las ratas bajo tratamiento se les administró una dosis diaria de 0.5 ml de omega 3 por vía oral, combinado con vitamina E, obtenido de cápsulas de una formulación comercial durante un periodo de dos semanas.

Aislamiento del corazón de rata

Para la obtención de los corazones de rata, éstas se anestesiaron a través de la administración de 0.1 ml/100 g de peso de pentobarbital sódico intraperitoneal, combinado con 10 UI de heparina sódica.

Después de mantenerse bajo respiración artificial, se abrió el tórax y se extrajo el corazón junto con la porción ascendente del cayado aórtico y se perfundió de forma retrógrada a través de la técnica de Langendorff, a un flujo constante de 8 ml/min, con solución Krebs-Henseleit (NaCl 127 mM, KCl 6 mM, CaCl₂ 1.8 mM, NaH₂PO₄ 1.2 mM, MgSO₄ 1.2 mM, NaHCO₃ 25 mM, dextrosa 5 mM, piruvato 3.3 mM, pH 7.4, 37°C, 95% de O₂ y 5% de CO₂).

Así mismo el corazón se mantuvo bajo la aplicación constante de pulsos cuadrados de 4.5 Hz, utilizando un par de electrodos colocados en ambas orejuelas auriculares. Posteriormente se estableció un periodo de estabilización de 15 minutos antes de iniciar la administración de los fármacos a utilizar en los experimentos.

Administración intracoronaria de fármacos

Para la medición y registro de la respuesta inotrópica y cronotrópica, después de transcurridos los 15 minutos de estabilización, se administró un bolo intracoronario de 50 µl acetilcolina (Ach) (1x10⁻³ M) e insulina (Ins) (20 UI) humana recombinante rápida, permitiendo un periodo de 3 minutos de estabilización entre cada fármaco.

Enseguida se indujo un periodo de isquemia durante 10 minutos así como un periodo de reperfusión de 10 minutos. Posteriormente se procedió a administrar nuevamente 50 µl de acetilcolina e insulina para evaluar sus efectos después de un proceso isquémico. De manera alterna se obtuvo la glucemia de cada animal, la cual fue medida con un glucómetro, utilizando sangre arterial proveniente de la aorta al momento de escindir el corazón.

Medición de la Presión de Perfusión Coronaria y Presión de contracción del Ventrículo Izquierdo

La resistencia vascular coronaria fue determinada a través de la medición de la presión de perfusión coronaria (PPC), obtenida a través de un transductor de presión conectado a una rama de la cánula de perfusión.

Los efectos inotrópicos fueron determinados a través de la medición de los cambios presentados en la presión de contracción del ventrículo izquierdo (LVP). Para ello, se colocó al final del catéter un balón de látex pequeño hecho a mano y se introdujo en el ventrículo izquierdo a través de la aurícula izquierda. El otro extremo del catéter se conectó a un transductor de presión y el balón fue llenado con 0.2 ml de agua para crear presión diastólica o precarga. Los datos de contracción ventricular y de presión de perfusión coronaria fueron obtenidos en el equipo BIOPAC MP150 con transductores de presión no invasivo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

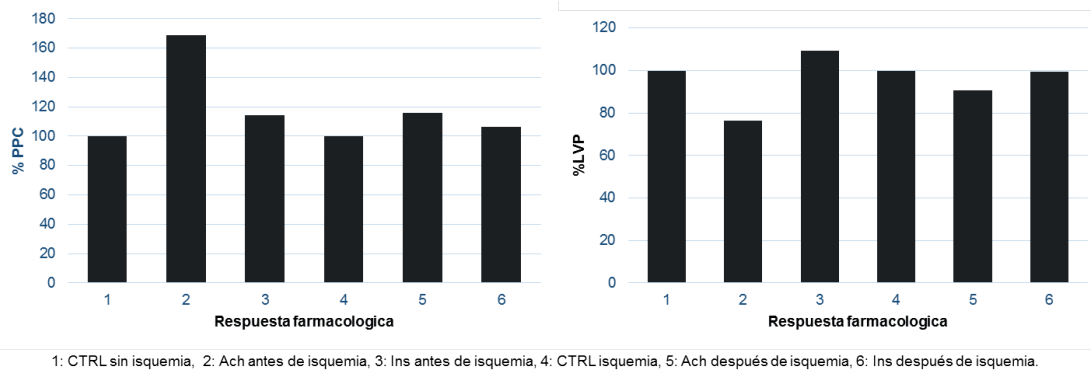


Figura 1. %PPC de acetilcolina e insulina en ratas con tratamiento de omega 3.

Figura 2. %LVC de acetilcolina e insulina en ratas con tratamiento de omega 3.

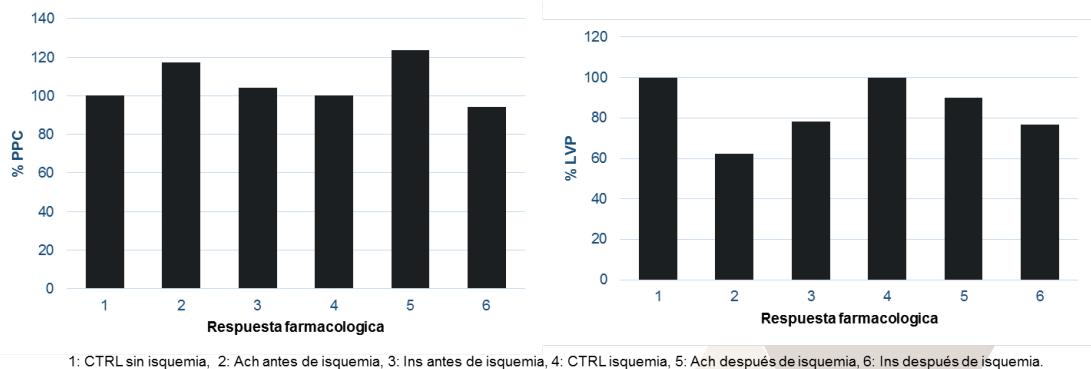


Figura 3. %PPC de acetilcolina e insulina en ratas sin tratamiento de omega 3.

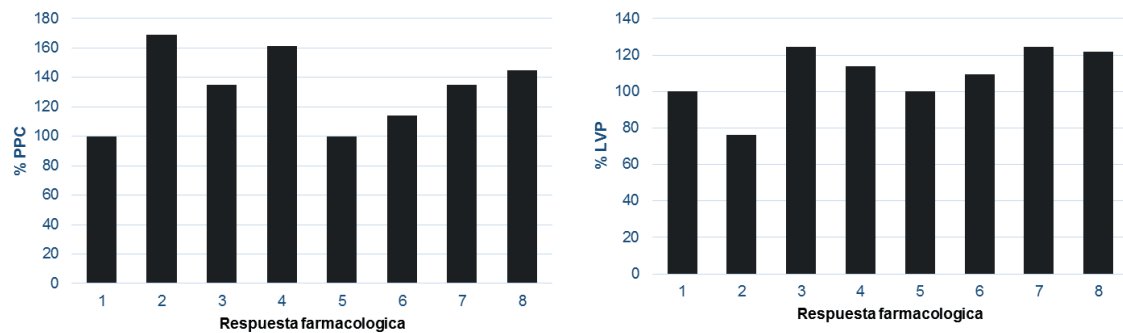
Figura 4. LVP de acetilcolina e insulina en ratas sin tratamiento de omega 3.

En las figuras 1 y 2 se observa cómo los valores obtenidos del %PPC y %LVP después del proceso de isquemia, en las ratas que consumieron omega 3, la respuesta farmacológica a insulina y a acetilcolina, fueron de semejante intensidad a los valores control antes de la administración farmacológica.

De forma contraria en las figuras 3 y 4, donde las ratas no recibieron tratamiento con omega 3, la respuesta farmacológica a insulina así como a acetilcolina fue menor, pues hubo un menor %PPC y %LVP después de la isquemia, respecto a los valores control antes de la administración de los fármacos, como respecto al control después de isquemia, alcanzando mayores porcentajes en las ratas con tratamiento bajo omega 3.

En las figuras 5 y 6 se aprecia cómo en las ratas bajo tratamiento con omega 3, el %PPC y LVP, comparados contra el control antes de isquemia y el control después de isquemia, los valores obtenidos son de la misma magnitud después de la isquemia comparados con los valores antes de la isquemia, incluso hay valores de mayor magnitud.

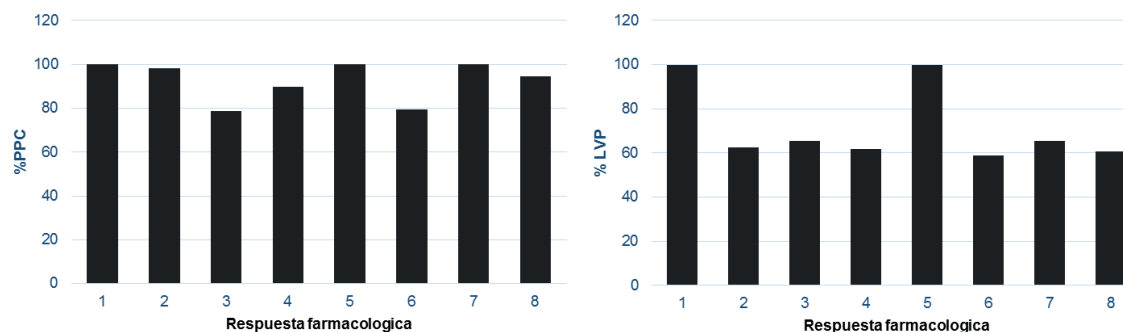
Mientras tanto, en las figuras 7 y 8 se muestra cómo se ven afectados los valores del %PPC y %LVP, después de la isquemia, comparados con los valores antes de la isquemia, pues existe una ligera disminución en la respuesta farmacológica, donde se alcanzan porcentajes más bajos, en comparación a las ratas con tratamiento con omega 3, donde los porcentajes obtenidos son mayores, es decir, que el omega 3 mejora la recuperación de la función cardiaca después de la isquemia, resultados obtenidos en el trabajo realizado por el grupo de Abdukeyum, Owen y McLennan (2008), quienes encontraron que el consumo de omega tres durante tres semanas, la isquemia de una zona cardiaca específica hacia el mismo efecto pero el área de tejido cardiaco afectado por la isquemia fue menor comparado con las ratas que consumieron omega 6 y ácidos grasos saturados, utilizando el modelo de corazón aislado de rata con una duración de 60 minutos, sin embargo en este trabajo se preconditionó el tejido con tres periodos cortos de isquemia, lo cual genera cierta protección previa a la isquemia prolongada.



1: CTRL sin isquemia, 2: Ach antes de isquemia, 3: CTRL isquemia, 4: Ach después de isquemia, 5: CTRL sin isquemia, 6: Ins antes de isquemia, 7: CTRL isquemia, 8: Insulina después de isquemia.

Figura 5. %PPC de acetilcolina e insulina en ratas con tratamiento de omega 3, antes y después del periodo de isquemia

Figura 6. %LVP de acetilcolina e insulina en ratas con tratamiento de omega 3, antes y después del periodo de isquemia



1: CTRL sin isquemia, 2: Ach antes de isquemia, 3: CTRL isquemia, 4: Ach después de isquemia, 5: CTRL sin isquemia, 6: Ins antes de isquemia, 7: CTRL isquemia, 8: Insulina después de isquemia.

Figura 7. %PPC de acetilcolina e insulina en ratas sin tratamiento de omega 3, antes y después del periodo de isquemia

Figura 8. %LVP de acetilcolina e insulina en ratas sin tratamiento de omega 3, antes y después del periodo de isquemia

Los resultados de la figura 7 y 8 muestran como las respuestas farmacológicas desaparecen después de un periodo de isquemia y reperfusion mientras que aquellos corazones que recibieron previamente omega 3 figura 5 y 6 presentan respuestas ligeramente disminuidas comparada con el control, lo que muestra claramente la protección cardiaca generada por el consumo del omega 3.

El grupo de Zirpoli, et al (2015), demostraron que la administración aguda intraperitoneal de emulsión de omega 3, en corazón aislado de ratón, bajo el modelo de isquemia y reperfusion, mejoró la fuerza de contracción del ventriculo derecho, después del proceso de isquemia-reperfusion, comparado con los corazones control, además el tejido cardiaco dañado fue menor, por otro lado los niveles de LDH fueron menores, en este trabajo comparado con el nuestro, se adiciona el omega 3 durante el proceso de isquemia y reperfusion y es posible que el omega 3 como tal este neutralizando las especies reactivas de oxigeno generadas mientras que en nuestros experimentos la participación del omega 3 es solamente de aquel que este incorporado en las membranas de las células cardiacas.

Se encontró que en las ratas que recibieron tratamiento con omega 3, la respuesta farmacológica después del periodo de isquemia, fue similar e incluso mayor a las ratas control, mostrando que el omega 3 posee un efecto cardioprotector, al disminuir importantemente el daño causado durante los 10 minutos de isquemia, tanto a nivel vascular como a nivel miocárdico. Por otro lado, en las ratas a las cuales no se les administro omega 3, después de la isquemia, la respuesta farmacológica fue menor, pues los valores del %PPC y %LVP se encontraban debajo del valor obtenido en las ratas control e incluso se pierde la capacidad de respuesta a los agonistas después de la isquemia.

BIBLIOGRAFÍA

Artículos en línea

Abdukeyum, G., Owen, A., McLennan, P. (2008). "Dietary (n-3) Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids Inhibit Ischemia and Reperfusion Arrhythmias and Infarction in Rat Heart Not Enhanced by Ischemic Preconditioning" en *The Journal of Nutrition*, No. 138, pp. 1902-1909. Consultada en <http://jn.nutrition.org/content/138/10/1902.long> (fecha de consulta: 15-08-17).

Adkins, Y., Kelley, D.S. (2010). "Mechanisms underlying the cardioprotective effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids" en *Journal of Nutritional Biochemistry*, No. 21, pp. 781-792. Consultada en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955286310000136?via%3Dihub> (fecha de consulta: 15-08-17).

Endo, J., Arita, M. (2015). "Cardioprotective mechanism of omega-3 polyunsaturated fatty acids" en *Journal of Cardiology*, No. 67, pp. 22-27. Consultada en: [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0914-5087\(15\)00230-0](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0914-5087(15)00230-0) (fecha de consulta: 15-08-17).

Roy, J., Le-Guenec, J-Y. (2016) "Cardioprotective effects of omega 3 fatty acids: origin of the variability" en *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, No. 37, pp. 1-6. Consultada en: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10974-016-9459-z> (fecha de consulta: 15-08-17).

Zirpoli, H., Abdillahi, M., Quadri, N., Ananthakrishnan, R., Wang, L., Rosario, R., Zhu, Z., Deckelbaum, R., Ramasamy, R. (2015) "Acute Administration of n-3 Rich Triglyceride Emulsions Provides Cardioprotection in Murine Models after Ischemia-Reperfusion" en *PLoS ONE*, No. 10, pp. 1-15. Consultada en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4283969/> (fecha de consulta: 15-08-17).

Páginas de internet

INEGI, 2015. Mortalidad por las enfermedades cardiovasculares en México. 12 de julio de 2017. Consultada en: <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/registros/vitales/mortalidad/tabulados/ConsultaMortalidad.asp> (fecha de consulta: 14-07-17).

OMS, 2015. Mortalidad por las enfermedades cardiovasculares. 12 de julio de 2017. Consultada en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/es/> (fecha de consulta: 14-07-17).

EXPOSICIÓN DIFERENCIAL DE GENES APOPTOTICOS EXPUESTOS A FLÚOR

Vázquez Montoya, A; Limón Rojas, A; Escobar García, D; Pozos Guillén, A.

Facultad de odontología Unidad Saltillo UadeC Avenida Dra. Cuquita Cepeda de Dávila SN Col. Adolfo López Mateos C.P. 25125 Saltillo, Coahuila alejandra_0309@hotmail.com

Facultad De Estomatología Universidad Autónoma De San Luis Potosí Av. Dr. Manuel Nava No. 2, Zona Universitaria, San Luis Potosí, S.L.P., México. C.P. 78290, Av. Dr. Manuel Nava 2, Zona Universitaria, 78290 San Luis, S.L.P. apozos@uaslp.mx

RESUMEN

El flúor es un elemento que podemos encontrar en distintas áreas que involucran desde agua potable hasta el flúor que se aplica de manera preventiva a caries dental. El flúor se encuentra en conjunto con otros elementos inorgánicos de manera natural tales como el sodio y a su vez con materiales orgánicos como el etileno. A pesar de sus múltiples beneficios para mantener salud de manera preventiva, se ha investigado el efecto nocivo que puede desarrollar a nivel sistémico a diferentes concentraciones, estas variaciones de concentración pueden estar indicadas por factores geológicos, provocando en las zonas de mayor prevalencia, una enfermedad endémica conocida como fluorosis, la cual se produce por exposición a largo plazo a altas concentraciones de este elemento, presentándose como un padecimiento crónico, a nivel sistémico que afecta a huesos y la pigmentación de los órganos dentales. El objetivo de este estudio es documentar la apoptosis inducida por flúor en el código genético de células.

ABSTRACT

Fluorine is an element that can be found in different areas that involve from the drinking water to the fluorine that is applied preventively a caries. This element is in conjunction with other naturally occurring inorganic elements such as sodium and once with organic materials such as ethylene. Despite its multiple benefits to maintain health in the preventive way, it has investigated the harmful effect that can develop a systemic level in our health to different concentrations, these variations of the concentration can be indicated by geological factors, provoke in the zones of higher prevalence, an endemic disease known as fluorosis, which is produced by exposing a long term to high concentrations of this element, presenting as a skull disease, a systemic level that affects the bones and pigmentation of the dental organs. The objective of this study is to document fluoride-induced apoptosis in the genetic code of cells.

Palabras clave: flúor, apoptosis, gen, osteoblastos, PCR, RNA.

INTRODUCCIÓN

La fluorosis es una enfermedad sistémica que daña huesos y que a su vez, en recientes investigaciones se ha demostrado su repercusión en múltiples sistemas. La fluorosis, se conoce como una pigmentación presente en los dientes, esto debido a los altos niveles de flúor en agua de consumo de zonas determinadas; este no era considerado un problema grave, debido a la falta de profundización en el tema en cuanto a sus repercusiones sistémicas.

El objetivo de esta investigación es demostrar no solo el ya conocido efecto nocivo de altas concentraciones de flúor sobre los órganos dentales, sino dar a conocer datos específicos del daño de este elemento a otro nivel, por medio de una evaluación genética específica, y considerando procesos como la apoptosis que desencadena la aplicación de diversas concentraciones de flúor a células de hueso. Es importante mencionar que se conoce como apoptosis al proceso ordenado por el cual la célula muere ante estímulos extra o intracelular, ésta es fundamental en el desarrollo de órganos y sistemas, en el mantenimiento de la homeostasis del número de células y de defensa frente a patógenos, si este proceso se altera produce graves malformaciones, defectos en el desarrollo enfermedades autoinmunes, o neurodegenerativas. Una de las alteraciones sistémicas importantes causadas por flúor es la fluorosis esquelética la cual es causada por altas concentraciones de fluoruro y está basada en la alta formación de osteoblastos, que contribuyen a la rigidez de los huesos y articulaciones por lo que se hacen propensos a fracturas y provoca dolor en las articulaciones. Las lesiones del esqueleto son osteoclásticas y osteocondríticas, observándose condensación y reabsorción ósea, periostosis y condostosis con calcificación y osificación del sistema cartilaginosa (Fuentes, 2007).

La fluorosis esquelética tiene consecuencias más serias y puede resultar de un prolongado consumo de agua con altos niveles de flúor, de 4 a 15 ppm. Un estudio realizado en el norte de Tanzania reveló una alta incidencia de anomalías en los huesos de sujetos mayores que usualmente consumían agua con altos niveles de flúor (Fuentes, 2007). Los exámenes radiológicos demostraron que los huesos son muy densos o escleróticos y que la calcificación anormal es común en los ligamentos intervertebrales, donde los tendones unen los músculos con los huesos y en áreas intraóseas.

La principal ruta de absorción del fluoruro es por el tracto gastrointestinal, aunque también puede entrar al organismo a través de los pulmones (debido al fluoruro presente en la atmósfera) y por la piel, aunque esto último sólo bajo condiciones muy especiales y sobre todo por contacto con ácido fluorhídrico. La absorción de los fluoruros presentes en la dieta depende de la concentración, solubilidad y grado de ionización del compuesto ingerido (Gutiérrez & Vega, 2005). La concentración de fluoruro plasmático no está controlada homeostáticamente, sino que aumenta o disminuye de acuerdo con los patrones de ingesta de fluoruro. En consecuencia no existe una “concentración fisiológica normal”, el nivel de fluoruro plasmático en una persona sana, en ayunas, que ha vivido durante un tiempo prolongado en una comunidad con agua de consumo fluorada es aproximadamente 1 micromolar (0.019 ppm). En áreas cuyas aguas tienen niveles elevados de fluoruro hay fluctuaciones diarias considerables en la concentración plasmática de éste. (Gutiérrez & Vega, 2005).

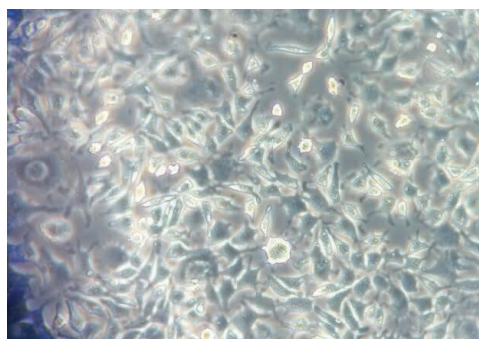
MÉTODOLOGIA

Sobre un cultivo celular de osteoblastos (Figura 1.1), se aplicó medio y tratamiento de flúor (*tabla 1.1*) después de 10 días de tratamiento se realizó extracción de RNA.



Figura 1. 2

Figura 1. 1 Cultivo de osteoblastos



Tratamiento	Células	Medio	Naf	MOI
Control	100	4000	-	-
MOI	100	-	-	4000
1	100	3843	57	-
1.5	100	3815	85	-
3	100	3729	171	-
5	100	3615	285	-
10	100	3330	570	-

Tabla 1. 1 Tabla de contenido celular, tratamientos y medio.

Extracción de RNA

Se agregaron 2 mL de “triple express”, para luego almacenar durante 8 min, posteriormente se agregaron 2 mL de medio y se llevó a centrifugar por 10 min a 4°C, se descartó el material sobrenadante por medio de decantación y se agregó 1 mL de PBS, y se resuspendió.

Se añadió 1 mL de “trizol” (Figura 1.2) a cada tubo, se colocó en vortex 15 segundos y se incubó por 5 min a temperatura ambiente, se añaden 200 mL de cloroformo, con agitación a mano por 15 segundos, procedimiento en vortex por 2 min, se dejó reposar a temperatura ambiente de 2 a 3 min.

Posteriormente se colocó en vortex y se centrifugó 12000g por 15 min a 4°C, separamos fase acuosa en tubo eppendorf, se añadieron 500 mL de isopropanol al 100% (Figura 1.3) y se almacenó 1 hr en hielo, se incubó por 10 min, posteriormente centrifugación a 12000 g por 10 min a 4°C, eliminar sobrenadante y añadir 1 ml de etanol al 75%, se eliminó el sobrenadante conservando el “pellet”. Se colocó la muestra en vortex para luego centrifugar a 7500g por 5 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante, se secó el pellet de 5 a 10 min a temperatura ambiente, se agregaron 50 mL de agua ultrapura y se incubó en baño maría a 55-60°C durante 10 a 15 min.

Análisis de PCR

La técnica de amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa “PCR” es una técnica que consiste en la amplificación in vitro de un fragmento de ADN específico. Es necesario conocer la secuencia del fragmento a amplificar (un gen, una parte de él gen, una región no codificadora, etc.) lo cual consiste en replicar el fragmento una y otra vez un mismo fragmento de ADN. Para esto se requiere de un tubo de ensayo con la especie de objeto de estudio, a esto añadir un par de oligonucleótidos que actúen como cebadores para la ADN polimerasa. La elección de estos oligonucleótidos (cebadores o primers) es crucial dado que han de delimitar la región a amplificar. Además del ADN

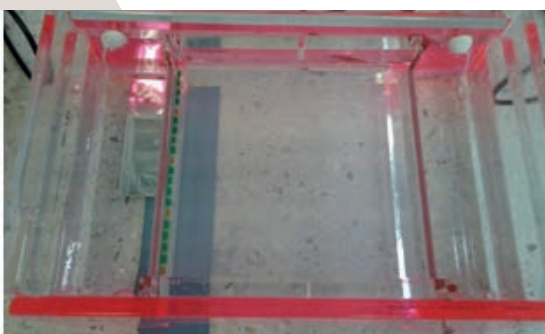


Figura 1.4

y de los primers, es necesario añadir al tubo de reacción los 4 tipos de desoxiribonucleótidos trifosfatos (dNTPs) que componen el ADN (dATP, dGTP, dTTP, y dCTP, son mezcla equimolar de cada uno de ellos). Y finalmente ADN polimerasa, capaz de resistir las elevadas temperaturas a la que vamos a someter a nuestro tubo de reacción. Esta ADN polimerasa es la llamada Taq-polimerasa, aislada de la bacteria *thermus aquaticus*.

Una vez que tenemos todos los componentes en nuestro tubo de reacción, tenemos que favorecer de alguna forma que ocurra la síntesis de ADN favoreciendo la desnaturalización. Se permite el alineamiento de los primers y facilita que la polimerasa lleve a cabo la síntesis de ADN utilizando como cebadores los extremos 3 de los primers utilizados, así la reacción constaría de 3 pasos: 1) desnaturalización 2) alineamiento 3) extensión

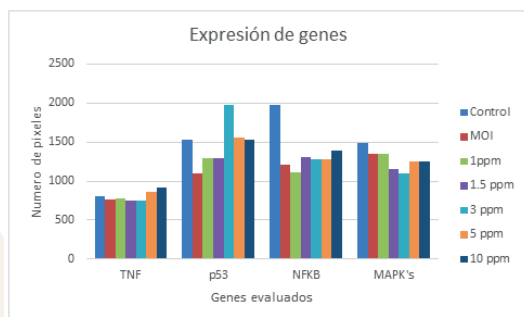


Figura 1.5 Expresión de genes relacionados a inflamación y apoptosis

La electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida es una de las metodologías más utilizadas en el laboratorio (Figura 1.4). Mediante la electroforesis podemos separar fragmentos de ADN y ARN en función de su tamaño, visualizarlos mediante una sencilla tinción, y de esta forma determinar el contenido de ácidos nucleicos de una muestra, teniendo una estimación de su concentración y grado de entereza. Podemos además extraer del gel los fragmentos de ADN que sean de interés, para posteriormente utilizarlos en diferentes aplicaciones. (Fierro Fierro). Para la elaboración del gel se utilizaron 30 mL de TAE y 300 mg de agarosa, se calentó hasta disolver, se dejó enfriar a temperatura ambiente y finalmente se agregó bromuro de etilio (5 mL). Se procedió a colocar en cada pozo dosis unificada del PCR elaborado y posteriormente se realizó la lectura de resultados tras exposición a rayos UV del gel.



Figura 1.3

RESULTADOS

Se realizó una evaluación de los siguientes genes: factor de necrosis tumoral (TNF), p53 también llamado “guardián del genoma”, factor nuclear Kapa de células B (NFKb) y de proteínas activadas por mitógenos (MAPKs) de las cuales se observó un aumento en concentraciones de 3 ppm en relación al control, de p53 y se observó una inhibición de MOI, 1 y 1.5. Y finalmente un ligero aumento en 5 y 10 ppm, en NFKB se encontró una inhibición proporcional con relación al control, cifras más constantes en TNF con un ligero aumento en concentraciones de 5 y 10 ppm. Finalmente se observó una inhibición en 1.5 y 3 ppm del gen MAPKs en cuanto a genes relacionados a la inflamación frente a exposición de diferentes concentraciones de

flúor (Figura 1.5).

Por otra parte, en la expresión de genes relacionados a la formación de hueso (Figura 1.6) se observó la presencia de osteocalcina de las cuales se presenta una disminución en tratamiento de 1 ppm de flúor con relación al control, en relación a osteopontina los resultantes son variables con inhibición de concentraciones de 1 y 1.5 ppm con un marcado aumento de MOI y 5 ppm, manteniéndose a la par tratamientos 3 y 10 ppm al control, en osterix el otro gen evaluado involucrado en formación de hueso, tenemos inhibición de MOI, 1 y 1.5 ppm, finalmente Runx2 el gen clave asociado con la diferenciación de los osteoblastos tenemos una disminución de todos los tratamientos principalmente de 1 y 10 ppm

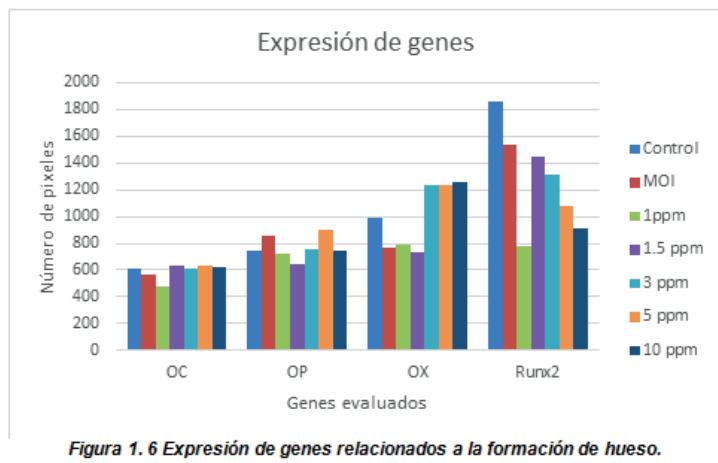


Figura 1.6 Expresión de genes relacionados a la formación de hueso.

CONCLUSIONES

De manera general y preliminar se puede concluir que hubo una disminución en concentraciones de tratamientos de 1 ppm, 1.5 ppm y 3 ppm en la expresión de genes relacionados con la inflamación y la apoptosis, haciendo una excepción con el gen p53 remarcando un aumento en concentración de ppm con relación al control y en cuanto a expresión de genes relacionados con la formación y diferenciación de hueso tenemos resultados similares en las concentraciones de 1, 1.5 y 3 ppm en este grupo también podemos incluir el medio osteoinductor haciendo la excepción en el gen osterix el cual presenta aumento por encima del control en el tratamiento 3 ppm al igual que el 5 y 10 ppm. Con estos resultados podemos demostrar un avance significativo a nuestra hipótesis a cerca del flúor y su afección a nivel sistémico en altas concentraciones, en este caso específicamente con osteoblastos, de esta manera fomentar la continuación de investigación acerca del tema y permitiendo dejar a un lado la idea de que el daño causado por el flúor es meramente estético.

BIBLIOGRAFÍA

- Fierro, F. (s.f.). <http://www2.inecc.gob.mx>. Recuperado el 13 de 07 de 2017, de <http://www2.inecc.gob.mx>: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/710/electroforesis.pdf>
- Fuentes, I. H.-G. (2007). Fluorosis dental: no solo un problema estético. *Revista Cubana de Estomatología*.
- Gerald, K. (2014). Biología celular y molecular. . En K. Gerald, *Biología celular y molecular*. (págs. 386-611). DF : Mexico .
- Gutiérrez, J. R., & Vega, L. H. (2005). Fluorosis dental: Metabolismo,. *adm*.
- Larquin, N. L., Rubio, E. Z., & Vale, L. G. (2015). EFECTOS DE LA INGESTIÓN PROLONGADA DE ALTAS CONCENTRACIONES DE. *organo científico estudiantil de ciencias medicas de cuba* .
- Owen, J., Jenni, P., & Stranford, S. A. (2014). KUBY INMUNOLOGIA . En J. Owen, P. Jenni, & S. A. Stranford, *KUBY INMUNOLOGIA* (págs. 678-682). DF: Mexico .

PROPIEDADES ELECTROQUÍMICAS DEL COMPÓSITO AlN/Mg

Alondra Zapata Flores¹ y Josefina García Guerra²

RESUMEN

Las propiedades de los materiales compuestos de matriz de aluminio reforzados con partículas cerámicas (AlN) dependen de su microestructura, composición, proceso de conformación, tamaño y distribución de las partículas de refuerzo y grado de adhesión entre la matriz y las partículas. El comportamiento de resistencia a la corrosión se evaluó mediante ensayos electroquímicos, empleando las técnicas de polarización de Tafel. Los resultados preliminares muestran que la incorporación de partículas de AlN a la matriz de aluminio mejora la resistencia a la corrosión obteniendo potenciales más positivos, con respecto a la aleación. Así mismo se observa que el mecanismo de corrosión presente es por picadura

ABSTRACT

The properties of ceramic matrix reinforced aluminum matrix composites (AlN) depend on their microstructure, composition, process of formation, size and distribution of the reinforcing particles and degree of adhesion between the matrix and the particles. The behavior of corrosion resistance was evaluated by electrochemical tests, using Tafel polarization techniques. Preliminary results show that the incorporation of AlN particles into the aluminum matrix improves the corrosion resistance obtaining more positive potentials with respect to the alloy. It is also observed that the mechanism of corrosion present is by pitting

Palabras Clave: material compuesto, corrosión, microestructura

INTRODUCCIÓN

Los materiales compuestos son combinaciones macroscópicas de dos o más materiales diferentes que poseen una interfase discreta y reconocible que los separa. Debido a ello, son heterogéneos (sus propiedades no son las mismas en todo su volumen). La gran mayoría de los materiales compuestos utilizados en la actualidad son diseñados y “fabricados” por el hombre. Están formados por una fase continua llamada matriz, puede ser metálica, cerámica u orgánica, así como una fase de refuerzo dispersa en la matriz y puede ser en forma de fibra o partículas. Generalmente los componentes son distintos en propiedades, siendo uno ligero, rígido y frágil y el otro suele ser tenaz y dúctil. Las combinaciones en materiales compuestos pueden ser metal/metal, metal/cerámico, metal/polímero, cerámico/polímero, cerámico/cerámico o polímero/polímero. La unión de estos materiales disímiles dará lugar a materiales con propiedades poco usuales como: rigidez, resistencia, densidad, rendimiento a elevada temperatura, resistencia a la corrosión, dureza, o conductividad eléctrica y térmica. En el caso de los compuestos de matriz metálica, los tipos de refuerzo se pueden clasificar en tres categorías: fibras, whiskers o partículas. El uso de partículas como refuerzo tiene una mayor acogida en los materiales compuestos de matriz metálica (CMM), ya que asocian menores costos y permiten obtener una mayor isotropía de propiedades en el producto. Sin embargo, para tener éxito en el desarrollo de CMM se debe tener un control estricto del tamaño y la pureza de las partículas utilizadas. Los refuerzos típicos de mayor uso en forma de partículas son: carburos (TiC, B₄C), óxidos (SiO₂, TiO₂, ZrO₂, MgO) y nitruros (AlN, Si₃N₄). Sin embargo, en los últimos años se han empezado a utilizar partículas de intermetálicos, principalmente de los sistemas Ni-Al y Fe-Al.

MÉTODOS Y MATERIALES

El material compuesto AlN/Mg fue obtenido empleando la técnica de infiltración sin presión externa de la aleación AZ91E en preformas porosas (52%) de AlN ($D_{50} = 3 \mu\text{m}$) a temperatura de 850 °C y tiempo de 2 horas. Adicionalmente los compósitos AlN/Mg obtenidos fueron sometidos a tratamiento térmico (T6) a 530°C durante 2.5h, seguido de un templado en agua y finalmente un envejecido artificial a 190°C por 12 h. Todos los procesos fueron llevados a cabo en atmósfera controlada de Argón.

El comportamiento electroquímico de los compósitos en medio salino (3.5% NaCl), fue evaluado empleando las técnicas de OCP y la técnica de polarización Tafel a condiciones de $\pm 500 \text{ mV}$ en función del potencial de corrosión. Se utilizó una celda con arreglo de tres electrodos, como electrodo de referencia se empleó un calomel (+ 0.241V vs SHE), como electrodo auxiliar se empleó gráfico y como electrodo de trabajo se emplearon sustratos de material compuesto AlN/ Mg. El cambio microestructural, la morfología y el aspecto superficial de los compósitos fue evaluada por microscopía electrónica de barrido. Los ensayos se realizaron en un potencióstato ACM GillAC. Figura 1a. Las probetas empleadas en los ensayos corrosivos fueron de aleación de aluminio y material compuesto con y sin tratamiento térmico AlN/Mg, de dimensiones 1x1x2 cm, las cuales fueron metalográficamente preparadas con papel abrasivo de SiC grado 400, 600, 1000 y 2000, las cuales fueron montadas en resina epóxica con un cable de cobre que nos permitió realizar las pruebas electroquímicas véase la Figura 1b.

a)



b)

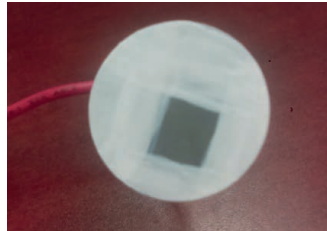
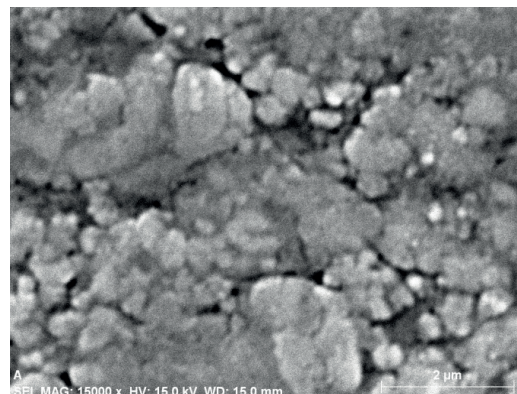


Figura 1 Potenciostato empleado y sustratos en resina

RESULTADOS

La distribución de los constituyentes de un material compuesto, es lo que determina las propiedades de un material, por lo que es de suma importancia caracterizar la microestructura. La figura 2a muestra la micrografía SEM del compuesto AlN/Mg obtenido por infiltración a 850°C durante 2h. Se aprecia la dispersión homogénea de las partículas cerámicas (fase clara) que se encuentra en una proporción aproximada del 52% de partículas de AlN en relación con un 48% de la matriz metálica (fase oscura). Se exhibe que el compuesto presenta una baja porosidad remanente, lo cual indica una completa infiltración de la preforma y buena adhesión interfacial. Confirmando la composición química el análisis EDS de la figura 2b en donde se observa la señal de elementos químicos tales como Mg, Al, N que pertenecen a los constituyentes del material compuesto.

a)



b)

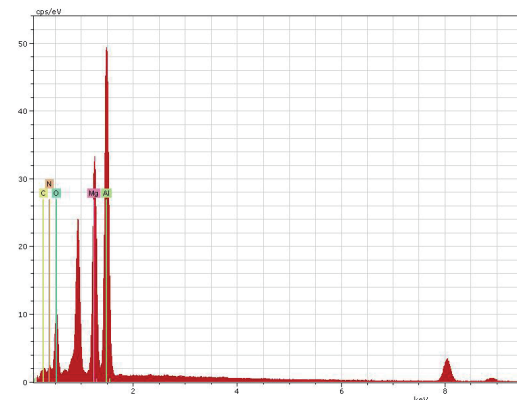


Figura 2 Micrografía SEM de muestras del compuesto AlN/Mg (a) y análisis EDS (b)

Las propiedades electroquímicas evaluadas a partir de la técnica de polarización de Tafel se muestra en la figura 3, en donde se observan las curvas características Tafel de estos materiales. Es evidente que la rama anódica consiste básicamente del proceso de disolución del metal, la cual está limitada por un proceso de transferencia de carga, sin embargo al final de la curva, la pendiente anódica aumenta indicando la absorción superficial de productos de corrosión. En cuanto a la rama catódica se observa que el proceso de corrosión está controlado por la difusión del oxígeno. Como indicadores de una mayor resistencia a la corrosión de los compósitos se tienen los valores de E_{corr} e I_{corr} , puesto que muestran un desplazamiento hacia una dirección positiva de sus

valores, tal como se muestra en tabla 1. Así mismo de acuerdo a los valores obtenidos de los parámetros electroquímicos se observa que en el medio salino de mayor pH, el proceso corrosivo se encuentra en una región de pasivación, debido a la formación de óxidos que protegen o actúan como barrera protectora de la superficie. Específicamente la presencia de cloruros favorece la formación de corrosión localizada aunado a ello la disimilitud del par matriz-cerámico favorece la formación una celda de aireación diferencial. La figura 1b indica que el ataque corrosivo es de tipo localizada específicamente por picadura.

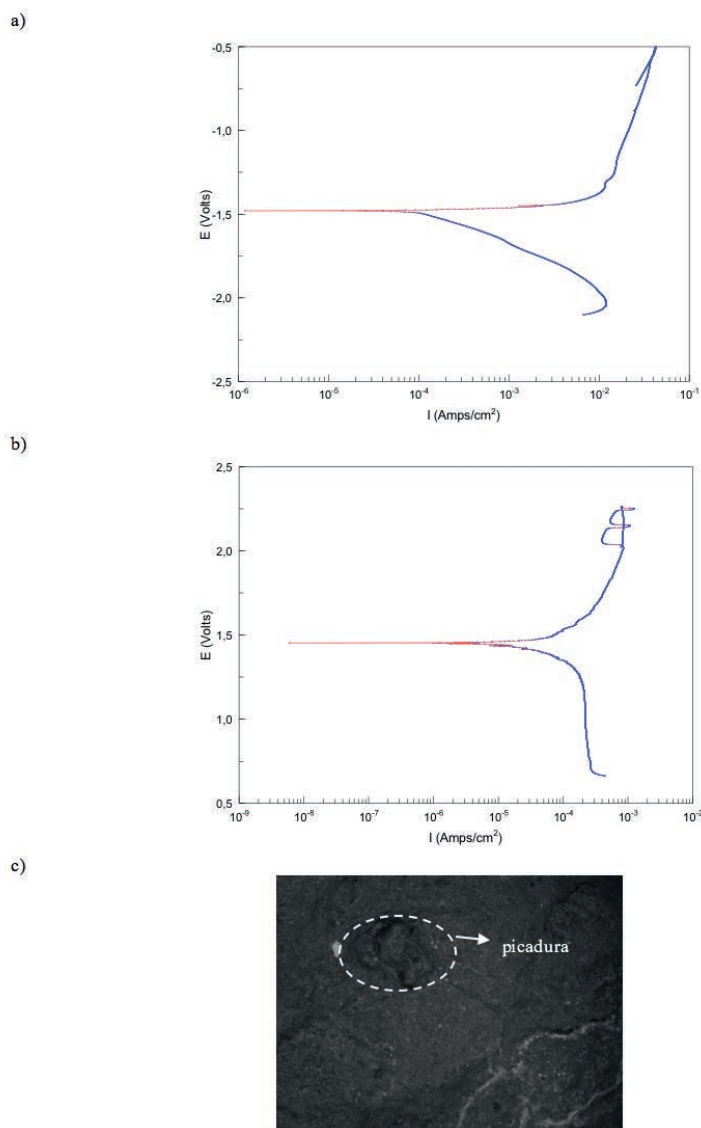


Figura 3 Curvas Tafel en un medio NaCl de pH: a) 8 y b) 12 y c) Imagen de tipo de corrosión

Además se observa de las curvas que el potencial de corrosión es igual al potencial de picadura ($E_{corr} = E_{pic}$), esto indica que todos los sustratos evaluados se corroen y se pican a un potencial igual al potencial de corrosión cuando estos se polarizan anódicamente en presencia de cloruros. Este proceso corrosivo se presenta principalmente como consecuencia de la dispersión de las partículas cerámicas de AlN en la matriz de aluminio, las cuales interrumpen la continuidad de la película natural del óxido de aluminio. Estos sitios catódicos favorecen la reacción de reducción del oxígeno: ($O_2 + 2H_2O + 4e^- \rightarrow 4OH^-$) la cual produce un aumento en la concentración de iones OH^- en la superficie. Esto favorece la disolución de la película defectuosa de óxido y como consecuencia la iniciación de la picadura, debido al incremento de pH en las regiones activas. Finalmente En la tabla 1 es posible observar que el mayor valor de velocidad de corrosión es para el compuesto en el medio salino de pH 8. Este comportamiento puede ser atribuido a la ruptura de la película de productos de corrosión (película pasivante) debido a la acción de los iones cloruro generando con esto un incremento en la velocidad de corrosión. La disminución de la velocidad de corrosión en los compósitos AlN/Mg en el medio alcalino, se atribuye a la presencia de óxidos que recubren la superficie.

Tabla 1 ~~Parámetros electroquímicos Tafel~~

Muestra	E_{corr} mV	i_{corr} A/cm ²	β_c	β_a	MPY
AlN/Mg (pH 8)	-1.4807	1.9204x10 ⁻⁴	319.53	56.678	0.8741
AlN/Mg (pH 12)	1.4539	3.612x10 ⁻⁵	237.16	170.16	0.16375

CONCLUSIONES

El comportamiento de resistencia a la corrosión se evaluó mediante ensayos electroquímicos, empleando las técnicas de polarización de Tafel. Los resultados preliminares muestran que la incorporación de partículas de AlN a la matriz de aluminio mejora la resistencia a la corrosión obteniendo potenciales más positivos, con respecto a la aleación. Así mismo se observa que el mecanismo de corrosión presente es por picadura.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Hiromitsu Kaneda, Fabrication of particulates reinforced magnesium composites by applying a spontaneous infiltration phenomenon, Journal of Materials Science, vol 32, pp. 47-52, 1995.
- (2) Rudajejová A. and Lukác P., On thermal characteristics of mg based composites, Acta Mater., 51, pp.133-137, 2004
- (3) K. K. Alaneme and M. O. Bodunrin, Journal of Minerals & Materials Characterization & Engineering 10 (12),(2011), 1153- 1165.
- (4) L.A Falcón Franco, Comportamiento a la corrosión y al desgaste por deslizamiento del material compuesto MgAZ91E/56% TiC, Instituto de Investigaciones Metalúrgicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
- (5) A. Albiter, A. Contreras, M. Salazar, J.G. Rodríguez. "Corrosion behavior of aluminum metal matrix composites reinforced with TiC processed by pressureless melt infiltration".J. Applied Electroch. 36:303-308 (2006)

GENERACION DE MUTANTES EN EL HONGO PATOGENO *Sporothrix schenckii*

Ana Delia Morales Requeses¹ y Héctor Manuel Mora Montes²

RESUMEN

Sporothrix schenckii es un hongo patógeno dimórfico y el agente etiológico de la esporotricosis humana y animal. El hongo pertenece a la subdivisión *Deuteromycotina*, clase hifomicetos, Por lo tanto, es necesario trabajar en nuevas estrategias para la manipulación genética del hongo para poder desarrollar alternativas contra sus efectos patógenos.

En el siguiente reporte se hablará de un nuevo método de modificación genética, donde en lugar de silenciar un gen, lo mutaremos utilizando la tecnología CRISPR/Cas9, haciendo uso del plásmido pCRISPR/Cas9-U6-1. Para llevar a cabo la transformación del hongo se utilizó la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

ABSTRACT

Sporothrix schenckii is a dimorphic fungal pathogen and the etiological agent of human and animal sporotrichosis. The fungus belongs to the *Deuteromycotina* subdivision, class hyphomycetes. Therefore, it is necessary to work on new strategies for the genetic manipulation of the fungus. To be able to develop alternatives against the pathogenic effects.

In the next report, we will talk about a new genetic modification method, where instead of silencing a gene, this will be mutated using the CRISPR/Cas9 technology, and the plasmid pCRISPR/Cas9-U6-1. To do the fungal transformation the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation was used.

Palabras Clave: *Sporothrix*, pathogen, pCRISPR/Cas9-U6-1, *Agrobacterium*, plasmid.

INTRODUCCIÓN

Sporothrix schenckii se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza y se pueden encontrar en el suelo, asociado con la materia orgánica de la planta, agua y materia orgánica en descomposición, entre otros. *S. schenckii* produce colonias húmedas con un aspecto membranoso y una superficie arrugada o doblada. Al principio, las colonias son de color crema, más adelante se ponen marrones de color gris oscuro y negro. Durante el cultivo, las colonias pueden perder irreversiblemente su color oscuro, llegando a ser de color blanco cremoso.

La proteína Gp70 es un antígeno importante y adhesina expresada en la superficie celular de estos hongos, y puede tener un papel clave en la inmunomodulación y respuesta del huésped. (Lacaz, 2002)

El sistema CRISPR/Cas9 consta de dos componentes: una sola nucleasa Cas9 y un ARN-guía único. (Takayuki, 2015).

MÉTODOS Y MATERIALES

Construcción de los vectores U6-1 y U6-2 con sgRNA para gp70.

Se alinearon los oligonucleótidos para el sgRNA de la gp70 y los vectores se cortaron con la enzima BsmBI y se incubaron por 3h a 37°C.

Se pusieron las ligaciones como se muestra a continuación:

	U6-1	U6-2
Buffer	1.0 µl	1.0 µl
T4 ligasa	1.0 µl	1.0 µl
Oligonucleótidos	1.0 µl	1.0 µl
pBGgHg	2.0 µl	3.0 µl
H ₂ O	5.0 µl	4.0 µl
	10.0 µl	10.0 µl

Se incubaron a 22°C toda la noche.

Transformación de *E. coli*

Se hizo transformación de *E. coli* y las células se sembraron en placas con medio LB con antibiótico y se dejó incubando 12 hrs a 37° C. Las colonias que crecieron en las placas se inocularon en medio LB con antibiótico

Cosecharon las células por medio de centrifugación durante 5 min a 11000 rpm en micro tubo estériles.
 Se eliminó completamente el medio y resuspendió con 50 µl de solución I. Mezcló en vortex.
 Se añadió 200 µl de solución II y se mezcló invirtiendo el tubo suavemente 3 veces. Se incubó en hielo 5 min.
 Se agregó 150 µl de solución III agitando en vortex. Se incubó en hielo 5 minutos.
 Se centrifugó 5 min y tomó el sobrenadante para colocarlo en un micro tubo limpio. Luego se añadieron 500 µl de fenol: cloroformo. Se mezcló en vortex.
 Se centrifugó 5 minutos y tomó la fase superior para depositarla en un micro tubo nuevo.
 Se Agregó 1 ml de etanol absoluto. Se agitó en vortex y centrifugó por 5 min a 1100 rpm.
 Se eliminó el sobrenadante para agregar 500 µl de etanol al 70%. Se dio vortex y centrifugó por 2 min. (se repitió este paso solo 2 veces para asegurar el lavado).
 Se corrió en gel de agarosa al 0.8% con BrEt a 90V por 45min.

Clonación de U6-1 y U6-2 en el vector pBGgHg.

Restricciones:

U6-1	4.0µl	U6-2	4.5µl
Buffer Tango	5.0µl	Buffer Tango	5.0µl
BsmB1	2.0µl	BsmB1	2.0µl
H ₂ O	39.0µl	H ₂ O	38.5µl
	50.0µl		50.0µl

PCR

Se realizó una PCR con pCRISPR. Las condiciones fueron:

Buffer	2.5µl
MgCl ₂ (25mM)	1.5µl
Dntp (10mM)	.5µl
Taq DNA polimerasa	.2µl
Oligo D	1µl
Oligo R	1µl
DNA molde	1µl
H ₂ O	17.3µl
	25µl

Incubar en el termociclador con las siguientes condiciones:

1 minuto a 94°C- Desnaturalización.
 30 segundos a 55°C – Hibridación
 40 segundos a 72°C – Extensión
 30 ciclos.

Transformación de *Agrobacterium*

Se añadió el plásmido a las células de *Agrobacterium*, se congelaron con nitrógeno líquido, se les dio un choque térmico a 37°C por 5 min. Se les adicionó medio LB y se incubaron a 28°C a 250 rpm 3 horas. Se pasó a placas con medio LB y los antibióticos necesarios y se incubó a 28°C por 2 días.
 Se les extrajo pDNA y se corroboraron por PCR y restricción con Hind III.

TRANSFORMACION mediada por *Agrobacterium tumefaciens* de *S. schenckii*

Preparamos el medio de inducción, con y sin Acetoserinogona. Se checó el crecimiento de las células de *Agrobacterium* a D.O._{600nm} se ajustaron las células a una densidad de 0.2 con el medio de inducción y se dejaron incubando por 4h. Se cosecharon los conidios de *S. schenckii* y se ajustaron a una concentración de 1x10⁶ cel/ml. En cajas con medio YPD se colocó un celofán estéril y se añadieron 100µl de los conidios y 100µl de células de *Agrobacterium*, se incubaron por 3 días a 28 °C.

RESULTADOS

Clonación de los oligos de sgRNA de gp70 en los vectores U6-1 y U6-2

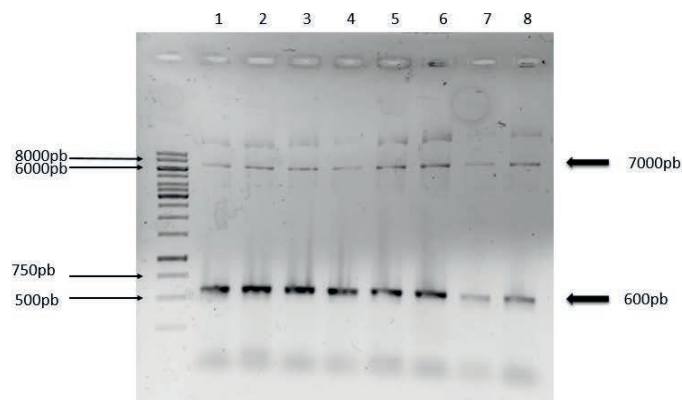


Fig.1 Comprobación por PCR de las clonaciones previamente hecha. En los carriles 1,2,3 y 4 podemos ver la muestra con el vector U6-1. Mientras que en los carriles 5, 6, 7 y 8 vemos las muestras con el vector U6-2.

Clonación de las construcciones U6-1 y U6-2 en el vector pBGgHg

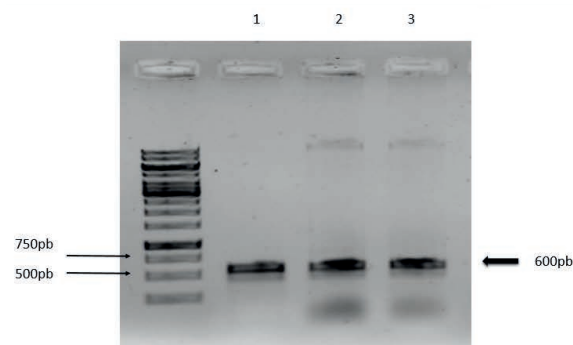


Figura 2. Corroboración por PCR de la clonación en el vector pBGgHg. En el carril 1 y 2 que son nuestras clonaciones con U6-1 podemos observar las construcción con *e.coli* y con pBGgHg que son positivas, al igual que en el carril 3 solo que este con U6-2.

Transformación de *Agrobacterium* con las construcciones en pBGgHg

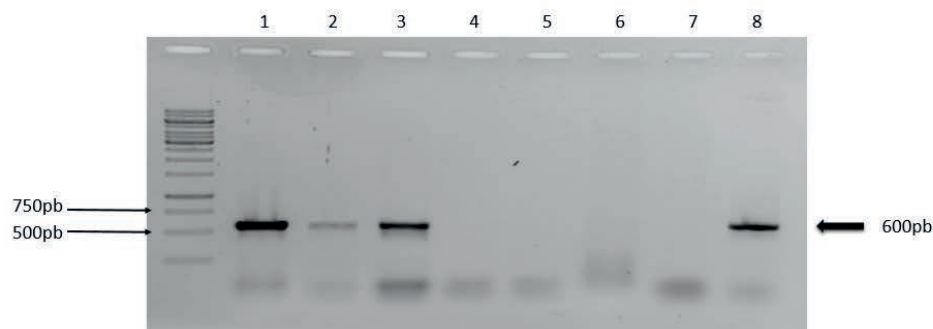


Figura 3. Comprobación por PCR y con HindIII. En los carriles del 1-8 tenemos DNA plasmático de *Agrobacterium* en los cuales solo en 3 carriles que son 1, 3 y 8 nos dieron el resultado deseado, ya que en 2 tiene baja concentración y en los demás fue nulo.

Transformación mediada por *Agrobacterium* de *S. schenckii*

En las siguientes imágenes se muestra el crecimiento de la AGL1 y la muestra Agro8 c/s AS en cajas de medio YPD unas con AS y otras sin, se colocaron un papel celofán en cada una y se añadieron las muestras respectivas con medio de inducción y conidios de *s. schenckii*. Resultado después de ser incubadas por 3 días.



Figura 4. *Agl1*+AS



Figura 6. *Agro 8* +AS

Figura 5. *Agl1*



Figura 7. *Agro 8*

CONCLUSIONES

El estudio realizado para la generación de mutantes de *Sporothrix schenckii* está arrojando resultados positivos. Anteriormente se había silenciado una parte del gen. En cambio, en este trabajo de experimentación, se desarrolló una estrategia para su mutación y con ello, una pérdida permanente de su función biológica..

BIBLIOGRAFIA

HEKTOEN L AND PERKINS CF. 1900. Refractory subcutaneous caused by *Sporothrix schenckii*. A new pathogenic fungus. J Exp Med 5: 77– 89.

KWON-CHUNG K AND BENNETT J. 1992. Sporotrichosis. In: KWON-CHUNG K ET AL. (Eds), Medical Mycology, Philadelphia: Lea&Febiger, p. 707– 729.

LACAZ CS, PORTO E, MARTINS JEC, HEINS-VACCARI EM AND MELO NT. 2002. Tratado de Micología Médica, Savier (Ed), São Paulo, 9a ed., p. 479– 497.

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.

Carlos A. Alba-Fierro, Armando Pérez-Torres, Everardo López-Romero, Mayra Cuéllar-Cruz, Estela Ruiz-Baca. (January–March 2014). Cell wall proteins of *Sporothrix schenckii* as immunoprotective agents.. Revista Iberoamericana de Micología., 31, 86-89. 5 de agosto de 2016, De ScienceDirect Base de datos.

Gao Y, Zhao Y. 2014. Self-procesamiento de ribozyme- Florida ARN flanqueado en ARN de guía in vitro e in vivo para la edición genoma CRISPR mediada. J Integr Plant Biol 56 (4): 343 - 349.

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/esporeticosis.html>

Takayuki Arazoe, Kennosuke Miyoshi, Tohru Yamato, Tetsuo Ogawa, Shuichi Ohsato, Tsutomu Arie, Shigeru Kuwata. “Tailor-Made CRISPR/Cas System for Highly Efficient Targeted Gene Replacement in the Rice Blast Fungus” Biotechnology and Bioengineering, Vol. 112, No. 12, December, 2015.

AISLAMIENTO DE BEGOMOVIRUS EN PLANTAS PREVIAMENTE INFECTADAS MEDIANTE BIOBALÍSTICA.

de la Vega Montoya Arturo¹ y Argüello Astorga Gerardo Rafael²

RESUMEN

Año tras año los campos de cultivo se ven más afectados por diversos factores, uno de suma importancia, los virus, pues estos tienen la capacidad de infectar a un gran número de especies de plantas y propagarse en muy poco tiempo, dañando gravemente muchos de los cultivos consumidos globalmente provocando su muerte, déficit de crecimiento en plantas y frutos, amarillamiento, enrollamiento de hojas, etcétera. Se utilizaron distintas pruebas complementarias para aislar dos virus del género *Begomovirus* de plantas previamente infectadas, con el propósito de que en un futuro próximo facilite su estudio exhaustivo y mediante técnicas moleculares, se pueda crear resistencia en las plantas y un modo de inhabilitar su actividad dentro de la célula, evitando así su propagación.

ABSTRACT

Year after year crop fields are affected by numerous factors, one of the more significant, virus, this transmissible agents have the capacity to infect a large number species of plants and to spread out in a very short time, damaging seriously lots of the crops consumed worldwide causing its death, slow plant and fruit rate growing, yellowing, leave enrollment, etc. They were used distinct complementary techniques to isolate two virus of the Begomovirus genus of previously infected plants, with the main purpose to, in a near future, facilitate its exhaustive study and, through molecular techniques, create resistant plants to virus and a discover a new way to disable its activity inside the cell machinery, preventing its propagation.

Palabras Clave: *Geminivirus*, *Begomovirus*, *Bemisia tabaci*, PCR, Digestión enzimática.

INTRODUCCIÓN

La importancia del estudio de los virus en plantas radica en que estos afectan a muchos de los principales cultivos alrededor del mundo que el ser humano consume diariamente. Según López (2002), nuestra mayor limitación en el tema es precisamente el conocimiento, ya que aún se desconocen muchas características de los virus que afectan, en este caso, a los cultivos, muchas de ellas siendo dudas de cómo se transmiten de planta a planta por medio de sus vectores. Los insectos son los vectores de transmisión más importantes para este tipo de virus. En la etapa de infección de un virus hay dos fases: la primera, consiste en la replicación del virus dentro de la célula huésped, la segunda, en esparcirse a nuevas células sanas, llegando a diferentes partes del tejido de la planta y a nuevas plantas.

Este proyecto se basó en virus de la familia *Geminiviridae*, la cual posee un ADN circular monocatenario y unas características partículas pares isométricas distintivas de la familia, la cual se divide, de acuerdo a su estructura genómica y a la especificidad del vector, en el género *Mastrevirus*, *Curtovirus* y *Begomovirus*, siendo este último nuestra área de enfoque y sobre la cual se llevaron a cabo los experimentos durante todo el verano. Los *Geminivirus* son responsables de enfermedades en cereales, fibras y cultivos vegetales, incluyendo el de maíz, trigo, caña de azúcar, tomate, chile, tabaco, frijol, algodón, calabaza, remolacha y yuca. (Monsalve, Argüello & Rivera, 2002). El género *Begomovirus* es transmitido por insectos de la familia *Aleyrodidae*, insectos conocidos como “mosquita blanca”, los cuales insertan su conducto de alimentación en la hoja para chupar savia de la planta y consecuentemente transmiten los virus que traen, causando grandes daños en los cultivos. Morales expone (2004) que la principal especie de mosca blanca que transmite virus es *Bemisia tabaci*. La mosca blanca adquiere los virus

¹Universidad Autónoma de Coahuila, Facultad de Ciencias Biológicas, Ciudad Universitaria, Carretera Torreón-Matamoros Km. 7.5, C.P. 27000, Torreón, Coahuila, arturomontoya@hotmail.com

²Investigador titular “C”, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. (IPICYT), División de Biología Molecular, Camino a la Presa San José #2055, Lomas 4a. Secc., C.P. 78216, San Luis Potosí, S.L.P., grarguel@ipicyt.edu.mx

de malezas o plantas cultivadas infectadas y después los transmite en unos pocos minutos a plantas sanas susceptibles. Actualmente, América Latina ha sido la región más afectada por el complejo geminivirus-mosca blanca, y lo ha sido en términos del número total del nacimiento de nuevos *geminivirus*, del número de cultivos afectados y áreas agrícolas devastadas por estos patógenos. Curiosamente, los *Geminivirus* y *B. tabaci* habían coexistido en América Latina por décadas, sin afectar las especies de plantas cultivadas (Morales & Anderson, 2001). El potencial de estos virus y sus vectores para diseminarse en nuevas localidades e infectar nuevos hospedantes a nivel mundial es alarmante. El diagnóstico molecular se perfila como una herramienta valiosa que permitirá el reconocimiento temprano de los problemas que se asocian con estos patógenos y sus vectores. Por tanto, es necesario que la identificación sea un proceso permanente, ya que los nuevos complejos geminivirus-vector requieren cambios continuos en las estrategias de manejo (Zúñiga & Ramírez, 2002). Por eso es importante su estudio, conocer su sintomatología tanto en plantas como en sus vectores, si es que tienen alguno, su comportamiento y su manera de replicación así como los genes que utilizan para ello, para poder expresar todas sus características y manifestar sus reacciones, y con esto, podremos saber cómo interactúan y a partir de ahí tratar de crear, mediante técnicas moleculares, algún tipo de control para limitar su propagación hacia otros cultivos sanos e inhabilitarle.

Este trabajo se realizó con el fin de poner en práctica algunas de las herramientas más importantes y básicas para el aislamiento de *Begomovirus*, obtener algunas ideas generales sobre este tipo de virus y su modo de acción, así como la sintomatología que provoca en las plantas.

MÉTODOS Y MATERIALES

El conjunto de técnicas, mencionadas en este reporte, fue creado por el laboratorio de biología molecular de plantas del IPICYT.

Extracción de ADN de plantas *Bemisia tabaci*. Se utilizaron las siguientes variantes: dos plantas infectadas, una con TYLCV y otra con PepGMV (muestras control), y otras plantas de las que averiguaríamos si estaban o no infectadas (muestras problema). Primero, pesamos 50 mg de las hojas de c/planta, se molieron con ayuda de un pistilo, utilizando nitrógeno líquido para facilitar la ruptura de las membranas celulares y homogeneizar el tejido vegetal. Después, se agregaron 480 µl del Buffer de extracción y se molió la muestra un poco más. Se adicionaron 37.5 µl de SDS al 20 % mezclando por inversión los tubos. Luego, se continuó calentando la mezcla a 65 °C por 10 min., para después dejarla enfriar hasta T.A. Se agregaron 94 µl de acetato de potasio y se mezclaron por inversión los tubos. Se dejó reposar en hielo por 5 min. y posteriormente se hizo uso de la centrifuga a 13,000 rpm por otros 5 min. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se le adicionaron 600 µl de fenol:cloroformo (1:1). Se mezcló con vórtex y se centrifugó la muestra a 13,000 rpm por 3 min. Se transfirió nuevamente el sobrenadante a un tubo nuevo (600 µl aprox.), se le agregaron 10 µl de RNasa a cada extracto y se incubaron durante 15 min. durante los cuales actuó la enzima a T.A, degradando el RNA existente. Cumpliéndose el tiempo, se le agregaron 600 µl de isopropanol, mezclando por inversión hasta notar la precipitación del ADN. En seguida, se colocó en hielo por 5 min., se sometió a 13,000 rpm por otros 5 min y se lavó la pastilla con 400 µl de EtOH al 70%; se volvió a poner a 13,000 rpm por 3 min. Por último, se eliminó el sobrenadante, se dejó secar perfectamente en el termomixer y se resuspendió la pastilla en 50 µl de TE, solubilizándose y teniendo protección contra la degradación natural del ADN. Para comprobar que el ADN se extrajo correctamente se realizó electroforesis, cargando los extractos en un gel de agarosa al 1% y se dejó correr la cámara por 1 hora y 15 min. aprox. a 75 V. Para finalizar, se dejó el gel tiñendo en bromuro de etidio por 30 min. y después se observó en la computadora con ayuda de un fotodocumentador.

Amplificación por PCR. Para llevar a cabo la preparación de las muestras se siguieron las medidas de la *Tabla. 1*; para empezar con la reacción en el termociclador para la amplificación del ADN viral, se utilizó el programa Gemini Mot, programa que viene con sus especificaciones en la *Tabla. 2*, ya establecidas.

Tabla. 1. Reacción de PCR

REACTIVO	CONCENTRACIÓN	VOL. X 25 (µl)
H ₂ O		25
Buffer Taq	10 X	5
MgCl ₂	25 mM	3
dNTPs	10 mM	1
Oligo I	10 pmolal	1.5
Oligo II	10 pmolal	1.5
Taq Polimerasa	10 U	2
DNA	100 ng/µl	1
Total		50

Tabla. 2. Programa para *Begomovirus*: Gemini Mot

No	TEMPERATURA	TIEMPO	REPETICIONES	COMENTARIO
1	94°C	3 min.	1 VEZ	Desnaturalización inicial
2	94°C	1 min.		Desnaturalización
3	50°C	1 min.	35 veces	Anneamiento
4	72°C	1 min.		Extensión
5	72°C	5 min	1 VEZ	Extensión Final
6	4°C	30		

Donde los oligos 1 y 2, para las muestras con TYLCV, fueron DGRS For / YMAC Rev; mientras que para muestras con PepGMV, se usaron SL2150 For / YMAC Rev. Para saber si nuestros resultados fueron correctos, se usó un control (+) dif. para cada tipo de virus y, un control (-), sin DNA. Se realizó electroforesis, bajo condiciones ya mencionadas anteriormente, para comprobar la reacción de PCR.

Ligación o Clonación. De inmediato, verificando que nuestra PCR salió bien, se hizo la ligación del producto con un Kit de ligación, que contiene nuestro vector de clonación, el pGEM-T; se dejó incubando durante la noche a 4 °C.

Transformación bacteriana. Primero, se sacaron del ultracongelador las células competentes de *E. coli* (cepa Top10); se dejaron descongelar en hielo. Se les adicionaron 5 µl de c/ligación y se mezclaron brevemente; dejando reposar en hielo. Se transfirieron a 42 °C en baño maría por 90 seg. e inmediatamente, fueron puestos a reposar en hielo. Después, se les agregaron 250 µl de medio LB, se incubaron a 37°C en agitación constante, usando un termomixer. Utilizando la campana de flujo laminar y en condiciones de esterilidad, se prepararon cajas Petri de LB con antibiótico (carbenicilina), el cual fue añadido de manera que por c/ml de medio LB hubiera 1 µl del antibiótico, se distribuyó por toda la caja hasta secar usando un asa, se adicionó IPTG y Xgal, repitiendo hasta secar. Por último, se inocularon cajas con células que se esparcieron hasta secar. Se incubaron a 37 °C durante 18 hrs. aprox.

Minipreps – Extracción de ADN plasmídico. Para comenzar, se eligieron de las cajas 10 colonias blancas aisladas de las demás, cada una se incubó en medio LB-Cb líquido aprox. durante 18 hrs. a 37 °C. Obteniendo biomasa, se centrifugaron las muestras a 8,000 rpm., se les desechó el sobrenadante, se secaron y se resuspendió la pastilla en 100 µl de Sol. I (glucosa, tris y EDTA) mezclando con vórtex. A continuación, se le agregaron 200 µl de Sol. II (SDS y NaOH) y se mezclaron por inversión hasta quedar translúcida. Se le añadieron 150 µl de Sol. III (Acetato de potasio y ácido acético), se mezcló por inversión y se dejó reposando en hielo. En seguida, se centrifugó a 13,000 rpm por 15 min. y el sobrenadante se transfirió a tubos nuevos. Se le agregó RNasa, y se incubó a T.A. Posteriormente se le agregó EtOH, acetato de sodio y se mezcló; se dejó en hielo por 3 min., se centrifugó a 13,000 rpm y se eliminó el sobrenadante. Finalmente, se lavó la pastilla con EtOH, se centrifugó, se secó y resuspendió la pastilla en TE. Para comprobar que las colonias seleccionadas tenían el plásmido se realizó electroforesis.

Digestión simple con EcoRI, y doble con Eco-Hinfl. C/muestra se digirió simple y doblemente con las enzimas EcoRI y Eco-Hinfl respectivamente. Para realizar las digestiones, se mezcló ADN de la muestra, la(s) enzima(s), un buffer específico para la(s) enzima(s) y agua destilada estéril. Luego, se incubaron durante 2 hrs. a 37°C, en ambos casos. En la digestión simple, se usó buffer EcoRI; en la doble se usó buffer 2.1, con los cuales ambas enzimas tienen una efectividad y velocidad de reacción muy próxima al 100%. Por último, se hizo electroforesis con gel de agarosa del 1% para correr la digestión simple, y del 2.5% para la doble; dejando ambas correr por 1.30 hrs.

RESULTADOS

La manera en que se expresaron los resultados fue por fotos de geles, producto de electroforesis, con el apoyo de un fotodocumentador usando luz UV, a continuación, en la Fig. 1, se presenta el resultado de la extracción de ADN.

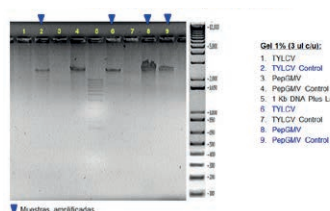


Figura 1. Extracción de ADN, 13-Jun-2017.

Como se puede observar en la figura 1, las muestras amplificadas por PCR fueron aquellas en que las bandas del ADN se conservó y tiñó de mejor manera en el gel, siendo estas las marcadas con azul. Al realizar dos extracciones de c/muestra aseguramos una extracción correcta de mínimo una de cada una de ellas. En seguida, en la Fig. 2, se muestran los productos de la reacción de PCR.

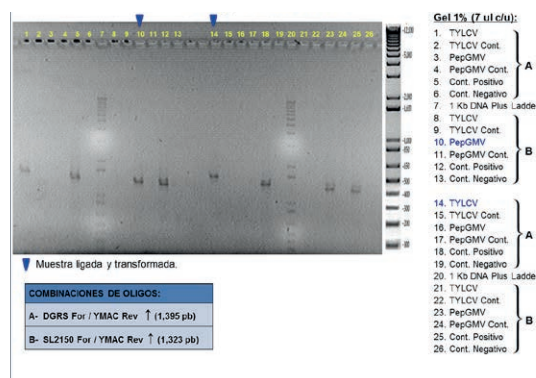


Figura 2. Productos de PCR, 14-Jun-2017.

Nuevamente, la reacción se hizo dos veces por c/muestra. Se obtuvieron resultados correctos en ambos ya que, como puede apreciarse en la Fig. 2, c/producto de PCR (ADN viral) amplificó con su respectiva combinación de oligos, específica para TYLCV y PepGMV. Se usaron las muestras más concentradas, marcadas con azul, para la siguiente parte del procedimiento. La ligación consistió en la incorporación de nuestro fragmenta viral (obtenido en el PCR) al genoma circular de un Vector o Plásmido, para después, en la transformación, introducirlo en células *E. coli* para cumplir un objetivo, la multiplicación del plásmido viral. La transformación consiste en introducir un DNA exógeno (Plásmido-Virus) al interior de las bacterias (células competentes), Al desarrollarse las colonias lo suficiente, tomamos muestras de aquellas que eran blancas, la distinción entre colonias se debe al componente Xgal, agregado al medio, este se hidroliza formando un complejo azul que tiñe a las colonias, estas son células que portan solamente el vector de clonación, mientras que las blancas, contienen el plásmido (vector + virus); la carbenicilina se utilizó para evitar contaminaciones y eliminar células que no contengan vector, este último da la resistencia contra el antibiótico. Para verificar la eficacia de estos pasos se hicieron Minipreps, a los cuales se les realizó la electroforesis de la Fig. 3.

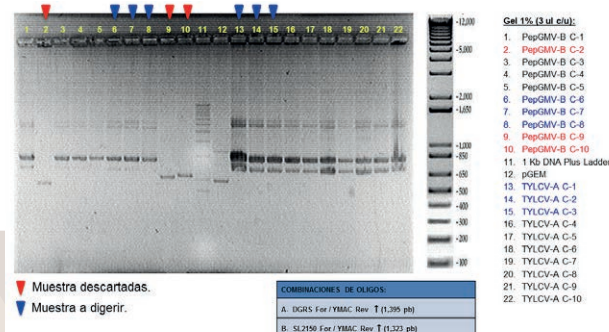


Figura 3. Minipreps, 19-Jun-2017.

Como se ve en la Fig. 3, se observa un patrón principal en el tamaño de las bandas, esto indica que nuestro ensayo fue correcto y sugiriendo que el virus se encontraba dentro del vector, para esto se comparó el vector control (pGEM) ubicado en el carril No 12 a comparación de las muestras donde hay un aumento en el número de pb equivalente a la suma del tamaño del pGEM-T y nuestro ADN viral. Las muestras indicadas con azul fueron seleccionadas para el último paso, la digestión, expuestas en la Fig. 4 y Fig. 5; las marcadas con rojo, fueron descartadas al presentar únicamente el vector y, por tanto, su mismo tamaño de pb, apareciendo en su mismo nivel por debajo del patrón principal.

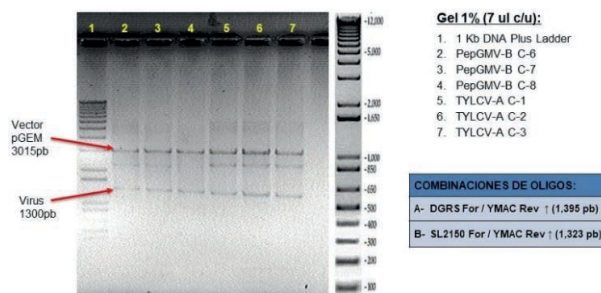


Figura 4. Digestión con EcoRI, 20-Jun-2017.

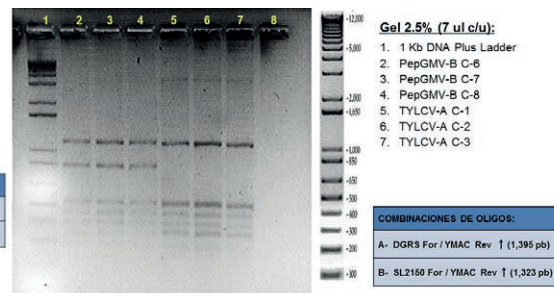


Figura 5. Digestión con Eco-Hinfl, 20-Jun-2017.

Finalmente, se realizaron dos digestiones y se compararon. La digestión simple, Fig. 4, se realizó para verificar si está presente nuestro inserto viral de aprox. 1,300 pb además se debe observar la banda del vector de 3,015 pb, además de estas dos bandas muchas veces se observa una banda intermedia que corresponde a ADN que no se alcanzó a cortar. Y la doble digestión, Fig. 5, se realizó para determinar si hay diferencias entre los patrones de digestión de nuestras muestras y así determinar si está presente solo un virus o hay más de un virus. Y como se ve las 3 últimas muestras no presentan una banda intermedia que sí tienen las primeras. Además, se presentan diferencias en el bandeo en la sección baja; esto comprueba la existencia de dos virus distintos presentes en nuestras muestras problema.

CONCLUSIONES

El estudio de los virus en plantas es un área que se encuentra ya desde hace varios años en estudio continuo, es necesario crear técnicas para tratar de detener la propagación de estos a nuevas especies de plantas, debido a su evolución constante e impedir su proliferación mediante cultivos resistentes a los *Begomovirus*, así como tratar su vector de transmisión, en este caso, la mosquita blanca. Para su estudio es necesario primeramente aislar muy bien el virus para de ahí partir a otras pruebas más avanzadas, como construcciones, con las que se podrá cumplir el primer propósito planteado. Los resultados obtenidos fueron de muestras ya estudiadas por el laboratorio, con lo que nosotros pudimos hacer una comparación final con la literatura de su bitácora, corroborando que los métodos fueron empleados de manera correcta y los resultados finales salieron como se esperaban, obteniendo patrones virales iguales.

BIBLIOGRAFÍA

- KHAN, J. & DIJKSTRA, J. (2002). "Plant viruses as molecular pathogens" en López J. *Genes involved in insect-mediated transmission of plant viruses*. Nueva York: Food product press. [p. 31, 32].
- KHAN, J. & DIJKSTRA, J. (2002). "Plant viruses as molecular pathogens" en Monsalve Z., Argüello G. & Rivera R. *Geminivirus replication and gene expression*. Nueva York: Food product press. [p. 257].
- MORALES, F. (2004). "*La mosca blanca como transmisora de enfermedades virales*". Proyecto Tropical de Mosca Blanca Subproyecto Centro América, México y el Caribe. Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT. Apartado Aéreo 6713, Cali, Colombia.
- MORALES, F. & ANDERSON, P. (2001). "The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America" en *Archives of Virology*, No. 146, p.415. Consultada en <https://doi.org/10.1007/s007050170153> (Fecha de consulta 12-08-2017).
- ZÚÑIGA, C. & RAMÍREZ, P. (2002). "Los geminivirus, patógenos de importancia mundial" en *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*, No. 64, pp. 25-33. Consultada en <http://www.sidalc.net/repdoc/A2040E/A2040E.PDF> (Fecha de consulta 12-08-2017).

Representaciones sociales del agua en usuarios de la comunidad Valle de Arista.

Atziri Azeneth Herrera Valero
Universidad Autónoma de Coahuila
Mtra. Alicia Villagómez Carvajal
Universidad del Centro de México

RESUMEN

La situación actual del planeta en ámbitos ambientales es desfavorable, y aunque mucho se habla de tomar acciones al respecto seguimos haciendo caso omiso y sobreviviendo en medio de la incertidumbre ambiental en la que el actuar pensando en las consecuencias ambientales pasa a segundo plano.

En este trabajo de exploración se busca identificar algunas de las representaciones sociales que tienen los habitantes de Villa de Arista, entre ellos agricultores tanto de temporal como de riego, acerca del agua.

El trabajo se realizó por medio de entrevistas semi estructuradas en las que cada participante brindó su perspectiva y datos sobresalientes que nos permitieron tener un panorama más amplio de la situación actual respecto a los usos del agua en los agricultores. Interesa sobre todo el cómo se percibe el paisaje local desde una perspectiva micro-histórica y de consciencia para los pobladores. De igual manera es importante recuperar la prospectiva de los habitantes y el compromiso que se tiene respecto al agua en su entorno.

Lo anterior permitió llegar a una reflexión de la importancia que los agricultores le brindan a este recurso.

PALABRAS CLAVE

Representaciones sociales, Agua, Medio ambiente

ABSTRACT

The current situation of the planet in environmental areas is unfavorable, and although much is said about taking action on this issue, we continue to ignore and survive in the midst of environmental uncertainty, in which acting with environmental consequences in the background.

In this work of exploration, we try to identify some of the social representations that the inhabitants of Villa de Arista, among them farmers of both temporal and of irrigation, about the water.

The work was done through semi-structured interviews in which each participant provided his perspective and outstanding data that allowed us to have a broader picture of the current situation regarding the uses of water in farmers. It is interesting above all how the local landscape is perceived from a micro-historical perspective and of conscience for the inhabitants. Likewise, it is important to recover the foresight of the inhabitants and the commitment that has to the water in their environment.

This allowed us to come to a reflection of the importance that farmers give to this resource.

KEY WORDS

Social representations, water, environment.

INTRODUCCIÓN

Los recursos hídricos juegan un papel clave en la reducción de la pobreza, el bienestar económico y la sustentabilidad ambiental, incide en cuestiones que afectan a la seguridad alimentaria y energética, la salud humana y al medio ambiente. Es un tema prioritario en la agenda de desarrollo económico de cualquier país y de manera permanente, pues la sobreexplotación de este recurso compromete el destino de las poblaciones.

Se entiende que para lograr el uso sustentable del agua se debe actuar desde los contextos locales, comprendiendo que la cultura juega un papel primordial en la relación de los seres humanos y el medio natural, por eso, interesa la percepción de los individuos del área en cuestión sobre el tema, se pretende realizar un estudio exploratorio sobre las representaciones sociales sobre el agua en el municipio de Villa de Arista.

Las entrevistas se realizaron a agricultores de temporal, entendiendo, el sistema de riego de temporal como un "sistema de producción que depende del comportamiento de las lluvias durante el ciclo de producción y de la capacidad del suelo para captar el agua y conservar la humedad. Estas particularidades le confieren incertidumbre en sus resultados y se prevé que los efectos del cambio climático en la producción de temporal incrementen más esta incertidumbre. Normalmente los cultivos de temporal se ven afectados por escasez y/o retraso de las lluvias y en ocasiones por exceso de agua." (Mrtínez Ruiz, 2011)

Se entrevistó también a agricultores que gozan de sistema de riego. Cabe mencionar que en el altiplano potosino-zacatecano existen cinco diferentes sistemas de riego. 1) por gravedad de presas de almacenamiento 2) por gravedad de acuíferos subterráneos a través de galerías 3) por bombeo superficial 4) por bombeo profundo y 5) con aguas negras domesticas e industriales. Villa de Arista en particular pertenece al riego por bombeo profundo. (Fortanelli Martínez & Aguirre Rivera, 2000)

Villa de Arista fue fundada en 1711 con el nombre de Jagüey. Municipio con 78 localidades de las cuales 73 cuentan con menos de 500 habitantes, en ellas predomina el clima semi-árido, además de que en cuanto a su hidrografía no existen corrientes superficiales de agua, por lo que la única alternativa es la explotación de mantos acuíferos para el abasto de agua.

Entre sus principales actividades productivas se encuentran:

- Agricultura.- en la cual sus principales cultivos son el jitomate, chile, maíz y frijol; la comercialización se destina al autoconsumo y cuando se tienen excedentes se destina al comercio local o hacia la misma región.
- Ganadería
- Silvicultura
- Industria manufacturera
- Comercio
- Servicios

(Rodríguez Celia, s.f.)

Al ser la agricultura una de las principales actividades de Villa de Arista se procedió a la investigación en este sector.

Problema de investigación

Exploración de las representaciones sociales de usos y prácticas de los agricultores de Villa de Arista.

Objetivo

Identificar a nivel exploratorio, los elementos más importantes en las representaciones sociales de agricultores sobre el agua.

Objetivos específicos

- Identificar la percepción del problema del agua y la agricultura en la vida cotidiana de los usuarios
- Registrar la memoria del pasado en la vida agrícola de Villa de Arista (cambios y permanencias)
- Identificar la prospectiva de los usuarios en relación a sus actividades y abastecimiento de agua

Población

Agricultores de la comunidad del Valle de Arista en la cabecera municipal del municipio de Villa de Arista.

Marco teórico conceptual

Representaciones sociales. El concepto de “Representaciones Sociales” entra a la escena de las ciencias sociales a través de Serge Moscovici, quien retoma y reelabora la noción de “Representación Colectiva” propuesta por Emili Durkheim (Jodelet, 1986).

La Teoría de las Representaciones Sociales trata acerca de cómo las personas se apropian de los conocimientos e informaciones que circulan en la sociedad, es decir, sobre cómo se construye el conocimiento común a través del permanente dialogar de la vida cotidiana (Banchs, 2007).

Las Representaciones Sociales funcionan como un sistema para interpretar la realidad, una guía para la acción que orienta los comportamientos y las relaciones sociales y un sistema de pre decodificación de la realidad que determina un conjunto de expectativas, anticipaciones y prescripciones (Abric, 2001). Son una forma de pensamiento social que da lugar a una modalidad de conocimiento particular –el saber del sentido común– el cual permite interpretar la realidad, clasificar los acontecimientos de la vida cotidiana, comprender y dominar el entorno y construir teorías para explicar los hechos que componen nuestro mundo y “constituyen modalidades de pensamiento práctico orientadas hacia la comunicación, la comprensión y el dominio del entorno social, material e ideal” (Jodelet, 1986, pág. 474)

En varias partes del mundo se ha utilizado la teoría de las representaciones sociales para estudiar las temáticas ambientales. En Latinoamérica, el profesor Marcos Reigota (2009), consideró que dada la diversidad de concepciones existentes sobre el concepto de ambiente, era fundamental caracterizar las representaciones existentes a su alrededor, para a partir de allí diseñar propuestas de intervención educativas. Por ello, propuso clasificar las representaciones sociales sobre el ambiente de la siguiente forma:

- Representación naturalista: Se caracteriza por enfatizar los aspectos naturales, en ocasiones mezclando conceptos de la ecología
- Representación globalizadora: Se caracteriza por las relaciones recíprocas entre ambiente natural y sociedad.
- Representación antropocéntrica: Se caracteriza por el empleo de los recursos naturales como garantía de la sobrevivencia humana (Reigota, 2009)

Marco Metodológico

Este ejercicio de investigación es de corte cualitativo con un enfoque inductivo, realizado a 4 usuarios de la cabecera municipal de Villa de Arista en el estado San Luis Potosí, el principal método de recolección de información fue la entrevista no estructurada y semi-estructurada.

Se obtuvo acceso a la comunidad por parte de miembros del consejo de cuenca del altiplano. Dos de los entrevistados, E2 y E3, se encontraban en una reunión del consejo de agricultura sustentable. Ambos agricultores cuenta con sistema de riego. El entrevistado E4, es agricultor de temporal, fue citado para realizar la entrevista en las oficinas del Comité Técnico de Aguas (COTAS) “Valle de Arista”.

La primera entrevista (E1) fue no estructurada, transcurrió durante una plática en el lugar del desayuno y brindó datos importantes como actividades que alternaban a la agricultura 40 años atrás, métodos de siembra, así como usos que se le daban principalmente al agua, además de proporcionar una perspectiva de un agricultor de temporal de mayor experiencia.

Posteriormente a las entrevistas se recurrió a un análisis por categorías como se observa en la siguiente tabla.

Eje	Categoría	Indicadores
Representaciones sociales del agua en agricultores	Usos del agua	Principales actividades
	Cambios y permanencias en el paisaje	Relato pasado, presente
	Prospectiva en usuarios acerca del agua	Consecuencias
	Responsabilidad en el cuidado del agua	A quienes identifican como actores con posibilidades de cambiar condiciones desfavorables, tanto económicas como ambientales.

Tabla 1. Distribución de los ejes y categorías de análisis, elaboración propia.

A continuación se presenta una parte de las entrevistas que se trabajaron en la investigación y que continúan en la etapa de codificación de los elementos significativos para trabajar las Representaciones sociales sobre el agua

Categorías:

Usos del agua.

E1.- Su principal uso es para la agricultura, y haber sido sus tierras de temporal dependía de la lluvia, el agua de pozo la refiere para consumo humano.

Inv.- ¿Y ahí en el rancho de dónde les llega el agua, hay algún pozo

Si hay pozo, si tenemos pozo para tomar agua...No, no falta el agua fíjese

Inv.- ¿Y la hierven?

Así mejor, hervida no. algunos si la hierven, pero al menos yo no. así fresquecita. Tenemos un tambo así de alto y sale mucha agua, una tina más o menos regular llena de agua.

E2.- El principal uso que identifica es agrícola; hace poca mención del uso doméstico o de consumo.

Inv.- ¿Qué beneficios cree que trae el agua?

Bueno, en el caso de nosotros la producción, producir comida, producir diferentes... Diferentes rangos de producción en legumbres, más que nada en legumbres

E3.- Mención del agua en la agricultura, pozos para cultivo.

Inv.- ¿Y para qué utilizan principalmente el agua, ahí en su casa?

E4.- Pues no, para bañarse, para lavar ropa, ósea detallitos

Y la que consumen es la embotellada, dice:

*Sí, sí es la **purificada**, es la que se toma uno. Y la de la llave esa la utilizamos para el gasto*

Cambios y permanencias en el paisaje.

Inv.- ¿Ha cambiado la lluvia por acá?

E1.- *Sí mucho, ha cambiado mucho, porque a veces hay tiempo en que siembran y ya no llueve, antes o después, casi nomas después, pos no, casi no, ya no está como antes. Y los animalitos se acabaron por la sequía, se acabaron los burritos, se acabaron las vaquitas, todo se acabó, nosotros también para allá vamos. (Risas)*

Inv.- ¿Entonces cambió el ciclo de las lluvias?

Sí, más antes llovía a su debido tiempo, y se sembraba y se alcanzaban las cosechas, se alcanzaban, había los lomillones grandes de pura mazorca, rastrojo y todo, y volvíamos a sembrar y se alcanzaba. ”

Inv.- ¿Cómo lo observaba antes en cuanto al agua, llovía más, había áreas más verdes...?

E2.- *Pues, e... esta zona es muy difícil de temporal, esta zona de Villa de Arista, de temporal es muy difícil, si no tienes riego pos' muy riesgoso, tiene que tener su riego privadito, privao'.”*

Inv.- Además de una permanencia en lluvias y paisaje, ¿Se observaban más... antes... ríos, lagos...?

E2.- Yo pienso que esta igual, no ha mermado, porque los ríos dependen de las lluvias, las presas y sí, si hay lluvias, últimamente sí hay lluvias torrenciales verda, pero como te digo para agricultura de temporal yo no lo haría.

Inv.- ¿Qué cambios hubo de cuando usted estaba chavillo?

E3.- ...llegamos a sacar 15 viajes diarios de jitomate, diarios...

Inv.- ¿Y el cambio en el medio ambiente?

E3.- Mire, este... pues, hasta eso sí ha mejorado mucho, porque por ejemplo ahorita la forma en la que se manejan los cultivos ya son por, ya no son tan al ay se va.

Inv.- [el cambio en] Árboles, campo, lluvias, suelos...

E3.- La lluvia se nos ha escaseado, definitivamente, si hay diferencia pero siempre ha habido tiempos secos y tiempos lluviosos. Ahora que los ranchos se están preocupando de poner orden...

Inv.- ¿Ha habido cambios por ejemplo, de cuando usted era niño, a como está actualmente, pues aquí Villa de Arista, o el lugar donde usted nació?

E4.- No, pos sí. Sí, pues ya es muy diferente, se imagina yo nací en el 57, en aquellos años no había pues casi, ni casas aquí, había muy poquitas, nomás la placita ahí había unas 8 casitas. Era puro monte.

Inv.- ¿Y antes batallaban mucho para el agua?

E4.- No, no se batallaba porque en aquellos tiempos era diferente, la agua se almacenaba en... aquí le llamábamos tanques verdad, en las lagunas se llenaban de agua y de ahí se consumía para el gasto, de ahí para los animales, para tomar uno, para... pues para todo, porque en aquel tiempo no había ni purificadora ni nada.

Inv.- ¿Entonces se tomaba directo, cómo se sacaba de las lagunas se la tomaban?

E4.- ...habían pozos de cielo abierto,... de ahí se las sacaban con cubetas, ellos le llamaban que un malacate, y con un cable, se llamaban **riatas**, porque ha de cuenta que estaban muy largas, pues como de unos 80 o 90 metros. (...) Metían a un hombre para abajo, a limpiarlo, los limpiaban y luego ya.

Prospectiva de usuarios respecto al agua.

E1.- No se pregunta directamente pero ante la pregunta de las repercusiones en su vida cuando sacaban mucha agua en otros ranchos que quebraron, contesto que no, que su pozo sigue igual, no están conectados.

Inv.- En los próximos años, las situaciones respecto al agua, ¿cree que vayan a mejorar, vayan a empeorar, cómo lo ve usted?

E2.- Hm... Yo pienso que van a mejorar, si mejorar en todos los estados del país, está bien administrada el agua, y no tiene ningún problema

Inv.- ¿Más o menos en cuanto tiempo considera que van a mejorar?

E2.- No, yo considero un tiempo corto, inmediato, no es a largo plazo

Inv.- ¿Usted cree que el agua no se va a acabar, del manto acuífero en el valle? ¿O usted qué piensa?

E3.- Por lo menos nosotros no lo vamos a ver, pero yo creo que con esto que se está haciendo [las reuniones, propuestas y acciones de los gobiernos para la agricultura sustentable] pues va para largo

E4.- Pues yo pienso que si viera pasado ya hubiera pasado, ya tiene mucho esto del re-bombeo del agua, vamos a ponerle, del 50... ya hay algunos pozos que todavía están con el mismo material desde que los pusieron, del 60, 70 y todavía están los mismos pozos... pero ya solamente Dios es el que va a decidir... se supone que esas son veredas que vienen del mar, y el mar siempre viene con harta agua, entonces esas veredas se escapan por abajo de la tierra y están continuas.

Responsabilidad en el cuidado del agua.

Inv.- ¿Los pozos están detenidos [referente a ranchos que quebraron]?

E1.- Están paralizados varios ranchos, por ese motivo mejor se fueron a otra parte, a trabajar a otra parte, echaron a perder como quien dice las tierras y después se fueron por lo mismo, y ya después ya no tuvieron con que pagar el dinero que sacaron de los bancos, y decidieron mejor irse a otra parte a trabajar con el dinerito, y perdieron los ranchos, los bancos son los dueños de los ranchos, pero los bancos no son agricultores ahí los tienen, ¿pero quién los trabaja?

Inv.- Y ahora que bajaron acá los pozos hasta abajo, ¿los de ustedes siguen iguales?

E1.- *Pues sí se cayó uno pero hicimos otro que usamos para tomar agua y pues no se gasta mucho, para agricultura no, para ese sí se gasta mucha agua, y el que no la sabe administrar pues pierde mucho porque gasta mucha agua.*

Inv.- ¿Qué responsabilidad tienen las empresas, las escuelas, el gobierno, o la comunidad, en cuanto a la problemática del agua?

E2.- *Bueno, pues la responsabilidad que ellos... las delegaciones son las que administran el agua, entonces tienen más responsabilidad...*

Inv.- ¿Y cuál considera que es su responsabilidad con el agua?

E2.- *Pues darle buen uso, darle buen uso. Y se le da buen uso, porque toda el agua que extraemos es para cultivos, para cultivos productivos.*

E3.- *Vemos que la contaminación sí nos afecta, o sea tiene sus factores porque le digo, cuando llueve, las plantas en lugar de ponerse más bonitas se caen pa' abajo, y con la maya ya no, aunque la maya se moja, pero el agua se filtra.*

Inv.- ¿Y salinidad de la tierra? por los fertilizantes

E3.- *Fíjese que ahora con las nuevas tecnologías eso ya no es problema, o sea que como... hay mucho mejoramiento de suelo, por ejemplo que la composta, los orgánicos.*

Inv.- Entonces, ¿usted piensa que los “principales” tienen la obligación?, ¿o sea del cuidado del agua y todo eso?

E4.- Es el gobierno, sí

Inv.- ¿Y les hacen caso?

F4.- *Sí, pues nomas' se pone la queja, que hay este desorden en tal parte, que está un tubo quebrado va y avisa y ya lo arreglan, que se está tirando agua en tal parte, ya nada más va uno y avisa y vienen y lo checan ellos. Pues casi todo eso viene por parte de la presidencia, esa es la que da las órdenes para el cuidado del agua*

(...) todavía están los mismos pozos, entonces yo pienso que, bueno esperemos, que no, pero ya solamente Dios es el que va a decidir

CONCLUSIONES.

Entre los usos que se le dan al agua, como agricultores el primer acercamiento y en mayor desabasto es en el gremio agrícola, y en general mencionan a los usos domésticos como mínimos o “normales”. Algo sobresaliente fue el que se utiliza en algunas familias el agua de pozo para consumo en el hogar, no se especificaron cuidados en cuanto al tratamiento del agua en dos de los casos, sin embargo uno de ellos destaca tomarla directamente del pozo sin cuidado alguno de bacterias o contaminantes en la misma. Esto como foco de atención para las autoridades en cuanto a sanidad del agua de los pozos para prevención de posibles casos de enfermedades relacionadas con esta actividad.

Se observa una identificación en los cambios de clima, al asociarlo con el cultivo remiten lo poco factible de una agricultura de temporal debido a estos cambios en las lluvias, al tener esa conciencia de la situación acuden a alternativas que les brinda la tecnología lo que habla de una adaptación en el cultivo de las tierras de los agricultores.

El medio ambiente y el adecuado uso del recurso hídrico guarda una estrecha relación a la producción en la agricultura provocando una certidumbre ambiental que se ampara con las nuevas tecnologías dejando a un lado la responsabilidad personal con el cuidado del agua. Además de que al delegar esta responsabilidad a las autoridades o instituciones que se encargan del control y abastecimiento del agua se deslindan de actitudes o actividades que tengan como consecuencia la escases del recurso.

Cabe mencionar que ninguno de los entrevistados dio por hecho un futuro catastrófico o negativo al mencionar el posible desabasto de agua, y por el contrario afirman la situación mejorará ya sea por la buena administración de las instituciones que se encargan de proporcionar y distribuir el recurso o por el mejoramiento de las tecnologías y ciencias que apoyan el sector agrícola.

BIBLIOGRAFÍA

- Banchs, M. A. (2007). *Entre la ciencia y el sentido común: Representaciones sociales y salud*. Guadalajara Jalisco México: Universidad de Guadalajara.
- Fortanelli Martínez, J., & Aguirre Rivera, J. R. (2000). *Pequeños regadíos en el altiplano potosino*. San Luis Potosí, S.L.P., México. : Universitaria Potosína .

- Jodelet, D. (1986). *La representación social: fenómenos, concepto y teoría*. . Barcelona: Paidós.
- Mrtínez Ruíz, A. (4 de agosto de 2011). *El economista* . Obtenido de <http://eleconomista.com.mx/columnas/agro-negocios/2011/08/04/agricultura-temporal-cambio-climatico>
- Reigota, M. (07 de julio de 2009). *Herramientas metodológicas para el trabajo en educación ambiental*. Obtenido de <http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/IDEA/2007225/lecciones/capitulo2/04-herramientasmetodologicas4.htm>
- Rodríguez Celia, A. L. (s.f.). *Coordinación estatal para le fortalecimiento institucional de los municipios*. Obtenido de <http://www.campopotosino.gob.mx/monografias2014/Villa%20de%20Arista.12.pdf>

EFECTO DEL ETILENGLICOL EN EL TAMAÑO DE PARTICULA DEL ÓXIDO DE ZINC OBTENIDO POR METODO DE SOL-GEL

Herrera Tovar Dalia Viridiana¹ y Rosales Sosa María Gloria²

¹ Facultad de Metalurgia, Universidad Autónoma de Coahuila, Carretera 57 Kilómetro 5, Estancias de San Juan, 25720 Monclova, Coahuila, daliaherrera@uadec.edu.mx

² Facultad de Metalurgia, Universidad Autónoma de Coahuila, Carretera 57 Kilómetro 5, Estancias De San Juan Bautista, Campus Universitario de la Universidad Autónoma de Coahuila, 25720, Monclova, Coahuila, mrosales@mail.uadec.mx

RESUMEN:

Se compararon dos soluciones preparadas con cloruro de zinc e hidróxido de sodio que fueron mezcladas utilizando un agitador magnético por un tiempo prolongado de 2 horas para formar un gel, a una de las soluciones se le agregó etilenglicol en el proceso para comparar el comportamiento del tamaño de partícula en el polvo de nanopartículas de óxido de zinc, los resultados obtenidos se muestran en el siguiente artículo. Las muestras obtenidas son caracterizadas por un analizador de tamaño de partículas Malvern.

Palabras clave: Nanopartículas, óxido de zinc, etilenglicol

ABSTRACT:

Two solutions prepared with zinc chloride and sodium hydroxide which were mixed using a magnetic stirrer for a prolonged time of 2 hours to form a gel were compared, one of the solutions was added ethylene glycol in the process to compare the size behavior of particle in the powder of zinc oxide nanoparticles, the results obtained are shown in the following article. The samples obtained are characterized by Malvern particle size analyzer.

Key words: Nanoparticles, zinc oxide, ethylene glycol

INTRODUCCIÓN:

El óxido de cinc es un compuesto químico soluble en agua. Se le conoce también como blanco de cinc. Su fórmula es (ZnO) y es poco soluble en agua, pero muy soluble en ácidos. Se halla en estado natural en la cincita. Se caracteriza por su color blanco, además de poseer una alta capacidad calorífica. El óxido de zinc es el cuarto mineral con mayor exportación en todo el mundo. [1] El compuesto posee un peso molecular de 81,38 g/mol y una densidad de 5,606 g/ml. Su punto de fusión es de 1975 °C, donde comienza a descomponerse [3].

El óxido de zinc se usa como pigmento e inhibidor del crecimiento de hongos en pintura, pomada antiséptica en medicina, acelerador y activador para la vulcanización del caucho, pigmento protector de la radiación ultravioleta, también actúa como una capa protectora para el cinc sólido, para que así éste no se oxide fácilmente por tener un alto potencial de oxidación.

Las principales aplicaciones del óxido de zinc son en la industria farmacéutica, así como también en la industria metalúrgica gracias a su solubilidad en el alcohol y en los ácidos, además de poseer características que permiten que pueda ser mezclado para la formación de aleaciones con otros metales. También se utiliza para la producción de componentes electrónicos y para el recubrimiento de piezas de acero que son propensas a la oxidación.

Otra de las aplicaciones del óxido de zinc es en la industria cosmética ya se utiliza este compuesto como capa protectora en la piel evitando la picazón y el ardor. Igualmente se ocupa como agente desodorante ya que elimina los malos olores y las bacterias causantes de la sudoración. Funciona como protector solar y como componente regenerativo de la piel.

El óxido de zinc en aplicaciones dentales es de gran ventaja en diversos campos vinculados al bienestar humano, por ejemplo, en casos de la salud bucal este elemento químico es usado en la elaboración de cementos útiles en la reparación de piezas dentales. [2]

Algunos de los métodos para la síntesis de nanopartículas son el método coloidal este método consiste en disolver una sal de precursor metálico o del óxido a preparar, un reductor y un estabilizante en una fase continua o dispersante. [4]

Irradiación con microondas la técnica de irradiación con microondas produce nanopartículas con una muy baja dispersión de tamaño, aunque no siempre se logra un control preciso en la morfología. Las microondas actúan como campos eléctricos de alta frecuencia, capaces de calentar cualquier material conteniendo cargas eléctricas como las moléculas polares en un disolvente o iones conductores en un sólido [6].

¹ Facultad de Metalurgia, Universidad Autónoma de Coahuila, Carretera 57 Kilómetro 5, Estancias de San Juan, 25720 Monclova, Coahuila, daliaherrera@uadec.edu.mx

² Facultad de Metalurgia, Universidad Autónoma de Coahuila, Carretera 57 Kilómetro 5, Estancias De San Juan Bautista, Campus Universitario de la Universidad Autónoma de Coahuila, 25720, Monclova, Coahuila, mrosales@mail.uadec.mx

Utilización de dendrímeros la síntesis de nanopartículas también se ha llevado a cabo usando micelas, emulsiones y dendrímeros como nanoreactores que permiten la síntesis de partículas de forma y tamaño definidos. Esto se logra alterando la naturaleza de los dendrímeros. Los dendrímeros son moléculas altamente ramificadas, las que incluyen un núcleo central, unidades intermedias repetitivas y grupos funcionales terminales [5].

Síntesis solvothermal con este se agrupan una serie de técnicas en las que un precursor metálico disuelto en un líquido, en un recipiente cerrado, es calentado por encima de su punto de ebullición, lo que genera una presión superior a la atmosférica. El líquido habitual es el agua, y de ahí el nombre de síntesis hidrotermal; sin embargo, cada vez van utilizando con mayor frecuencia otros medios líquidos: disolventes orgánicos, amoníaco líquido, hidracina, etc., y tenemos entonces la síntesis solvothermal [7]

El método sol-gel es un proceso químico en fase húmeda utilizado en la ciencia de los materiales. Este método se utiliza principalmente para la fabricación de nanomateriales. Se parte de una solución química o sol que actúa como precursor de una red integrada ya sea de partículas discretas o de una red de polímeros. Los precursores típicos del proceso sol-gel son los alcóxidos metálicos y los cloruros metálicos, que sufren varias reacciones de hidrólisis y policondensación para formar una dispersión coloidal, que luego de una polimerización lenta forma un gel [8].

MÉTODOS Y MATERIALES:

1.- Preparación:

Para comenzar, se prepararon los reactivos a utilizar y el equipo de laboratorio necesario para realizar el procedimiento, el procedimiento se realizó por duplicado. Se prepararon dos soluciones: La primera de ellas consiste en una solución a 0.1 M de hidróxido de sodio, en 200 ml de agua destilada con 0.7994 gr de hidróxido de sodio, utilizando un matraz aforado y se agito hasta disolver el hidróxido de sodio. Para la segunda solución, se necesitó una concentración de 0.5 M en 100ml de agua destilada con 6.8135 gr de cloruro de zinc. Se utilizó un matraz aforado y se agito hasta disolver el cloruro.

2.- Sol- Gel:

Para iniciar la técnica sol-gel, se realizó el montaje con un soporte universal, utilizando una pinza de agarre para soportar una bureta graduada de 25ml, una plancha y un agitador magnético. Posteriormente, se agregó la solución de hidróxido de sodio en un matraz de un volumen de 500ml y se colocó sobre la plancha, tomando la temperatura con el termómetro cada cierto tiempo.

En seguida, el hidróxido de sodio se sometió a un calentamiento en una plancha Daihan LABTECH por un tiempo de 20min, hasta llegar a la temperatura de entre 80°C y 90°C. Posteriormente se inició una agitación constante de la solución, con uso de la plancha y un agitador magnético de 3cm de largo, manteniendo una velocidad regular.

A continuación, en la bureta graduada se agregó la solución de cloruro de zinc, con la ayuda de un embudo para evitar cualquier derrame de la solución y se mantuvo en constante goteo por gravedad, aproximadamente entre 20 y 25 minutos, que fue el tiempo que tardó en precipitar toda la solución de cloruro a la solución de hidróxido.

Mientras el goteo se realizó, se incrementó la temperatura hasta los 98°C manteniéndola constante sin pasar los 100°C, se continuó con la agitación magnética para incrementar la disolución de ambas. En este paso se mantuvo la solución final por un tiempo de 15 min, con la agitación y la temperatura indicada.



Fig. 1. Montaje de solución de ZnO en agitación magnética

Una vez terminado el goteo, la solución resultante se mantuvo a una temperatura de 95°C, junto con la agitación magnética controlada durante un periodo de 2 horas. Con la finalidad de evaporar la mayor cantidad de agua destilada, y así poder obtener la fase gelificada. En este paso se le agregó a una de las soluciones 2 ml de etilenglicol.

Más tarde, se generó una filtración donde se extrajo del matraz el residuo de la solución después de terminar el tiempo de sintetizado, obteniendo una pasta blanca, la cual se colocó en papel filtro durante dos días aproximadamente, todo esto para dejar que terminara de pasar el exceso de agua que aún contenía la solución.

¹ Facultad de Metalurgia, Universidad Autónoma de Coahuila, Carretera 57 Kilómetro 5, Estancias de San Juan, 25720 Monclova, Coahuila, daliaherrera@uadec.edu.mx

² Facultad de Metalurgia, Universidad Autónoma de Coahuila, Carretera 57 Kilómetro 5, Estancias De San Juan Bautista, Campus Universitario de la Universidad Autónoma de Coahuila, 25720, Monclova, Coahuila, mrosales@mail.uadec.mx

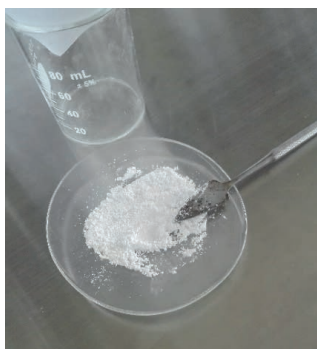


Fig. 2. Resultado de la filtración partículas de ZnO

3.- Medición de tamaño de partícula:

Se extrajo el polvo del papel filtro y se procedió a pesar la cantidad obtenida de NPs ZnO, después en dos recipientes pequeños se agregó una cantidad mínima de las nanopartículas 0.0010 gr uno con las modificadas con etilenglicol y las otras sin ello. Se lavaron las nanopartículas con etanol y se procedió a realizar un sonicado en un equipo de sonicación Branson 1510 por 10 min, después se dejó sedimentar y poder tomar del sobrenadante una muestra y poder analizarla en el aparato Malvern.

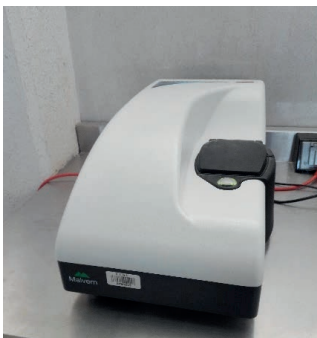


Fig.3. Analizador de tamaño de partícula Malvern

RESULTADOS:

La figura 4 nos muestra los resultados del tamaño de partícula de la muestra obtenida sin agregar etilenglicol. Se puede observar que el tamaño de partículas en este casos se encuentra en el rango de comprendido entre 396.1 y 615.1 nm . Se puede apreciar partículas en su mayoría con tamaños de 396.1 y 458.7 nm, mientras que en menor cantidad se encuentran partículas de 615.1 nm.

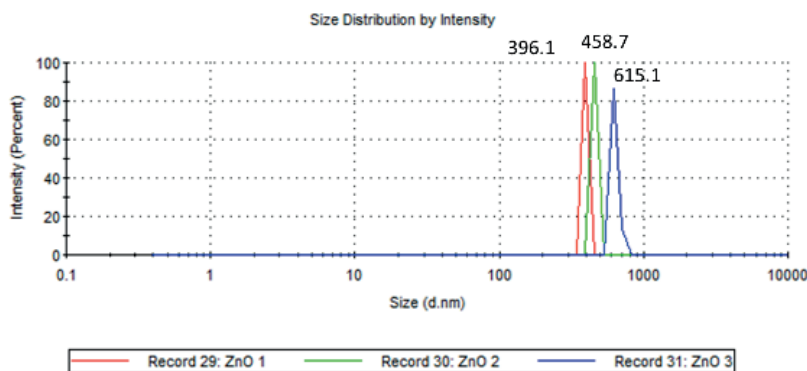


Fig. 4. Resultado de muestra 1 sin etilenglicol

La figura 5 nos muestra los resultados del tamaño de partícula de la muestra obtenida agregando etilenglicol. Podemos observar porcentajes en volumen muy parecidos para partículas de de 400 y 450 nm. También observamos alrededor de 31% en volumen de partículas de 500 nm.

¹ Facultad de Metalurgia, Universidad Autónoma de Coahuila, Carretera 57 Kilómetro 5, Estancias de San Juan, 25720 Monclova, Coahuila, daliaherrera@uadec.edu.mx

² Facultad de Metalurgia, Universidad Autónoma de Coahuila, Carretera 57 Kilómetro 5, Estancias De San Juan Bautista, Campus Universitario de la Universidad Autónoma de Coahuila, 25720, Monclova, Coahuila, mrosales@mail.uadec.mx

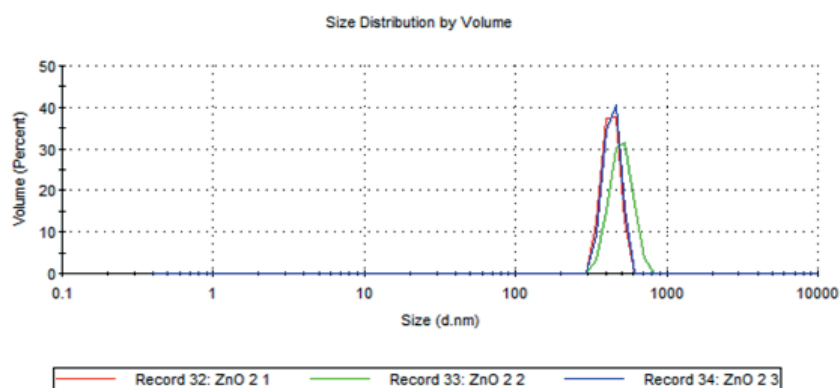


Fig. 5. Resultado de muestra 2 con etilenglicol

CONCLUSIONES:

1. La manipulación de las condiciones de síntesis permite el control racional del tamaño y la forma de las partículas.
2. El etilenglicol favoreció a aumentar el porcentaje en volúmenes de partículas de 400 y 450 nm.
3. Se observa un menor porcentaje en volumen de partículas de 500 nm.
4. Este es un estudio que continúa desarrollándose, pues están en el proceso de caracterización las muestras de ZnO por drx, para corroborar el tamaño de partícula.

BIBLIOGRAFÍA:

- [1] Óxido de Zinc, consultada en: https://www.ecured.cu/%C3%93xido_de_Zinc (consultado el 02 de julio de 2017)
- [2] Quiminet.com, consultada en: <https://www.quiminet.com/articulos/los-principales-usos-y-aplicaciones-del-oxido-de-zinc-2565648.htm> (consultado el 02 de julio de 2017).
- [3] Óxido de Zinc: Fórmula, Propiedades y Uso, consultada en: <https://www.lifeder.com/oxido-de-zinc/> (consultado el 15 de julio de 2017).
- [4] Schmid, G. (2004). "Nanoparticles. From theory to application." Weinheim: Wiley-VCH.
- [5] Muzafarov, A. M., y Rebrov, E. A. (2000). "Polymer Science", 42, [pp. 55-77]
- [6] Xie, R. C., y Shang, J. K. (2007). "Morphological control in solvothermal synthesis of titanium oxide". Journal of Materials Science, 42, 6583.
- [7] F. Ghasemi a, R. Jalal (2015). "Antimicrobial action of zinc oxide nanoparticles in combination with ciprofloxacin and ceftazidime against multidrug-resistant Acinetobacter baumannii" [pp.118-122] Elsevier
- [8] Sonia S., Linda Jeeva Kumari H., Ruckmani K., Sivakumar M. (2017) "Antimicrobial and antioxidant potentials of biosynthesized colloidal zinc oxide nanoparticles for a fortified cold cream formulation: A potent nanocosmeceutical application" [pp. 581-589] Elsevier.

Compuestos bioactivos en algas marinas

Eric Saenz Molina¹ y Antonio De León Rodríguez²

¹ Facultad de ciencias biológicas, Torreón Coahuila Edo, ericsaenzuber@outlook.com

² Instituto potosino de investigación científica y tecnológica, San Luis Potosí, SLP
aleonr@ipicyt.edu.mx

Resumen

En este trabajo se evaluaron las propiedades bioactivas antibacterianas y compuestos fenólicos de 12 extractos obtenidos de 6 especies de algas marinas recolectadas en las localidades diversas del mar. La actividad antibiótica de los extractos se evaluó mediante la aparición de halos de inhibición contra bacterias Gram negativas (*E. Coli* y *Bacillus subtilis*) en ninguno de extractos se presento halos de inhibición probablemente era muy poca la concentracion del extracto obtenido conforme a los resultados concluimos que ninguna de nuestras algas presentaba actividad antibiótica o al menos no para nuestras bacterias.

Abstract

In this work the antibacterial bioactive properties and phenolic compounds of 12 extracts obtained from 6 species of marine algae collected in different localities of the sea were evaluated. The antibiotic activity of the extracts was evaluated by the appearance of inhibition halos against Gram negative bacteria (*E. coli* and *Bacillus subtilis*) in none of the extracts were presented halos of inhibition was probably very little concentration of extract obtained according to the results we concluded That none of our algae presented antibiotic activity or at least not for our bacteria.

Palabras clave: extractos , inhibición , actividad antibiótica, bioactivas.

Introducción

En los últimos años se ha incrementado el interés por la búsqueda de compuestos bioactivos en organismos marinos .Numerosas revisiones señalan a las algas como uno de los principales productores de compuestos bioactivos , en algunos casos con estructuras moleculares no encontradas en otros organismos , con posibles usos antibacterianos, anticancerígenos, cardiotónicos, antivirales, antitumorales, antiinflamatorios y anticoagulantes entre otros.

Las algas marinas son una fuente inédita de productos naturales con propiedades antimicrobianas las actividades, y relativamente pocos estudios han proyectado estos organismos polifiléticos para posibles nuevos antibióticos

Se utilizan diversos ensayos para detectar la actividad antimicrobiana en extractos celulares de microorganismos; Una de las más populares de estos métodos es el ensayo de difusión de disco . Este sencillo ensayo se basa en la difusión de los compuestos contenidos en el extracto celular desde un disco de papel en agar que ha sido sembrado con una microbio objetivo. Los compuestos en el extracto celular difunden el disco en el agar y sus concentraciones reducen exponencialmente con distancia si los compuestos son antimicrobianos y están presentes en concentraciones suficientes para prevenir el crecimiento microbiano, una zona clara aparece alrededor de la placa después de que la placa ha sido incubada para permitir el desarrollo de un césped microbiano de crecimiento en el agar. Como resultado, el tamaño de la zona corresponde al antimicrobiano total la actividad en el extracto celular y los datos de salida se consideran semicuantitativos. Además, los resultados de la difusión del disco los estudios son fáciles de interpretar y obtenidos típicamente en 24-48 h.

En todos los ambientes naturales habitan múltiples microorganismos de diversos tipos y actividad fisiológica. Para efectuar el estudio de un organismo particular es necesario separarlo de la población mixta en la que se encuentra. Para tal fin se emplean técnicas de aislamiento que conduzcan a la

obtención de un cultivo puro. De manera general los métodos de aislamiento incluyen, separación física de los microorganismos mediante: diluciones seriadas y siembra por vertido en placa, siembra por agotamiento.

Utilización de medios de cultivo selectivos y diferenciales, el aprovechamiento de características particulares de los microorganismos, tales como la formación de esporas, el metabolismo anaerobio y/o facultativo, la capacidad para utilizar sustratos poco comunes, etc. Para facilitar el proceso de aislamiento y obtener mejores resultados, frecuentemente se emplean combinaciones de las técnicas anteriores.

Los compuestos fenólicos los cuales son responsables del buen funcionamiento de las plantas y, en su relación con el hombre, son utilizados para tratar desordenes cardiovasculares y prevenir algunos cánceres. Poseen una estructura química adecuada para ejercer actividad antioxidante.

muestras

Para la elaboración del presente estudio, se recolectaron 6 algas marinas. Las muestras botánicas fueron desecadas, prensadas, tratadas, determinadas, rotuladas, y depositadas en el laboratorio 4 de Biotecnología y Bioingeniería Molecular del edificio alfa del instituto potosino de investigación, ciencia y tecnología.

Materiales y métodos

Extracción de compuestos fenólicos

Materiales:

1. 6 tipos de algas marinas
2. Alcohol al 60%
3. 14 tubos falcon de 50 ml
4. Vortex
5. Agua destilada
6. Centrifuga kitlab ck-12
7. Indicador

Extracción

1. Se extraen partes alícuotas secas de las algas con etanol acuoso al 60% y agua destilada.
2. Sonicar la muestra durante 30 minutos.
3. Centrifugar durante 15 min a 3500 rpm, 4 ° C.
4. Recoger el sobrenadante en una botella separada y volver a extraer el residuo dos veces en las mismas condiciones que las mencionadas en los pasos 1 a 3.

1. Discos de papel de susceptibilidad a antibióticos de 6 mm de diámetro.
2. Bacteria *E. coli* y *Bacillus subtilis*.
3. Agua destilada / desionizada.
4. Espátula triangular de acero inoxidable.
5. Fórceps de metal
6. Placas de Petri estériles (9 cm de diámetro, poliestireno).
7. Agar medios adecuados para el cultivo de los microbios de interés.
8. Pipeta y puntas estériles adecuadas para transferir hasta 20 μL de líquido.

Preparación de los discos con los sobrenadantes y probar (realizar en campana de flujo laminado).

1) Autoclave los discos de papel, agua, agar, fórceps (si se usa metal uno) y puntas a 121 ° C durante 15 min. A) La mayoría de los demás de los equipos se suministran estériles desde el fabricante o no requieren esterilización.

B) El agar para el ensayo debe prepararse de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Instrucciones. Una vez vertido en placas de Petri (profundidad de aproximadamente 4 mm), las placas se deben dejar secar con tapas a temperatura ambiente durante al menos 24-48 h.

C) Agregue 10 μL primero sobre los discos, espere a que el disco este completamente seco y agregado otros 10 μL . Repita esta acción hasta que el disco contenga 30 μL de sobrenadante

D) Conserve los discos preparados con los sobrenadantes a probar en las cajas de Petri de vidrio, tapados, hasta que los vaya a usar.

2) Preparación de los discos usados como control positivo y negativo (realizar en campana de flujo laminar).

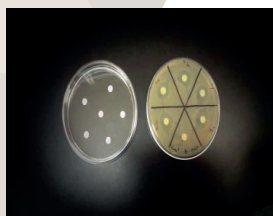
a) Para el control positivo, agregue 10 μL de antibiótico (ampicilina) sobre los discos y deje secar por completo. Para el control negativo agregue 10 μL de agua destilada estéril sobre los discos y deje secar por completo.

b) Conserve los discos preparados con los sobrenadantes a probar en las cajas de Petri de vidrio, tapados, hasta que los vaya a usar.

3) Preparación del inóculo. Una noche anterior al ensayo prepare en medio LB líquido un inóculo, disolviendo una colonia en 5 mL de medio e incubándolos a 37° C y 200 rpm durante 24 horas (realizar en campana de flujo laminar).

4) Preparación de las placas de agar (realizar en campana de flujo laminar). a) Vaciar el agar dentro de las cajas de Petri. Espere a que el agar solidifique y conservar a 4°C hasta su uso. b) Dividir las cajas en seis secciones e identifique cada una de ellas, observe la figura. c) Plaquear (esparcir por todo el agar) 80 a 100 μL del cultivo previamente preparado en las placas de agar. Deje que el agar absorba el medio manteniendo las placas en la campana de flujo laminar.

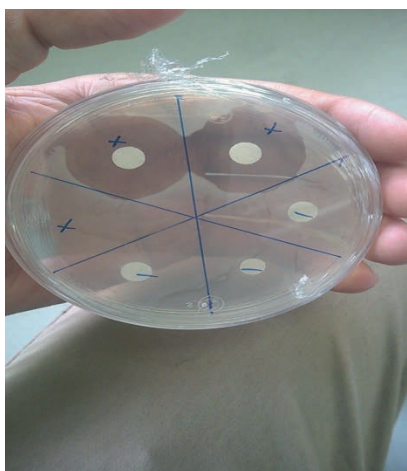
5) Colocación de los discos con antibiótico, agua destilada y/o sobrenadante (realizar en campana de flujo laminar). a) Tome con una pinza estéril los discos a utilizar en el ensayo. b) Coloque dicho disco exactamente en el medio de cada sección, previamente identificada. c) Presione con suavidad en el centro del disco con la pinza.



6) Incube las placas de agar con los discos a 37° C. Recuerde colocarlos boca abajo.

Resultados

Los resultados obtenidos fueron negativos ya que ningún disco con sobrenadante de algas presentó algún halo antimicrobiano. Las bacterias *E. coli* y *Bacillus subtilis* pudieron crecer de forma adecuada sin ninguna dificultad observable y como era de esperarse en nuestros controles de ampicilina fue notorio el halo antibacteriano.



Conclusiones

Como conclusión podemos decir que nuestras algas no contaban con compuestos bioactivos para el crecimiento antibacteriano o que nuestro método de extracción y concentración de sobrenadante no fue el correcto.

Referencias

1. Reichelt JL, Borowitzka MA (1984) Antimicrobial activity from marine algae: results of a large-scale screening programme. *Hydrobiologia* 116–117:158–168.
2. Aruoma O.I., T. Bahorun & L.S. Jen. 2003. Neuroprotection by bioactive components in medicinal and food plant extracts. *Mutation Research*, 544:203-215.
3. Bhakuni D. & M. Silva. 1974. Biodynamic substances from marine flora. *Botanica Marina*, 27: 40-51.
4. Carlucci M., L. Scolaro & E. Damonte. 1999. Inhibitory Action of Natural Carrageenans on Herpes Simplex Virus Infection of Mouse Astrocytes. *Chemotherapy*, 45: 429-436.
5. B.G. Howlett, L.J. Evans, D.E. Pattemore, W.R. Nelson. (2017) Stigmatic pollen delivery by flies and bees: Methods comparing multiple species within a pollinator community. *Basic and Applied Ecology*.
Online publication date: 1-Jan-2017.

ESTABILIDAD DEL COLOR EN EL TENIDO DE FIBRAS NATURALES CON COLORANTES NATURALES

Gabriela Yvonne De La Peña Elizondo¹ y Gabriela Arroyo Figueroa²

RESUMEN

La contaminación provocada por los efluentes de la industria textil ha generado interés en utilizar colorantes naturales como remplazo a los sintéticos. El objetivo de este trabajo fue probar la estabilidad en el color en fibras de lana y algodón teñidas con colorantes extraídos de insectos y plantas. Las pruebas de solidez del color realizadas fueron frote seco, lavado doméstico, lavado a altas temperaturas, ácidos y álcalis, luz artificial. El color fue medido con un colorímetro CR-400 HEAD, con la escala CIELab en las coordenadas *L, *a y *b; realizando un análisis en el término ΔE . Los resultados obtenidos indicaron pérdidas de color mínimas en la mayoría de las pruebas, encontrándose favorable su aplicación a escala industrial.

ABSTRACT

Pollution caused by effluents from the textile industry has generated interest in using natural dyes as a replacement for synthetic ones. The objective of this work was to test the color stability in wool and cotton fibers stained with dyes extracted from insects and plants. The tests of solidity of the realized color were dry scrub, domestic washing, washing to high temperatures, acid and alkali, artificial light. The color was measured with a CR-400 HEAD colorimeter, with the CIELab scale at the *L, *a and *b coordinates; Performing an analysis in the term ΔE . The results indicated minimal color losses in most of the tests, and their application on an industrial scale was favorable.

Palabras Clave: Color, Estabilidad, Teñido, Fibras naturales, Colorantes naturales

INTRODUCCIÓN

La industria textil surgió en los inicios del desarrollo de la humanidad, las fibras naturales eran las principales materias primas para la elaboración de tejidos y prendas. La tinción es resultado de la combinación de productos químicos o la afinidad física entre el tinte y la fibra del tejido. Actualmente se utilizan una gran variedad de tintes y métodos de teñido, que dependen de las fibras utilizadas y el producto deseado. Nuestros antepasados utilizaban tintes naturales para dar color a las telas (Wang, 2006). Los colorantes o tintes son sustancias que se añaden a diversos materiales para cambiar su color de manera prolongada, existen varios métodos de aplicación siendo la más utilizada su disolución en solventes para facilitar su difusión en el material que se desea teñir. Los colorantes se clasifican en naturales y sintéticos (Paredes, 2002). Los colorantes naturales son sustancias químicas que tienen la propiedad de transferir color a las fibras y que provienen de plantas superiores como algas y hongos líquenes; de algunos insectos, así como de algunos organismos marinos invertebrados y se caracterizan por tener grupos que dan color, llamados cromóforos (Ojeda, 2012). Existen dos tipos de fibras textiles, las sintéticas y naturales ambos son polímeros. Las primeras se obtienen por una reacción de polimerización. Las naturales de origen vegetal están compuestas por celulosa mientras que las de origen animal como la lana están formadas por proteínas (García y Solís, 2008). A partir de la Segunda Guerra Mundial los avances en la industria petroquímica condujeron a la producción de fibras y colorantes sintéticos que son utilizados hasta la actualidad, dejando atrás las fibras y colorantes naturales debido a su menor costo (Wang, 2006). Las aguas residuales de procesos de teñido son un problema para el ambiente y la salud tanto de animales como de personas que están en contacto con ellas debido a que los compuestos de degradación de los colorantes y/o solventes son dañinos y mutágenos para los seres vivos (García y Solís, 2008).

En la actualidad el uso de tintes naturales es una actividad que se utiliza en mayor parte para la producción de artículos artesanales (Martínez, 2013). Sin embargo, la preocupación por la ecología y protección del ambiente han ocasionado que exista un gran interés en volver a utilizar los colorantes naturales ya que no son nocivos para el ser humano y no contaminan el ambiente (Wang, 2006).

El objetivo de esta investigación fue probar la estabilidad del color de colorantes naturales en fibras naturales ante diversos procedimientos (solidez del color al frote seco, a la luz artificial, lavado doméstico, lavado a altas temperaturas y ante soluciones con PH ácido y alcalino), registrando la variación del color a fin de comprobar si su uso es propicio para remplazar a los colorantes sintéticos. El material con que se realizaron las pruebas consistió en dos tipos de fibras naturales diferentes, el algodón una fibra vegetal y la lana como una fibra animal en las que se utilizaron colorantes naturales extraídos de Grana Cochinilla, Pétalos de Girasol, Cáscara de Cacao, Cáscara de Cebolla y Añil; cada uno en tres concentraciones diferentes 50, 75 y 100% en base al peso de la fibra.

MÉTODOS Y MATERIALES

Proceso de tinción de las fibras y elaboración de muestras. Se lavaron las fibras en una solución de agua desionizada con jabón en polvo biodegradable (5.33 g/l) dejándolas en ebullición durante 30 minutos, después se enjuagaron con abundante agua desionizada. Posteriormente se preparó una solución mordente de Sulfato de Aluminio y Potasio (alumbre) en agua desionizada al 30% con respecto al peso de las fibras (tanto en el caso de la lana y algodón, en el caso del algodón teñido de grana solo se utilizó una concentración de colorante y dos mordentes bicarbonato y sulfato de aluminio y potasio), se introdujeron las fibras, se sometieron a calentamiento hasta la ebullición y se

mantuvo esta temperatura durante 30 min; se dejaron en reposo por 48 h, y se les retiró la solución. Para la extracción de los colorantes se calculó el peso del material (grana cochinilla, pétalos de girasol, cascara de cacao, cascara de cebolla y añil) según la concentración deseada (50, 75 y 100%) con relación al peso de la fibra a teñir, se realizaron tres replicas por prueba. El material en vasos de precipitado con 500 ml de agua desionizada y se dejaron reposar por 24 h, después se llevaron a ebullición por 30 min con agitación constante. Se filtraron las soluciones y en estas se colocaron las fibras a teñir, nuevamente se llevaron a ebullición durante 30 min, terminado esto se enjuagaron con agua desionizada hasta que no liberaran color. Se dejaron secar naturalmente.

Medición del color de las fibras teñidas. Se utilizó un colorímetro CR-400 marca Minolta. Este equipo se utiliza para medir el color en superficies suaves y puede registrar variaciones de color, aunque estas sean mínimas. El espacio de color utilizado fue el CIELab dado en los términos $L^*a^*b^*$, se registró el color antes y después de cada uno de los tratamientos y se calculó la diferencia de color en cada término, después se calculó la diferencia total de color ΔE^* (Konica Minolta, 2016), mediante la ecuación 1).

$$\Delta E^* = [\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}]^{1/2} \quad (1)$$

Pruebas de estabilidad. Solidez del color al frote en seco. Esta prueba se realizó con un frotímetro o crockmeter. Las muestras de lana y algodón teñidas se colocaron sobre la base de papel lija del equipo del lado derecho de la tela o tejido respectivamente. El brazo del frotímetro se cubrió con una tela blanca o testigo especial para el equipo. Se realizaron 20 revoluciones por minuto, se midió el color de las muestras como de telas testigo antes y después.

Solidez del color a la luz artificial. Se colocaron todas las muestras sobre un pedazo de fomi negro, el cual se introdujo dentro de una caja de madera con dimensiones de 40 de alto x 50 de ancho x 100 de largo forrada de negro y se sometieron a la luz de una lámpara marca Nec de 22W y 1080 Lm de intensidad de luz artificial; registrando el color a las 0, 24, 48 y 72 h.

Solidez del color a los ácidos y álcalis. Se prepararon soluciones de ácido acético e hidróxido de sodio al 10% en peso/volumen. Con estas se prepararon soluciones con un pH ácido de 5 y alcalino de 9. Para esta prueba como las de lavado con jabón y lavado a altas temperaturas en las que se requirió llevar a determinada temperatura las muestras y/o mantenerlas en agitación constante se utilizó una máquina de teñido de muestras de alta temperatura GT-D15. Este equipo consiste en 12 vasos de acero inoxidable que giran alrededor de una turbina dentro de un tanque con sistema de control de temperatura. Cada muestra se colocó en uno de los vasos del equipo mencionado anteriormente con 30ml de solución y se mantuvieron en agitación durante 30 minutos. Se utilizó una plancha de vapor de la marca Singer con un regulador donde se indica el tipo de fibra a secar.

Solidez del color a temperaturas altas. Se colocaron las muestras en los recipientes del GT-D15 con 30 ml de agua. Se llenó de agua común el tanque y se programó para llevar de la temperatura ambiente hasta los 80°C, subiendo 1.5°C por min y mantenerla durante 15 min para después bajarla hasta los 50°C. Se utilizó la plancha para secar las muestras.

Solidez del color al lavado doméstico. Se preparó una solución de jabón líquido comercial con agua al 0.5%, se colocaron las muestras en los recipientes del GT-D15 con 30 ml de la solución y se agitaron por 20 min, después se secaron por medio de una plancha de vapor.

RESULTADOS Y DISCUSION

Del uso de la cáscara de cacao el resultado fueron coloraciones en tonos cafés, con la cáscara de cebolla morada tonos verdes, con los pétalos de girasol tonos amarillos, el añil tono azul y de la grana cochinilla tonos guinda. Se registró una mayor intensidad de color conforme aumentaba la concentración de colorante.

En cada una de las pruebas tanto para el algodón como para la lana se cuantificó la variación de color en la escala CIELab, a partir de estos resultados se calculó la diferencia total de color ΔE , con este dato para las tres réplicas de cada concentración de colorante se calculó el promedio y la desviación estándar. En las tablas 1 y 2 podemos observar los resultados obtenidos para Algodón y lana respectivamente.

Resultados de solidez para la fibra de algodón teñida. Para la cáscara de cacao la prueba que registró mayor variación de color fue el lavado a altas temperaturas. Con la cáscara de cebolla los mayores cambios se registraron en la prueba de Ácidos y Lavado a Altas temperaturas. En las pruebas realizadas con muestras de Algodón teñidas con Pétalos de girasol se obtuvieron valores de ΔE menores que con otros colorantes, teniendo mayores valores en la prueba de lavado a altas temperaturas. En las muestras teñidas de añil se obtuvieron los valores más altos en la prueba de pérdida de color al frote seco, para este colorante también hubo cambios elevados en el lavado a altas temperaturas. Con grana cochinilla utilizando los mordentes de Bicarbonato y Sulfato de Aluminio y Potasio se obtuvieron los ΔE más altos en las pruebas de Ácidos, Álcalis, Lavado doméstico y a altas temperaturas. Siendo entre estos dos mayores los de las muestras de Sulfato de Aluminio y Potasio. En las muestras de tela sintética el mayor cambio de color fue en la prueba de Frote seco, con valores similares a los obtenidos con Añil en Algodón y Grana cochinilla en lana.

Tabla. 1. Promedios y desviación estándar de la diferencia total de color ΔE obtenidas a partir de las pruebas de estabilidad del color en las muestras de Algodón teñidas con los colorantes naturales y de la tela sintética.

Colorante	Concentración (%)	Promedio y desviación estándar de la diferencia total de color " ΔE " para cada prueba					
		Frote seco	Luz artificial	Ácidos	Álcalis	Lavado altas temperaturas	Lavado doméstico
Cáscara de cacao	50	1.390±0.126	0.928±0.285	2.483±0.752	2.124±0.298	6.189±0.404	1.913±0.767
	75	1.589±0.417	0.846±0.092	1.355±0.439	4.654±0.420	4.837±0.271	1.807±0.498
	100	2.106±0.601	1.371±0.734	3.084±1.028	3.385±0.474	7.288±0.385	2.915±0.090
Cáscara de cebolla	50	1.184±0.214	3.297±1.504	10.051±0.822	4.369±0.768	5.631±1.092	4.146±1.344
	75	1.455±0.249	1.821±0.341	4.265±1.041	2.669±0.568	5.513±2.152	3.889±0.315
	100	1.420±0.447	2.228±0.275	7.477±1.362	8.701±0.803	17.777±0.404	7.749±0.850

Pétalos de girasol	50	2.478±1.290	1.636±0.365	0.996±0.211	0.518±0.201	1.854±0.152	0.732±0.379
	75	1.402±0.496	2.539±0.407	1.603±0.643	0.966±0.304	5.949±1.022	0.426±0.442
	100	1.151±0.235	1.630±0.348	1.109±0.137	0.768±0.284	4.257±0.791	0.752±0.586
Añil	50	10.540±2.300	0.969±0.320	1.776±0.520	2.003±0.998	4.335±1.223	1.606±0.385
	75	12.323±1.896	0.995±0.746	1.302±0.252	2.244±0.284	5.601±0.795	1.388±0.433
	100	16.465±2.123	0.491±0.308	1.926±1.207	2.144±0.689	1.751±1.155	2.523±1.223
	mordente utilizado	Frote seco	Luz artificial	Ácidos	Álcalis	Lavado altas temperaturas	Lavado doméstico
Grana	Bicarbonato	1.921±0.107	1.453±0.960	17.077±2.628	14.946±0.940	20.474±0.830	14.628±3.257
Cochinilla	Alumbre	1.012±0.416	2.570±1.761	22.05±0.841	26.099±1.907	29.766±0.838	17.224±2.870
Sintético		13.097±0.508	0.422±0.099	2.559±0.130	2.626±0.347	1.518±0.114	1.479±0.559

Resultados de solidez para la fibra de lana teñida. Para las fibras teñidas con cáscara de cacao la prueba que registró mayor variación de color fue el lavado a altas temperaturas, sin embargo, la diferencia total es menor que en la fibra de algodón. Con las muestras de cáscara de cebolla los valores más altos de ΔE se obtuvieron en el frote seco. En las muestras teñidas con Pétalos de girasol se registraron valores más altos para casi todas las pruebas en comparación a la fibra de algodón, teniendo un mayor efecto la exposición a luz artificial y el lavado a altas temperaturas. Para la lana teñida con Grana cochinilla las mayores diferencias de color fueron las obtenidas en las pruebas de frote seco y lavado a altas temperaturas.

Tabla. 2. Promedios y desviación estándar de la diferencia total de color ΔE obtenidas a partir de las pruebas de estabilidad del color en las muestras de Lana teñidas con los colorantes naturales.

Colorante	Concentración (%)	Promedio y desviación estándar de la diferencia total de color " ΔE " para cada prueba					
		Frote seco	Luz artificial	Ácidos	Álcalis	Lavado altas temperaturas	Lavado doméstico
Cáscara de cacao	50	0.900±0.098	1.395±0.536	3.229±1.080	3.481±0.101	4.160±0.048	4.469±1.715
	75	2.405±0.914	1.224±0.222	1.171±1.066	2.354±0.538	4.685±0.797	1.641±1.170
	100	2.404±0.526	2.246±0.913	1.528±0.207	1.291±0.669	5.210±0.350	2.335±0.893
Cáscara de cebolla	50	7.572±1.101	2.876±0.462	6.359±1.362	7.177±0.945	3.624±0.849	5.214±1.302
	75	9.288±1.437	3.533±0.457	6.469±0.466	8.233±0.357	4.217±0.248	11.814±1.109
	100	8.425±0.984	0.864±0.135	6.918±0.760	7.484±0.176	6.783±1.405	3.659±0.586
Pétalos de girasol	50	1.761±0.888	7.238±1.624	2.468±0.688	3.699±0.854	12.270±2.658	3.286±1.354
	75	0.913±0.172	10.190±0.926	2.715±0.980	2.506±0.744	5.726±0.920	4.285±0.573
	100	1.218±0.300	9.419±0.675	2.156±0.407	3.214±0.857	4.892±0.426	4.546±0.371
Grana Cochinilla	50	6.875±0.302	0.665±0.172	2.791±0.725	2.489±0.471	6.875±0.302	1.971±0.508
	75	9.707±0.798	1.599±0.120	1.400±0.858	1.564±0.200	9.707±0.798	2.578±0.435
	100	10.508±0.992	0.953±0.450	2.424±1.776	3.407±0.665	10.508±0.992	1.215±0.424

CONCLUSIONES

Al observar detenidamente las tablas se puede notar que en la mayoría de los casos los cambios de color menores se dan en las concentraciones de colorante más bajas y los mayores en las concentraciones altas. De la misma manera se puede inferir que en los colorantes con mayor pigmentación como la grana cochinilla y el Añil hay más variación del color por el frote seco y lavado a altas temperaturas.

Las muestras teñidas de algodón fueron las que mostraron una diferencia total de color en las pruebas de estabilidad, así como las que fueron teñidas con concentraciones menores de colorante. Según los resultados se encuentra que el colorante extraído de la grana cochinilla no tiene buena fijación en la tela Algodón con ambos mordentes utilizados.

Al ser similares los valores máximos de las pérdidas de color por frotamiento de nuestras fibras teñidas con las sintéticas estos valores se pueden considerar como aceptables.

En general la prueba que más afectó el color fue el lavado a altas temperaturas. Estos valores nos indican que es necesario modificar la técnica de Mordentado, cambiando la concentración y/o el mordente utilizado para mejorar la fijación del color y poder llevar el uso de estos colorantes a escala industrial.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo de Dirección de apoyo a la Investigación y Posgrado (DAIP) por el proyecto financiado y aprobado para la convocatoria 2016-2017: "Teñido de fibras naturales con colorantes naturales, para la elaboración de productos textiles artesanales en colaboración con empresas de la región", así como a la Dra. Gabriela Arroyo Figueroa autora del proyecto por su constante dirección y apoyo durante todo el desarrollo. También se agradece a los alumnos Jesús Álvarez Canelo y Ana Castro Bustillos por su ayuda durante la realización de las pruebas.

BIBLIOGRAFIA

GARCÍA, B., SOLÍS, J. (2008). ¿Contaminando con sus jeans? Revista de divulgación científica y tecnológica de la Universidad Veracruzana. Núm. 1, Vol. XXI, Enero-Abril. Consultada en

<http://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol21num1/articulos/contaminando/index.html> (fecha de consulta 07-07-2017).

Konica Minolta. (2016). Entendiendo El Espacio de Color CIE L*A*B*. Consultado en <http://sensing.konicaminolta.com.mx/> (fecha de consulta 08-07-2017).

MARTÍNEZ, L. (2013) *El color y lo natural: colorantes y fibras naturales*. Buenos Aires. AR. Inst. Nacional de Tecnología Industrial.

OJEDA A. (2012). “*Teñido de fibra de abacá (Musa textilis) utilizando colorante extraído de la cochinilla (Dactylopius coccus Costa)*”. Licenciatura. Universidad de Loja, Ecuador.

PAREDES, B. (2002). “*Análisis y obtención de colorante natural a partir de la Baccharis latifolia (chilca)*”. Licenciatura. Universidad Técnica del Norte, Facultad De Ciencias Aplicadas.

WANG, J. (2006). “Tendencias mundiales en la industria textil” en Ivester L. y Neefus J. (coords.) *Industria de productos textiles. Enciclopedia de Salud y Seguridad en el trabajo* [pp. 89.4-89.5].

GENERACIÓN DE UN VECTOR QUE CONTENGA EL 5' - UTR sin uORFs DE LA POLIAMINO OXIDASA 4 DE *Arabidopsis thaliana*

García-Vásquez Itzel¹ y Guerrero-González María de la Luz²¹

RESUMEN

Las poliaminas, incluyendo la espermina, la espermidina, y la diamina precursora, la putrescina, son alquilaminas policatiónicas naturales que se requieren para el crecimiento, diferenciación y supervivencia de las células eucariotas. La necesidad de mantener los niveles intracelulares de poliaminas dentro de rangos específicos requiere una vía metabólica altamente regulada y preparada para cambios rápidos en respuesta a señales de crecimiento celular, cambios ambientales y estrés. En este trabajo, para comenzar a elucidar la función de los uORF presentes en el 5'-UTR de la Poliamina oxidasa 4 de *Arabidopsis thaliana* se generó un vector en el cual dichos uORFs fueron eliminados.

Palabras clave: poliaminas, *Arabidopsis thaliana*, uORF, *AtPAO4*, vector, regulación.

ABSTRACT

Polyamines, spermine, spermidine, and the precursor diamine, putrescine, are natural polycationic alkylamines that are required for the growth, differentiation, and survival of eukaryotic cells. The need to maintain intracellular levels of PAs within specific ranges require for a highly regulated metabolic for rapid changes in response to cell growth signals, environmental changes and stress. In this study, in order to elucidate the function of the uORFs present in the Polyamine oxidase 4 of *Arabidopsis thaliana* was done a plasmid containing the 5'-UTR in which the uORFs were eliminated.

Key words: polyamines, *Arabidopsis thaliana*, uORF, *AtPAO4*, plasmid, regulation.

INTRODUCCIÓN

Las poliaminas (PAs) son pequeñas moléculas presentes en todos los seres vivos. Debido a sus características bioquímicas, las PAs están implicadas en diversos procesos celulares como el crecimiento y desarrollo vegetal y en la respuesta de las plantas a condiciones de estrés. Por su carácter policatiónico pueden unirse y formar complejos con moléculas polianiónicas tales como algunas proteínas, los fosfolípidos, las pectinas, el ADN y el ARN, entre otras (Galston y Kaur-Shawney 1990). Las principales PAs son la putrescina (Put), la espermidina (Spd) y la espermina (Spm). Las poliaminas Put, Spd y Spm son catabolizadas por Diamino oxidasas (DAOs) y por poliaminas oxidasas (PAOs). Las PAOs degradan Spd y Spm así como sus derivados acetilados a través de un catabolismo terminal o de retro-conversión. En el catabolismo terminal las PAOs oxidan a la Spd y la Spm produciendo 4-aminobutanal y N-(3-aminopropil)-4-aminobutanal, respectivamente, además de 1,3-diaminopropano (DAP) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂). En el catabolismo de retro-conversión la degradación de la Spd y la Spm por las PAOs genera Put o Spd, respectivamente, además de H₂O₂ y un aminoaldehído (Tavladoraki et al., 2012). La planta modelo *Arabidopsis thaliana* posee cinco genes (*AtPAO1-5*) que codifican para PAOs. De estas, la *AtPAO2*, *AtPAO3* y *AtPAO4* son proteínas peroxisomales y están implicadas en el catabolismo de retro-conversión (Fincato et al., 2011).

La regulación de la expresión génica, particularmente el control traduccional, es fundamental en las plantas ya que permite cambios rápidos en la concentración de las proteínas. Las regiones de ARNm no traducidas (UTRs) son mediadores clave de la regulación traduccional ya que en ellos se encuentran elementos regulatorios, por ejemplo, los uORFs. Estudios previos han predicho miles de uORFs en los 5'-UTRs, sin embargo, la gran mayoría tiene función desconocida (Johnston et al., 2016). Los transcritos de *AtPAO2*, *AtPAO3* y *AtPAO4* tienen uORFs, pero solo se ha analizado la función del uORF de *AtPAO2* (Guerrero-González et al., 2014, 2016). *AtPAO4* tiene 2 uORFs, por ello, para analizar la función de estos elementos el objetivo de este trabajo es generar un vector binario el cual contenga una versión mutante (sin uORFs) del 5'-UTR de *AtPAO4*.

MÉTODOS Y MATERIALES.

Material vegetal y condiciones de cultivo

En el presente trabajo se emplearon semillas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia 0 (Col-0). Las semillas se esterilizaron superficialmente en una solución de NaClO al 20% (6% de cloro libre). Después de 6 lavados en agua destilada estéril, se sembraron en placas de medio Murashige-Skoog al 0.5x. Las placas se mantuvieron a 4°C durante 2 días y posteriormente fueron transferidas a una cámara de crecimiento vegetal a 22°C $\pm$ 2°C y un fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad.

Extracción de RNA total

Plantas de *A. thaliana* de 1 semana de edad fueron molidas en N₂ líquido y empleadas para la extracción de RNA total utilizando el reactivo Concert (Invitrogen). La integridad del RNA total fue analizada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. El RNA fue almacenado a -70°C para futuras aplicaciones.

Amplificación por PCR de una versión mutante (sin uORFs) del 5'-UTR de *AtPAO4*

Un fragmento de ADN sintético (gBlock), en el cual el codón de inicio (AUG) del uORF1 y uORF2 de *AtPAO4* fue cambiado por un codón CGU, fue sintetizado por la compañía Integrated DNA Technologies (IDT). El 5'-UTR mutante (sin uORFs) de *AtPAO4* fue amplificado empleando como molde 100 ng del gBlock, los primers utrPAO4-Fw (5'-GGTCACCAAACCCCTTCATCTT-3') y utrPAO4-Rv (5'-TGAAGATTTTGTGGAAAGAAACAG-3') y la enzima Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo scientific). La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador BIO-RAD T-100 Thermal Cycler, las condiciones fueron: una desnaturalización inicial a 98°C por 30 seg, seguido de 33 ciclos a 98°C por 10 seg, 60°C por 30 seg, 72°C por 15 seg y una extensión final a 72°C por 10 min. El producto de PCR (393 pb) fue separado electroforéticamente en un gel de agarosa al 0.8% y purificado empleando el kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Clonación del 5'-UTR (sin uORFs) de *AtPAO4*

El producto de PCR (5'-UTR sin uORFs), previamente purificado, fue sometido a una reacción de adenilación empleando la enzima Taq DNA polimerasa recombinante (Thermo Fisher Scientific) y posteriormente clonado en el vector de entrada pCR™8/GW/TOPO® (Thermo Fisher Scientific). La mezcla de reacción conteniendo 6 μ L PCR (300 ng), 1 μ L de solución salina y 1 μ L del vector de entrada fue incubada durante toda la noche a temperatura ambiente. Después, se almaceno a -20°C para su posterior transformación en células de *Escherichia coli*.

Transformación de células de *Escherichia coli* por electroporación

Las células electrocompetentes de *E. coli* XL1-Blue fueron descongeladas lentamente en hielo y posteriormente se les adiciono 300 ng del plásmido pCR8::nuORFPAO4. Después de 5 min, las células fueron transferidas a una celda de electroporación (0.2 cm) fría y sometidas a un pulso electrico de 2.5 kV durante 5.4 milisegundos empleando el MicroPulser™ Electroporator (BIORAD). Posteriormente, se les añadió 0.5 mL de medio Luria Bertani y se incubaron en agitación (200 rpm) por 2 hrs a 37°C. Finalmente, las células fueron sembradas en cajas Petri con medio LB suplementado con estreptomycin (50 μ g/mL) y se incubaron a 37 °C durante toda la noche.

Aislamiento de ADN plasmídico

El ADN plasmídico se extrajo a partir de cultivos de *E. coli* por el método de lisis alcalina (Birboim y Doly, 1979). Ocho colonias seleccionadas al azar fueron inoculadas en 3mL de medio LB líquido suplementado con estreptomycin (50 μ g/mL). El inóculo fue centrifugado a 13,300 rpm por 5min hasta obtener una pastilla con las células. Dicha pastilla se resuspendió en 250 μ L de solución I fría (glucosa 50mM, EDTA 10mM y Tris-HCL 25mM pH 8).y se dejó 5 min en hielo. Después, se agregaron 250 μ L de solución II (NaOH 0.2N y SDS 1%) mezclando inmediatamente por inmersión e incubando en hielo por 5min. Pasado este tiempo se agregaron 300 μ L de solución III (acetato de potasio 5M, ácido acético glacial 5M), se mezcló de inmediato por inversión y se incubó por 15min en hielo. Pasado el tiempo se centrifugó por 10min a 13,300 rpm y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo donde se le hizo una extracción fenol/cloroformo (150 μ L de fenol y 350 μ L de cloroformo)y se mezcló usando vortex. Se centrifugó por 10min a 13,300 rpm y el sobrenadante acuoso se transfirió a un tubo nuevo donde el ADN plasmídico se precipitó agregando 600 μ L de isopropanol frío y mezclando por inmersión. Después se centrifugó por 10min a 13,300 rpm y la pastilla obtenida se lavó con 1 mL de etanol al 70% frío, se centrifugo por 2min a 13,300 rpm y se dejó secar a temperatura ambiente durante 15min. Finalmente, el ADN plasmídico se resuspendió en 20 μ L de agua Milli-Q.

Análisis de los plásmidos mediante PCR y secuenciación

La presencia del 5'-UTR mutante (sin uORFs) así como su orientación en el vector fue confirmada por PCR empleando como molde 1 μ L de cada plásmido y los oligonucleótidos GW1 (5'-GTTGCAACAAATTGATGAGCAATGC-3') y utrPAO4-Rv (5'-TGAAGATTTTGTGGAAAGAAA CAG-3'). La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador BIO-RAD T-100 Thermal Cycler, las condiciones fueron: una desnaturalización inicial de 94°C por 5min seguido de 33 ciclos a 94°C por 30seg, 62°C por 30seg, 72°C por 30seg y una extensión final de 72°C por 10 min. El producto de PCR se separo en un gel del agarosa al 0.8%

teñido con EtBr y se visualizo en un Benchtop UV Transilluminator (UVP). Finalmente, el producto de PCR fue enviado a secuenciar con el oligonucleótido GW1 el cual se ancla en una región del vector pCRTM8/GW/TOPO.

RESULTADOS

La región 5'-UTR de *AtPAO4* tiene dos uORF. El uORF1 consta de 153 nt y codifica para un péptido predicho de 51 amino ácidos, mientras que el uORF2 tiene una longitud de 21 nt y codifica un péptido predicho de 7 amino ácidos (Figura 1). Sin embargo, la función de los uORF de *AtPAO4* aún no se ha analizado.

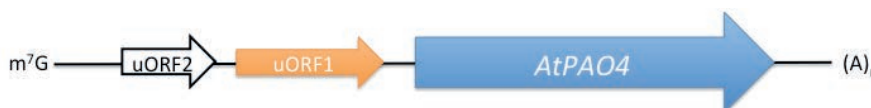


Figura 1 Representación esquemática del RNAm de *AtPAO4*.

Obtención del vector pCR8::nuORFPAO4

Para comenzar a estudiar el posible papel regulatorio de los uORF de *AtPAO4* se generó un vector el cual tiene el 5'-UTR (sin uORFs) de *AtPAO4*. Para amplificar el 5'-UTR sin uORFs se empleó un fragmento sintético de DNA en el cual el codón de inicio (AUG) de cada uORF fue cambiado por un codón CGU. El 5'-UTR sin uORFs fue ligado en el vector de entrada pCR8-TOPO y transformado en células de *E. coli*. Se seleccionaron 8 colonias al azar de las cuales se extrajo ADN plasmídico. Los plásmidos fueron nombrados como pCR8::nuORFPAO4-1 a -8 y analizados por PCR para determinar la orientación del 5'-UTR (sin uORFs).

De los plásmidos pCR8::nuORFPAO4-1, -3, -5 a -8 se logró la amplificación de un fragmento de aproximadamente 400 pb, este resultado indica que en dichos plásmidos el 5'-UTR sin uORFs se ligo en orientación 5'→3' (Figura 2). De estos, se secuenciaron los plásmidos pCR8::nuORFPAO4-1, -6, -7 y -8. Finalmente, con base en los resultados de la secuenciación se seleccionó el plásmido pCR8::nuORFPAO4-8 para futuros experimentos que contribuirán en el estudio de la función de los uORF de *AtPAO4*.

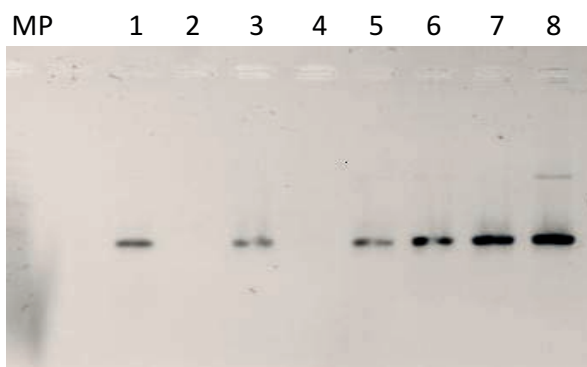


Figura 2 Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% del producto de PCR obtenido a partir de los plásmidos pUTRnuORF-1, -3, -5 a -8.

Obtención de RNA total

Con el objetivo de amplificar el 5'-UTR silvestre (con uORFs) de *AtPAO4* se extrajo RNA total de plantas de *A. thaliana* de 1 semana de edad (Figura 3). Actualmente, este RNA se encuentra almacenado a -70°C y será usado para obtener ADN complementario (cDNA) el cual servirá como molde para la amplificación del 5'-UTR. El 5'-UTR (con uORF) será empleado para generar un vector el cual contribuirá en el estudio de la función de los uORF de *AtPAO4*.

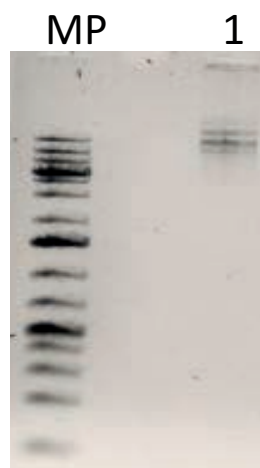


Figura 3 Electroforesis en gel de agarosa al 1% del RNA total obtenido de plantas de *A. thaliana* de 1 semana de edad.

CONCLUSIONES

Los estudios genéticos y genómicos realizados en *Arabidopsis* resultan de gran interés ya que proporcionan información valiosa que contribuye en nuestra comprensión de las funciones de las PAs. En este trabajo, se logró la obtención de un vector el cual tiene una versión sin uORFs del 5'-UTR de *AtPAO4*. Dicho vector será empleado para analizar la posible función regulatoria de los uORF de *AtPAO4*.

BIBLIOGRAFÍA

FINCATO P, MOSCHOU PN, SPEDALETTI V, TAVAZZA R, ANGELINI R, FEDERICO R, ROUBELAKIS-ANGELAKIS KA, TAVLADORAKI P (2011). Functional diversity inside the *Arabidopsis polyamine oxidase* gene family. *Journal of Experimental Botany*, 62:1155-1168.

GALSTON AW, KAUR-SHAWNEY R (1990). Polyamines in plant physiology. *Plant Physiology*, 94:[pp. 406-410].

GUERRERO-GONZÁLEZ M, ORTEGA-AMARO MA, JUÁREZ-MONTIEL M, JIMÉNEZ-BREMONT JF (2016). *Arabidopsis Polyamine oxidase-2 uORF* is required for downstream translational regulation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 108: [pp. 381-390].

GUERRERO-GONZÁLEZ ML, RODRÍGUEZ-KESSLER M, JIMÉNEZ-BREMONT JF (2014). uORF, a regulatory mechanism of the *Arabidopsis polyamine oxidase 2*. *Molecular Biology Reports*, 41(4):[pp.2427-2443].

JOHNSTONE TG, BAZZINI AA, GIRALDEZ AJ (2016). Upstream ORFs are prevalent translational repressors in vertebrates. *The EMBO Journal*, 35(7): [pp. 706-723].

TAVLADORAKI P, CONA A, FEDERICO R, TEMPERA G, VICECONTE N, SACCOCCIO S, BATTAGLIA V, TONINELLO A, AGOSTINELLI E (2012). Polyamine catabolism: target for antiproliferative therapies in animals and stress tolerance strategies in plants. *Amino Acids*, 42:[pp.411-426].

TRATAMIENTO PRELIMINAR DE FILTROS DE CIGARRO PARA OBTENCIÓN DE CARBÓN ACTIVADO DEL 19° VCRC

Javier Alejandro Martínez Ligas¹ y Gloria Guadalupe Treviño Vera²

RESUMEN

Las colillas de cigarro pueden ser usadas como una materia prima para la elaboración de carbón activado así como otros materiales carbonosos, el inconveniente aquí, es la gran cantidad de compuestos tóxicos que contienen, es por eso que se ha considerado el lavado de las colillas para evitar tener alguna acumulación indeseada. El tratamiento consiste en aplicar 3 destilaciones por arrastre de vapor para eliminar gran parte de los componentes volátiles, no volátiles, solubles en agua y compuestos inestables susceptibles a descomposición térmica por debajo de los 100 °C, esto con el fin de limpiar las fibras de acetato de celulosa y obtener un material más amigable con el medio ambiente.

ABSTRACT

Cigarette butts can be used as a raw material for the making of activated carbon as well as other carbonaceous materials, the inconvenience here is the large amount of toxic compounds they contain, which is why it has been considered to wash the butts to avoid have some unwanted accumulation. The treatment consists in applying 3 steam distillations to remove much of the volatile, non-volatile, water-soluble components and unstable compounds susceptible to thermal decomposition below 100 °C, in order to clean the fibers of cellulose acetate and to obtain a material more friendly with the environment.

Palabras Clave: Carbon activado, destilación por arrastre de vapor, acetato de celulosa.

INTRODUCCION

El material más común usado para supercondensadores ha sido el carbón activado debido a su bajo costo y fácil producción sin embargo este no es el mejor material para electrodos, pues a pesar de poseer una muy grande área superficial tiene sus desventajas en el tamaño de sus poros. A través de investigaciones se ha concluido que la sinergia de mesoporos y microporos dan excelentes resultados pues el intercambio iónico no se ve limitado por tener únicamente espacios tan pequeños como los que proporcionan los microporos. Los electrodos fabricados a partir de material pirolizado dopado con N₂ derivado de las colillas de cigarro han demostrado ser mejores que los que se encuentran actualmente en el mercado e incluso que otros electrodos que fueron hechos de nanotubos de carbono y grafeno ambos dopados con N₂ [1]. Las condiciones para la pirolisis son vastas dentro de la literatura pero en este texto se consideran solo unas cuantas como base [2-9]. Por fines prácticos las condiciones tomadas, fueron aproximadas para una carbonización a baja temperatura [2]. Si bien una colilla no posee suficientes elementos tóxicos como Cd y Pb para causar algo de lo cual preocuparse, a nivel industrial esta materia prima necesitaría un tratamiento para evitar la acumulación de los mencionados antes y muchos otros más elementos y compuestos presentes en un filtro de cigarro [10].

METODOLOGIA

Se inició con la recolección de colillas de cigarro en diversos lugares de la ciudad de Saltillo y Monclova, se recolectaron un aproximado de 1600 colillas de cigarro las cuales se les quito el papel que las envuelve y se juntaron en 10 lotes de 150 colillas cada uno, las colillas que contenían extremos con carbón activado o estaban en mal estado, fueron descartadas. Una vez con 10 lotes listos para su limpieza se montó un equipo de destilación por arrastre de vapor el cual fue operado con mechero bunsen, condensador Liebig de 400 mm, 2 matraces bola de 500 mL con sus respectivas juntas y complementos mostrados en la Figura 1.

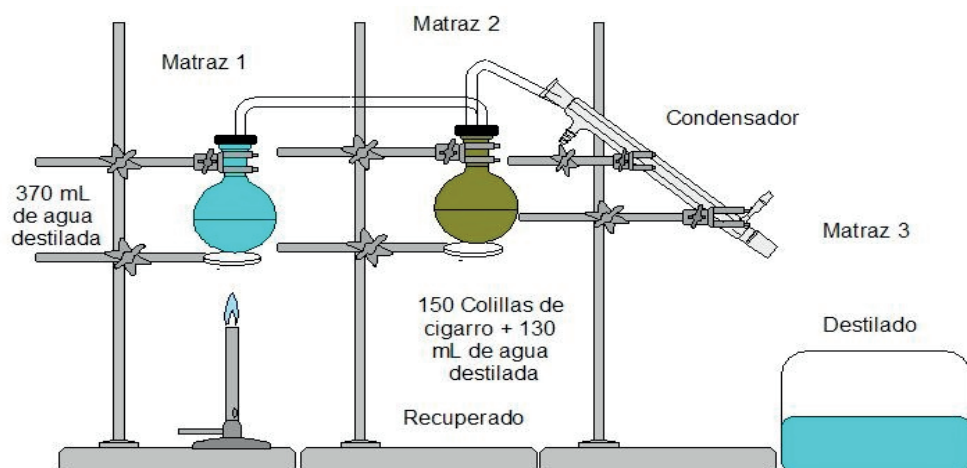


Figura 1. Ejemplo de cómo se montó el set de destilación por arrastre de vapor

En el matraz 1 se vierte la cantidad de 370 mL de agua destilada en el matraz 2 se introduce un lote junto con 130 mL de agua destilada y en el matraz 3 se recolecta el destilado, este procedimiento se repitió 10 veces cambiando el agua de los matraces 1 y 2, guardando muestras al azar de los destilados y recuperados (residuos), de las cuales se tomaron muestras de pH con un pHmetro Orion Star A211 de Thermo Scientific. Cada limpieza duro 40 min. en donde los volúmenes de destilado son variables registrando como mínimo 130 mL y máximo 200 mL aproximadamente, además queda como residuo (destilado + recuperado) un promedio de 400 mL/lavada. También se hizo la comparación de las fibras de acetato de celulosa antes y después del tratamiento observadas con un microscopio metalográfico invertido (MMI) Olympus GX51. Para el carbonizado se tomaron colillas sin tratamiento y con tratamiento y sin presencia de atmosfera inerte en una mufla (Carbolite Gero modelo CWF con controlador 3216) a 700 °C por 3 horas con una rampa de calentamiento de 10 °C min⁻¹ dando como total un tiempo de 250 minutos dentro de la mufla y también se introdujeron a la mufla (anteriormente mencionada) a 300 °C por 1 hora con una rampa de calentamiento de 5 °C min⁻¹ 4 muestras de 15 colillas cada una, dos con tratamiento y otras dos sin tratamiento, en cada par una muestra fue tapada y otra no.

RESULTADOS Y DISCUSION

En la Figura 2. Se muestran las diferencias en el aspecto de algunas de las colillas tomadas del lote #6. Para el pH de los residuos se obtuvieron los datos mostrados en la Tabla 1. El valor de pH de los residuos totales de una lavada con un volumen aproximado de 450 mL fue de 6.23 a una temperatura de 31 °C y ya neutralizado con una masa de .48 gr de NaHCO₃ el valor final de pH fue de 7.22 a 31 °C (Figura 3. B,C) esto indica que hay acidez y que las soluciones necesitan ser neutralizadas para poder ser desechadas.



Figura 2. (a) Colillas de cigarro (b) Colillas de cigarro sin papel envolvente (c) Colillas de cigarro tratadas

La inoculación de un hongo se observó en una solución diluida de residuo ya que hubo presencia de micelio (Figura 3. A) lo cual abre camino a otra investigación donde se estudiaría que tipo de hongo crece en ese medio, comparar los efectos de este hongo sobre los residuos (únicamente el recuperado) y en el mejor de los casos se lograría obtener un producto con propiedades que le permitan servir a la industria además de remover uno de los mayores contaminantes solidos actuales así como tratar sus residuos pero eso no se tratara en este texto. Como ya se explicó para neutralizar las soluciones se añadió una cantidad mínima de NaHCO₃ y se vio un cambio significativo por lo tanto da lugar a un tratamiento económico en términos de pH. A través del microscopio se ha notado una gran limpieza de las fibras de acetato de celulosa lo cual cumple con el objetivo de remover la contaminación presente en el material a reciclar. Las personas que se percataron de la recolección se concientizaron de la contaminación que generaban. La desventaja del tratamiento preliminar es que genera residuos a diferencia del método “one-step process” encontrado en la literatura, pero recalando que electrodos hechos con one-step process llevan todos los residuos que el tratamiento remueve y esto no es deseable pues aunque no se esté en contacto directo con capacitores diariamente, estos van a dar a la basura cuando han terminado su ciclo de utilidad y vuelven a ser contaminantes como las colillas. Se agregó un código QR donde se vincularon las micrografías tomadas para ser analizadas más detalladamente, el orden de las imágenes es: 1-sin tratamiento 5x, 2-con tratamiento 5x, 3-sin tratamiento 10x, 4-con tratamiento 10x, 5-sin tratamiento 20x, 6-con tratamiento 20x, 7-sin tratamiento 50x, 8-con tratamiento 50x, 9-sin tratamiento 100x, 10-con tratamiento 100x, 11-con tratamiento 100x Figura 4. En la Figura 5 y 6 se muestran algunas de dichas micrografías.

Tabla. 1. Valores de pH de las soluciones residuo en los lotes 5 y 6 tomadas al azar.

Valores de pH para el Lote #5

Lavada	Destilado	T	Recuperado	T
1	5.65	31.4	6.05	31.4
2	6.34	31.2	5.79	31.6
3	6.81	31.9	6.36	31.7

Valores de pH para el Lote #6

Lavada	Destilado	T	Recuperado	T
1	4.33	34.7	6.08	33.5
2	6.71	34.7	6.41	33.7
3	7.1	34.1	6.89	33.9

* La T es la Temperatura en °C a la cual se llevó a cabo cada una de las mediciones.



Figura 3. A- Micelio creciendo en una solución de recuperado (2da lavada-diluida) B- pH de residuos generados en una lavada (2da) C- pH de los residuos después de agregar .48 gr de NaHCO_3

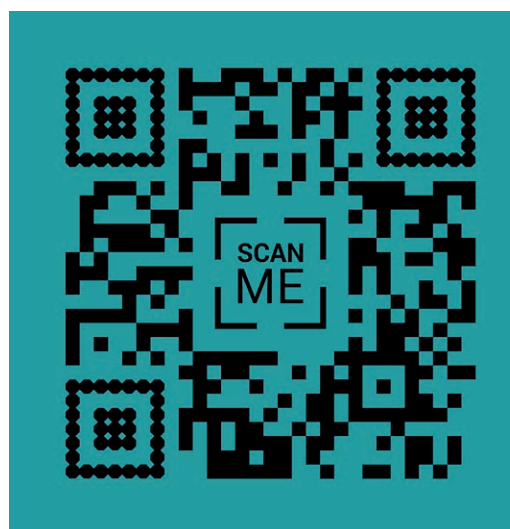


Figura 4. Código Quick Response (QR) donde fueron vinculadas las micrografías

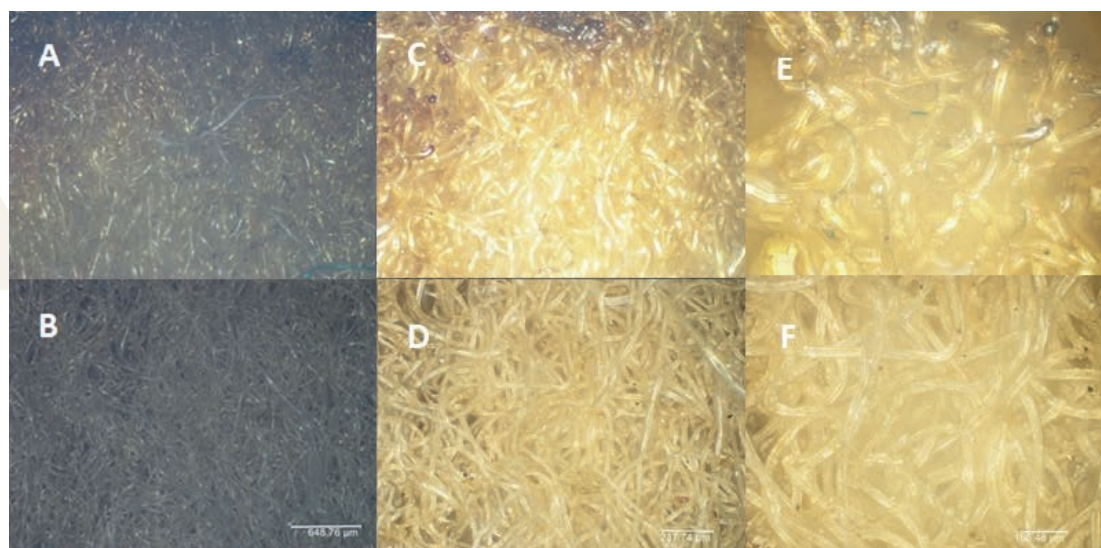


Figura 5. Micrografías a 5x, 10x y 20x (en ese orden horizontalmente) A, C y E fibras de colillas sin tratamiento B, D y F fibras de colillas con tratamiento.

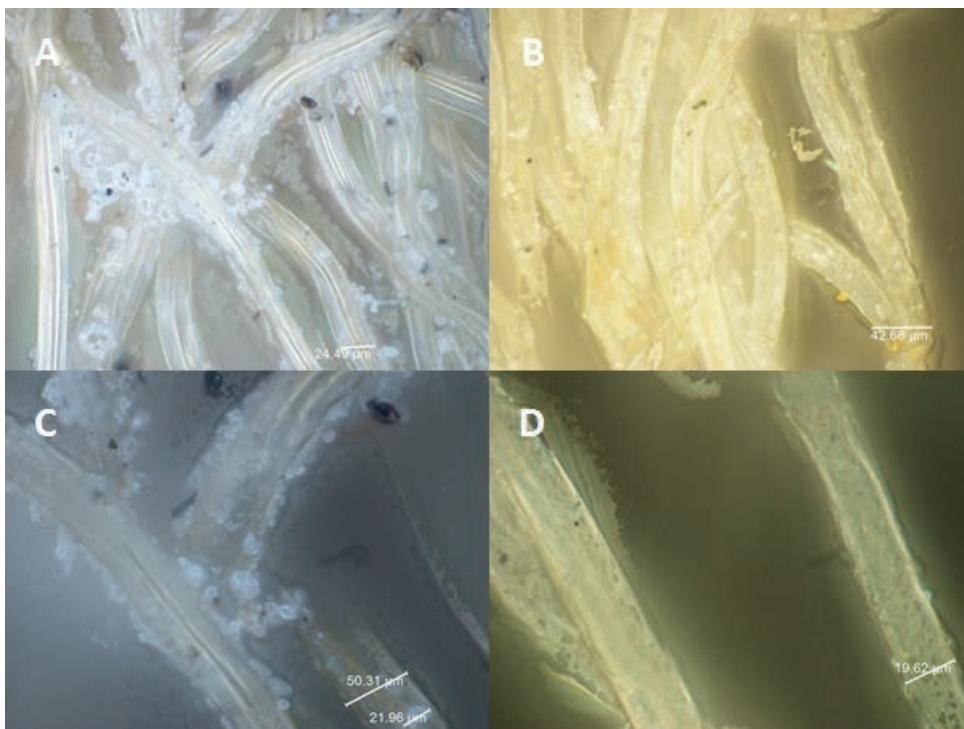


Figura 6. Micrografías a dos aumentos: A fibras de colillas sin tratamiento a 50x B fibras de colillas con tratamiento a 50x C fibras de colillas sin tratamiento a 100x D fibras de colillas con tratamiento a 100x

Al dejar por 3 horas colillas tratadas a 700 °C estas se volvieron cenizas en ausencia de atmosfera inerte, sin éxito al obtener algún material carbonoso, se cambiaron las condiciones para una pirolisis de baja temperatura en ausencia de atmosfera inerte, a 300 °C por una hora, la rampa de calentamiento se bajó a 5 °C min⁻¹ dando como resultado un material carbonoso ligero y poroso, el dicho material presento una disminución de tamaño y peso, y su aspecto fue opaco por la parte externa del filtro y en la parte interna fue brillante. Se hizo polvo mediante un mortero de ágata y se almaceno en recipientes plásticos para posteriores estudios.

CONCLUSIONES

El tratamiento aplicado a las colillas fue exitoso, aunque no se conoce con exactitud qué tan limpios quedan los filtros pues no todas las colillas y lavadas son iguales, si existe una clara remoción de sustancias. Los valores de pH dejan ver que a mayor número de lavadas el destilado se va tornando menos acido esto quiere decir que hay menos componentes ácidos que son arrastrados por el vapor dejando unas fibras más limpias y va condensándose mayoritariamente agua tendiendo a un pH neutro. El crecimiento de hongos en los residuos generados por el tratamiento mostrado en este texto da camino a posteriores investigaciones microbiológicas para ver el efecto que se tiene sobre estas soluciones. Se observó una gran diferencia en las sustancias impregnadas en la superficie de las fibras eliminando aquellas sustancias que no se ven a simple vista así como el penetrante olor de un cigarrillo e incluso un cambio en el color. El material carbonizado fue elaborado con colillas antes y después de tratarlas y como era de esperarse también se observó un cambio en los residuos remanentes en el crisol. Este tratamiento tiene sus desventajas (residuos) y ventajas (producto más puro) en una báscula que queda a criterio del lector.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Lee, M., (2014). "Preparation of energy storage material derived from a used cigarette filter for a supercapacitor electrode" en Nanotechnology, No. 25, pp. 8. Consultada en <http://iopscience.iop.org/article/10.1088/0957-4484/25/34/345601/meta;jsessionid=A9B974C2C054964B76A4C3D98541997C.ip-10-40-1-105> (20-06-2017).
- [2] Tang, M., (1964). "Carbonization of cellulose fibers—I. Low temperature pyrolysis" en Carbon, No. 2, pp. 211-220. Consultada en <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0008622364900351> (20-06-2017).
- [3] Bacon, R., (1964). "Carbonization of cellulose fibers—II. Physical property study" en Carbon No. 2, pp. 221-225. Consultada en <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0008622364900363> (21-06-2017).
- [4] Chen, L-F., (2012). "Synthesis of Nitrogen-Doped Porous Carbon Nanofibers as an Efficient Electrode Material for Supercapacitors" en ACS Nano No. 8, pp. 7092-7102. Consultada en <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/nn302147s> (21-06-2017).
- [5] Soltani, S., (2012). "The Effect of Pyrolysis Time and Heating Rate on the Surface Area and Pore Size Properties of Porous Carbon Obtained from the Pyrolysis of a Cellulosic Waste" en IPCBEE No. 35, pp. 11-14. Consultada en <http://www.ipcbee.com/vol35/003-ICEII2012-E006.pdf> (21-06-2017).
- [6] Zhang, Z., (2017). "The carbonization temperature effect on the electrochemical performance of nitrogen-doped carbon monoliths" en Electrochimica Acta No. 242, pp. 100-106. Consultada en <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001346861730988X> (22-06-2017).
- [7] Duran, G., (2016). "Synthesis of CuNP-modified carbon electrodes obtained by pyrolysis of paper" en Sensors and Actuators B: Chemical No. 227, pp. 626-633. Consultada en <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925400515308145> (23-06-2017).

- 
- [8] Hosoya, T,. (2007). "Cellulose–hemicellulose and cellulose–lignin interactions in wood pyrolysis at gasification temperature" en Journal of Analytical and Applied Pyrolysis No. 80, pp. 118-125. Consultada en <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165237007000125> (25-06-2017).
- [9] Tian, X,. (2017). "Synthesis of micro- and meso-porous carbon derived from cellulose as an electrode material for supercapacitors" en Electrochimica Acta No. 241, pp. 170-178. Consultada en https://www.researchgate.net/publication/315879444_Synthesis_of_micro_and_mesoporous_carbon_derived_from_cellulose_as_an_electrode_material_for_supercapacitors (25-06-2017)
- [10] Moerman, JW,. (2011). "Analysis of metals leached from smoked cigarette litter" en Tobacco Control No. 20, pp. 30-35. Consultada en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3088461/> (25-06-2017)

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi mama, mi hermana, la maestra Gloria y al Verano de la Ciencia Regional por apoyarme para poder hacer esta investigación y sacar provecho de nuevas experiencias en el campo científico.

PUESTA EN MARCHA DE UN EQUIPO DE SINTESIS DE PELICULAS DELGADAS POR EL METODO DE DEPOSITACION QUIMICA DE VAPOR ASISTIDA POR AEROSOL

Jesus David Lopez Preciado¹ y Juan Ramos Cano²

RESUMEN

Diferentes métodos existen para sintetizar partículas nanométricas que se dividen en métodos físicos y métodos químicos, una clasificación de estos aparece en el punto (1.1.5). La forma de sintetizarse depende principalmente de blancos que contienen el precursor o de soluciones que contienen el precursor. Desde luego existen metodologías para utilizar cada uno de estos métodos, estas metodologías están relacionadas con temperaturas de depósito, concentración de precursores, velocidades de depósito, entre otras. El objetivo de este trabajo es mostrar un procedimiento de puesta en marcha de un equipo de deposición química asistida por aerosol (CVD-AA), para conocer el comportamiento de estas variables. Cabe mencionar que este equipo fue instalado por personal especializado del centro de investigación de materiales avanzados campus Chihuahua, dirigido por el Dr. Mario Miky Yoshida y el M.C. Pedro Piza. El equipo está considerado como semiautomático debido a que consta de un software diseñado especialmente para controlar las variables importantes, para esto inicialmente describiremos las partes más importantes del equipo y el software utilizado para posteriormente comentar las variables más importantes y su control. Posteriormente se correrán pruebas de algunos materiales ferroeléctricos.

Palabras Claves: CVD-AA, películas delgadas, Titanato de Plomo ($PbTiO_3$).

ABSTRACT

Different methods exist to synthesize nanometric particles that are divided into physical methods and chemical methods, a classification of these appears in point (1.1.5). The way of synthesizing depends mainly on targets containing the precursor or solutions containing the precursor. Of course there are methodologies to use each of these methods, these methodologies are related to storage temperatures, concentration of precursors, rates of deposit, among others. The objective of this work is to show a procedure for the commissioning of an aerosol-assisted chemical deposition equipment (CVD-AA), to know the behavior of these variables. It should be mentioned that this equipment was installed by specialized personnel of the research center of advanced materials campus Chihuahua, directed by Dr. Mario Miky Yoshida and M.C. Pedro Piza. The equipment is considered semi-automatic because it consists of a software specially designed to control the important variables, for this we will initially describe the most important parts of the equipment and the software used to later discuss the most important variables and their control. Subsequently, some ferroelectric materials will be tested.

Keywords: CVD-AA, Thin films, Lead Titanate

INTRODUCCIÓN

De acuerdo al objetivo planteado en este trabajo se presenta el método de elaboración de películas delgadas por medio de CVD-AA incluyendo las partes fundamentales del equipo así como su comportamiento y funcionamiento de cada parte. Este método tiene como principales ventajas 1) facilidad de agregar dopantes en cualquier proporción a la película tan solo con el hecho de introducirlos a la solución precursora, 2) el método no requiere de partes costosas como bombas de alto vacío u otros dispositivos, representando una gran ventaja en instalaciones a nivel industrial [1]. Principalmente su bajo compromiso de costos en la síntesis, el método CVD-AA está siendo muy utilizado en la deposición de películas delgadas, debido principalmente al buen control en la velocidad de deposición, temperaturas de deposición relativamente bajas y un amplio rango de precursores utilizados, con lo que se aseguran entre otras cosas, un adecuado grado de purificación de los óxidos obtenidos, además de un adecuado control de la composición, estequiometría y morfología de las partículas [2]. El equipo mencionado con el cual se realizó este trabajo está considerado como semiautomático ya que consta de un software con el se puede controlar directamente la temperatura del horno, la velocidad de las toberas, el flujo del gas, la distancia de recorrido de la tobera, número de capas y arranque del nebulizador. Este trabajo contiene información sobre cómo preparar las soluciones a partir de los precursores a depositar, así como las partes principales del equipo, sus variables más importantes a controlar y la influencia de estas sobre la película, donde se incluye el manejo del software, así como el resultado de unas pruebas corridas en el equipo [3-6].

MÉTODOS Y MATERIALES

La parte experimental de este trabajo, consta de la deposición de una película de titanato de plomo ($PbTiO_3$) y un tratamiento térmico de recocido, ya que estas películas son nanocristalinas [7-10]. La caracterización de espesor y microestructura se realizó en un microscopio electrónico de barrido (MEB) marca Hitachi. La figura 1 muestra un diagrama de flujo de la síntesis de las películas de $PbTiO_3$.

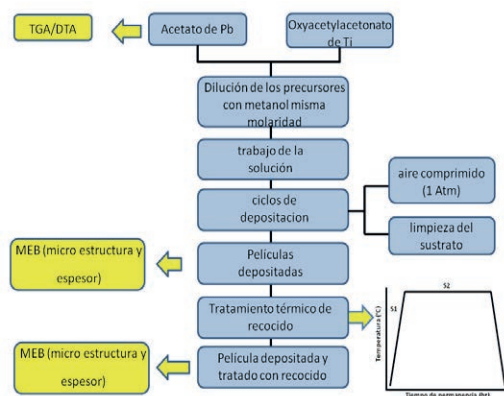


figura 1.- Diagrama de flujo correspondiente a la síntesis de películas de PbTiO3

Equipo utilizado

- Reactor de películas delgadas CVD-AA (incluyendo tobera, nebulizador piezoeléctrico, etc.)
- Precursores de (a) Acetato de Plomo trihidratado $[\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}]$, (b) Oxiacetylacetonato de Titanio (IV), $[(\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2)_2\text{TiO}_2]$.
- Balanza analítica tipo Symmetry, Cure-Palmer, PA120
- Metanol 99.9% de pureza
- Sustratos de Si (Pt/Ti/SiO₂/Si)
- Vidriería y utensilios para preparar las soluciones
- Horno de tubo horizontal Carbolite
- Parrilla de agitación
- Agitador magnético
- MEB (microscopio electrónico de barrido) marca Hitashi

Proceso de síntesis para las muestras de PbTiO3 (PT)

Inicialmente análisis termogravimétricos (TGA) deben de ser realizados, con el objetivo de conocer las temperaturas de descomposición de las sales precursoras utilizadas durante su transformación al óxido deseado. Por otro lado conociendo los pesos moleculares de los reactantes (%) y comparándolo con los pesos finales (%) es posible conocer los posibles productos de la reacción. Esto es que tipo de óxido es el que se forma. Resultados de cambios de fase durante la reacción también pueden ser conocidos a través de la curva diferencial térmica gravimétrica (DTA/TGA). En su análisis curvas hacia arriba indican reacciones o transformaciones de fase exotérmicas, y hacia abajo endotérmicas. Esto es muy importante porque con esta herramienta podemos predecir experimentalmente tanto la fase deseada, temperatura de transformación, así como la temperatura de estabilidad del producto. En nuestro caso la temperatura teórica de deposición (450°C) la obtuvimos de análisis termogravimétricos anteriormente realizados [1]. Posteriormente se preparo una solución de 150 ml de titanato de plomo (PT) a una concentración de .05 molar, con solutos separados, se determinó el peso de los solutos con la siguiente ecuación (1):

$$g = MVPM \quad (1)$$

Donde:

g= gramos del soluto requerido

M= molaridad

V=volumen

PM= peso molecular

Acetato de Plomo tri-hidratado $[\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}] = 379.33 \text{ gr/mol}$

$$g = (.05 \text{ Mol/Lts})(.15 \text{ Lts})(379.33 \text{ gr/mol})$$

$$g = 2.844 \text{ gr}$$

Oxiacetylacetonato de Titanio (IV), $[(\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2)_2\text{TiO}_2] = 262.08 \text{ gr/mol}$

$$g = (.05 \text{ Mol/Lts})(.15 \text{ L})(262.08 \text{ gr/mol})$$

$$g = 1.971 \text{ gr}$$

Se pesaron 2.844 gr de acetato de plomo y 1.971 gr de Titanio (IV) disueltos en 150 ml de metanol y fueron puestos en agitación por un lapso de 1 hr a nivel de agitación 6, una vez preparada la solución se procedió a la síntesis iniciando con la programación del software del equipo CVD-AA con las siguientes condiciones: Capas del depósito=10, longitud de la plataforma= 25mm. En la tabla 1 se muestran las condiciones más importantes de la síntesis. Se depositaron dos muestras denominadas PT/1 y PT/2 sobre sustratos de platino, el tamaño de la muestra fue de 25mm la cual se corto en dos partes, una para hacer un análisis antes y después del tratamiento térmico. Para esto los sustratos fueron lavados con metanol y acetona 99.9%, los cuales se colocaron en el porta muestras del equipo ver figura 2. Las condiciones de la síntesis de las muestras se presentan en la **tabla 1**.



figura 2.- Equipo de deposición química de vapor asistida por aerosol (CVD-AA)

Tabla 1.- condiciones mas importantes a controlar para las muestras PT/1 y PT/2

Condiciones a controlar	Muestra PT/1	Muestra PT/2
Concentración(Mol/Lts)	.05	.05
Temperatura del horno (°C)	475	475
Velocidad de tobera(mm/min)	10	10

Ambas muestras presentan las mismas condiciones de depósito, solamente que la temperatura del tratamiento térmico del recocido tuvo una variación importante. Las muestra se sometieron a un tratamiento térmico de recocido (debido a que este tipo de películas tienen una fase metaestable llamada pirocloro que se forma a temperaturas bajas y no son nanocristalinas por lo que es necesario realizar un recocido para obtener la fase deseada)[7-10]. El tratamiento térmico se realizo en un horno de tubo horizontal Carbolite con las siguientes condiciones: para la muestra PT/1 el horno inicio a temperatura ambiente a una velocidad de 10°C/min hasta los 800°C en un lapso aproximado de 1hr 20 min, después se mantuvo a temperatura de 800°C por 12 hrs de tiempo de permanencia y se enfrio a temperatura ambiente teniendo un tiempo total del tratamiento de 14 hrs y 40 min como se muestra en la **figura 3**.

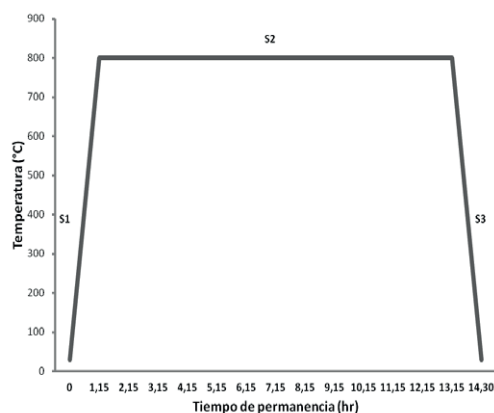


figura 3.- Rampa de tratamiento térmico de recocido de la muestra PT/1

Para la muestra PT/2 el horno inicio a temperatura ambiente a una velocidad de 10°C/min hasta los 800°C en un lapso aproximado de 1hr 20 min, después se mantuvo a una temperatura de 800°C por 6 hrs de tiempo de permanencia y se enfrio a temperatura ambiente teniendo un tiempo total del tratamiento de 8 hrs y 40 min como se muestra en la **figura 4**.

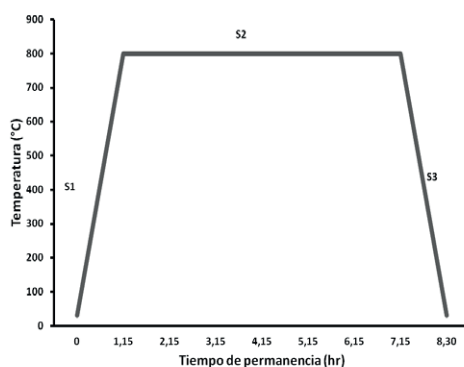


figura 4.-Rampa de tratamiento térmico de recocido

de la muestra PT/2

Finalmente las muestras PT/1 y PT/2 con recocido y sin recocido fueron caracterizadas en microscopio electrónico de barrido (MEB) con la finalidad única de verificar que realmente existió depósito sobre las películas.

RESULTADOS

Referente al análisis y los resultados obtenidos tenemos lo siguiente: las **figuras 5 y 6** corresponden a las muestras PT/1 y PT/2 sin recocido, y en las **figuras 7 y 8** corresponden a las muestras PT/1 y PT/2 con recocido. En su análisis se observa que las muestras PT/1 y PT/2 sin recocido no presentan un grano cristalizado, mientras que las muestras PT/1 y PT/2 muestran una micro estructura granular a nivel nanométrico característico de los materiales recocidos, además se observó que aparecen en las imágenes partículas de precursores de titanio y plomo que no fueron totalmente disueltas. Las **figuras 9, 10, 11 y 12** presentan espesores de las películas PT/1 y PT/2 con y sin recocido, con lo que se justifica que efectivamente el equipo está apto para sintetizar películas delgadas, que fue el objetivo fundamental de este trabajo.

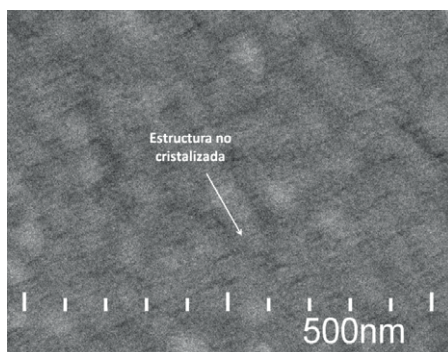


Figura 5.- Imagen superficial de la muestra PT/2 sin recocido

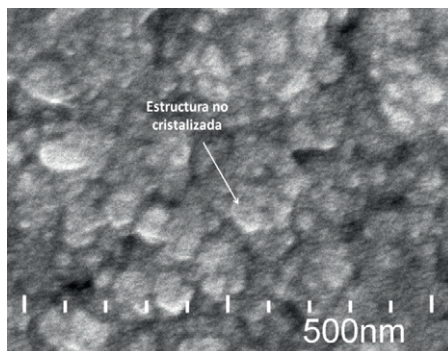


figura 6.- Imagen superficial de la muestra PT/1 sin recocido

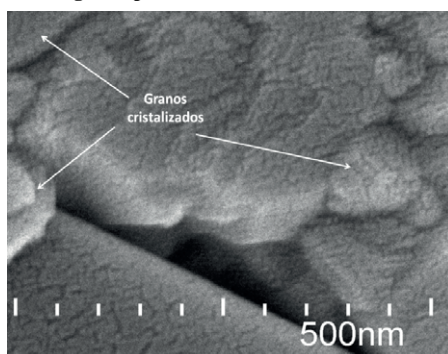


figura 7.- Imagen superficial de la muestra PT/1 recocida

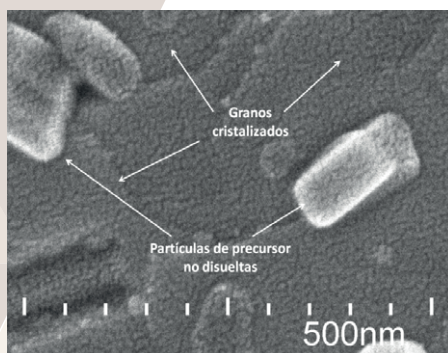


figura 8.- Imagen superficial de la muestra PT/2 recocida

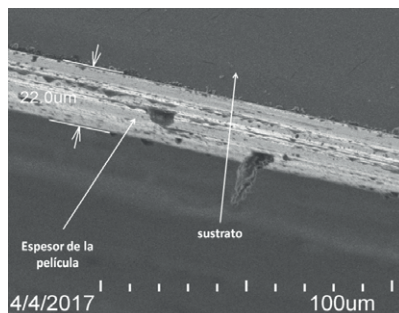


figura 9.- Espesor de película PT/1 sin recocido

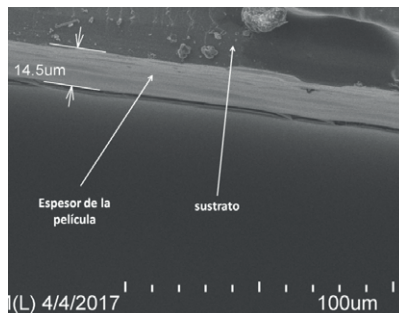


figura 10.- Espesor de película PT/2 sin recocido



figura 11.- Espesor de película PT/1 con recocido

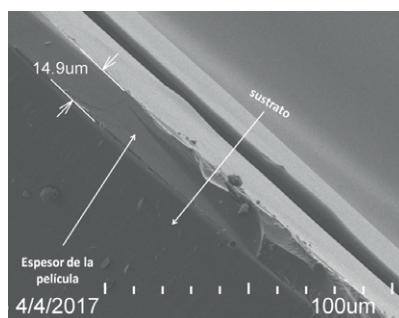


figura 12.- Espesor de película PT/2 con recocido

CONCLUSIONES

Según la caracterización en microscopio electrónico de barrido (MEB) se concluye que efectivamente se pudo obtener deposito sobre el sustrato, esto lo justifica el espesor de las películas como aparece en las figuras 9, 10, 11 y 12. Por otro lado los granos que aparecen en las figuras 7 y 8 dan un indicador que efectivamente hubo una cristalización de las películas. Además de demostrar la funcionalidad del equipo mencionado.

REFERENCIAS

Artículos de revista

- [1]. Ramos CJ. Procesamiento de películas PZT mediante CVD-AA, cerca a la zona morfotrópica y caracterización de sus propiedades microestructurales, ferroeléctricas y mecánicas., Tesis Ph.D. Chihuahua (Mexico): Centro de Investigacion en Materiales Avanzados, 2013.
- [2]. A.R. Raju, C.N.R. Rao, 1995 Oriented Ferroelectric Thin Films of PbTiO_3 , $(\text{Pb}, \text{La})\text{TiO}_3$, and $\text{Pb}(\text{Zr}, \text{Ti})\text{O}_3$ by Nebulized Spray Pyrolysis. *Appl. Phys. Lett.* 66: 896-898.
- [3]. B Thangaraju and P Kaliannan. Optical and Structural studies on spray deposited PbO thin films. *Semicond. Sci. Technol.* 15(2000) 542-545.

- 
- [4]. Nickolay Golego, S.A. Studenikin, and Michael Cocivera. Properties of Dielectric BaTiO₃ Thin films Prepared by Spray Pyrolysis. *Chem Mater.* 1998, 10, 2000-2005.
 - [5]. P. Amezaga-Madrid, W. Antunez-Flores, M. Miki-Yoshida. Microstructural Properties of multi-nano-layered YSZ thin films. *Journal of Alloys and Compounds*, *Journal of Alloys and Compounds* 495 (2010) 629-633.
 - [6]. M. Cruz, L. Hernan, J. Morales, L. Sanchez. Spray Pyrolysis as a method for preparing PbO coatings amenable to use in lead-acid batteries. *Journal of Power Sources* 108 (2000) 35-40.
 - [7]. Levi, C.G. 1998 Metaestability and microstructure evolution in the synthesis of inorganics from precursors. *Actamater.* 46: 787-800
 - [8]. Naratip Vittayakorn, Gobwute Rujijanagul, David P. Cann. Investigation of the influence of thermal treatment on the morphologies, dielectric and ferroelectric properties of PZT-based ceramics. *Journal of Alloys and Compounds* 440 (2007) 259-264
 - [9]. D. Barrow, C.V.R. Vasants Kumar, R. Pascual and M. Sayer. Crystallization of sol gel PZT on aluminium and platinum metallizations. *Mat. Res. Soc. Symp. Proc.* 243 (1992) 113-122.
 - [10]. Ye-Sul Jeong, Hyun-Uk Lee, Sang-A Lee, Jong-Pil Kim, Hyun-Gyu Kim, Se-Young Jeong, Chae-Ryong Cho. Annealing effect of platinum-based electrodes on physical properties of PZT thin films. *Current Applied Physics* 9 (2009) 115-119.

PREPARACIÓN Y TRATAMIENTO QUÍMICO DE MINERAL DE CELESTITA PARA OBTENER COMPUESTOS MAGNETICOS

José Alfonso Rodríguez Nañez¹ y Ma. Gloria Rosales Sosa²

¹ Facultad de Metalurgia, Universidad Autónoma de Coahuila, Carretera 57 Kilómetro 4.5, Estancias de San Juan, 25710 Monclova, Coahuila, josealfonso_jarn@hotmail.com

² Facultad de Metalurgia, Universidad Autónoma de Coahuila, Carretera 57 Kilómetro 4.5, Estancias de San Juan, 25710 Monclova, Coahuila, mrosales@uadec.edu.mx

RESUMEN

Muestras de mineral de Celestita fueron molidas hasta una malla menor de 400, posteriormente este mineral fue lixiviado con HCl al 8% para eliminación de impurezas. La celestita Lixiviada (SrSO_4) se pone a reaccionar con Sulfato ferroso (Fe_2SO_4), de HCl al 10% y oxalato de Amonio variando la temperatura desde 75 hasta 95°C. Posteriormente es filtrada, lavada, secada y calcinada a una temperatura de 850°C.

Palabras clave: Celestita (Sulfato de Estroncio), Sulfato Ferroso, Ferrita de Estroncio.

ABSTRACT

Samples of Celestite ore were ground to a mesh size of less than 400, after which this mineral was leached with 8% HCl to remove impurities. Leached celestite (SrSO_4) is reacted with ferrous sulfate (Fe_2SO_4), 10% HCl and Ammonium oxalate, varying the temperature from 75 to 95 °C. It is then filtered, washed, dried and calcined at a temperature of 850 °C.

Keywords: Celestite (Strontium Sulphate), Ferrous Sulfate, Strontium Ferrite.

INTRODUCCION

El mineral principalmente utilizado fue la Celestita. La Celestita es un sulfato de estroncio $\text{Sr}(\text{SO}_4)$ su color es ligeramente azul, puede ser blanco, amarillo y raras veces verde o rojizo; a veces es fluorescente. Los componentes del estroncio tienen una tendencia a precipitar o adsorber pequeñas cantidades de manganeso, hierro y sílice de soluciones de sosa cáustica.

El estado productor de celestita en México es Coahuila, La celestita es usada principalmente en la producción de carbonato de estroncio para la industria de cristales en la producción de pantallas de TV, ferrita en polvo, electrólisis de zinc y transformación de otros químicos tales como el nitrato de estroncio, clorado y cromado, otras aplicaciones son las pirotécnicas y fabricación de cerámica.

Los yacimientos de Celestita en México aportan el 25% de la producción mundial, pero debido a que no cuentan con procesos de conversión que satisfagan los requisitos de costo y tecnología, el mineral es exportado a un precio muy por debajo del mineral ya transformado [1]. El objetivo de este trabajo de investigación es obtener un compuesto SrSO_4 , que se obtiene de un mineral de Celestita y también obtener especies magnéticas de Hierro, al hacer reaccionar esta especie con Sulfato ferroso y luego eliminar sulfatos para obtener un polvo en forma de Hexaferrita de Estroncio. La materia prima y las especies resultantes serán caracterizados con DRX.

La interacción del óxido férrico con el óxido de estroncio produce ferritas con distintas estequiometrías ($\text{SrFe}_{12}\text{O}_{19}$, SrFe_2O_4 , $\text{Sr}_2\text{Fe}_2\text{O}_5$ y $\text{Sr}_3\text{Fe}_2\text{O}_6$). Entre estos productos, se destaca la hexaferrita de estroncio ($\text{SrFe}_{12}\text{O}_{19}$), un óxido ferrimagnético, que cristaliza en el sistema hexagonal con 64 iones por celda unitaria (24 iones Fe^{3+}), en 11 sitios de simetría diferentes (grupo espacial $\text{P6}_3/\text{mmc}$). La hexaferrita de estroncio se usa ampliamente como material magnético duro y permanente en los medios de magnetofónicos alta-densidad y dispositivos de microondas [2].

METODOS Y MATERIALES

Para hacer la experimentación se tuvo que trasladar una cantidad de mineral de Celestita proveniente de la mina ubicada en Cuatro Ciénegas, Coahuila “La Fe”.



Figura 1. Mineral de Celestita antes de trituración y molienda.

Como el mineral estaba aún compactado en pedazos grandes en el laboratorio de metalurgia extractiva se trituró el mineral, en total 1 kg de mineral fue triturado en una “Trituradora de Mandíbulas” marca DENVER, y esta hizo que el mineral quedara en partes más pequeñas, pero aun así no se podía experimentar, así que después de la trituradora se pasó el mineral al molino de bolas.



Figura 2. Mineral de Celestita después de la trituración.

Se utilizó un molino de bolas de la marca BICO el cual consiste en un recipiente donde se deposita el mineral junto con bolas de metal de diferentes diámetros que al girar este las bolas van chocando con el mineral dejándolo pulverizado completamente, para que el mineral quedara como era requerido en total el molino dio 4000 revoluciones.

Luego de tener el mineral completamente pulverizado para separar el tamaño de partículas se utilizó un Tamizador RO-TAP el cual por medio de vibración separa los diferentes tamaños de partícula, el mineral era requerido pasando la maya 400 la cual tiene una abertura de 0.44 mm para un mejor rendimiento al momento de pasar a hacer una lixiviación.



Figura 3. Mineral de Celestita Pulverizado y tamizado a 400 mallas (0.40mm)

En la Lixiviación se tomaron 200 gramos del mineral pulverizado y se diluyo en Ácido Clorhídrico HCl al 8% agitando constantemente durante 15 min, después se filtró la disolución en un embudo de vidrio y se dejó secar el mineral que resulto después de la Lixiviación.

Para el método de la síntesis en dos Matrazes Erlenmeyerse hicieron dos disoluciones por separado:

Matraz 1	Matraz 2
3.86grs de Mineral (SrSO_4)	4.4 grs de Oxalato de amonio NH_4
1.52grs de FeSO_4	30 ml de H_2O
3 ml de HCL al 10%	
20 ml de H_2O	

Tabla 1. Minerales y cantidades utilizados antes de realizar la síntesis.



Figura 4. Matraces con las cantidades especificadas en la Tabla 1.

Las dos Disoluciones se calentaron a alrededor de 75°C en una estufa de laboratorio marca LAB TECH, mientras se agitaba, se añadió la disolución del matraz 2 al matraz 1, la mezcla de reacción, bajo agitación continua, se calentó durante 5 minutos a una temperatura comprendida entre 90°C y 95°C.

Después de dejar enfriar el precipitado de oxalato mixto amarillo se filtró utilizando un embudo de vidrio y se lavó con agua y después del filtrado se secó durante varias horas.



Figura 5. Precipitado de oxalato antes de la filtración final

Figura 6. Lavado del precipitado para eliminar sulfuros

El residuo que quedo en el papel filtro que se transfirió a un crisol de 10 ml con tapa, Se repitió el mismo proceso para una muestra 2; pero el residuo del papel filtro fue lavada por repetidas ocasiones hasta que el residuo filtrado estuviera cristalino lo que significaba que estaba libre de sulfatos los cuales daban color amarillento a la solución. Ambas muestras se colocaron en un horno de mufla marca TERLABY se calentaron entre los 800 y 900°C durante 12 horas, y se dejaron enfriar lentamente dentro del horno para obtener una mejor cristalinidad de los productos resultantes.

RESULTADOS

El análisis químico de la celestita por DRX, nos indica gran coincidencia con el compuesto Sulfato de Estroncio lo que significa que nuestra reacción de síntesis fue correcta para la obtención de Ferritas Magnéticas.

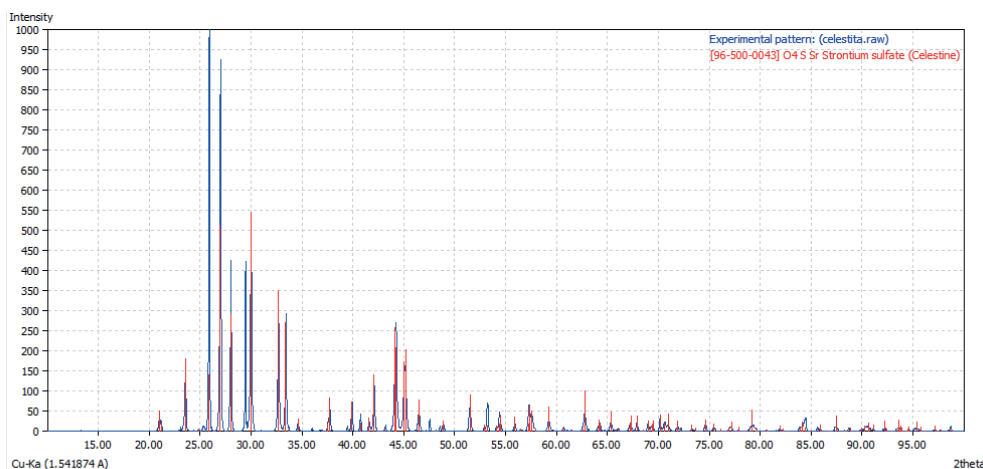


Figura 7. Difracto grama que muestra el análisis químico de la Celestita

La caracterización del polvo obtenido después del tratamiento térmico DRX, se encuentra en espera, esta se hará en la empresa CIQA en la ciudad de Saltillo Coahuila, se espera con este tratamiento a la celestita podamos obtener la ferrita de estroncio.

CONCLUSIONES

- 1.-La celestita es un precursor muy importante del sulfato de estroncio,
- 2.-El análisis químico de la celestita mostro en su mayoría picos característicos de sulfato de estroncio.
- 3.-El tamaño de partícula menor a 400 mallas es apropiado para efectiva reacción química de la celestita en los medios utilizados
- 4.-Se espera que el tratamiento químico dado a la celestita en presencia de sulfato ferroso sea efectivo para obtener la ferrita de estroncio

BIBLIOGRAFIA

[1]<http://www.izt.uam.mx/cime21/extensos/Extenso%20NM-5.pdf>

[2]<http://www.bdigital.unal.edu.co/3814/1/01197336.2011.pdf>

[3] Rakshit, S.K.; Parida, S.C.; Dash, S.; Singh, Z.; Sen, B.K.; Venugopal, V. Thermodynamic studies on $\text{SrFe}_{12}\text{O}_{19}(\text{s})$, $\text{SrFe}_2\text{O}_4(\text{s})$, $\text{Sr}_2\text{Fe}_2\text{O}_5(\text{s})$ and $\text{Sr}_3\text{Fe}_2\text{O}_6(\text{s})$ Journal of Solid State Chemistry., 2007, 180, 523–532. Narváez, José Alejandro. Síntesis y Caracterización de espinelas, 2004. Trabajo de Grado, Carrera de Química. Universidad Nacional de Colombia.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a los profesores que estuvieron apoyando de diferentes formas en este proyecto durante el mes de trabajo en la Facultad de Metalurgia en especial a la maestra encargada del laboratorio de la Facultad: M.I. Gloria Guadalupe Treviño Vera quien estuvo en la disposición de brindar el material que se utilizó y el apoyo requerido en dudas sobre los procedimientos.

Al Comité del Verano de la Ciencia de la Región Centro por darme la oportunidad en esta muy grata experiencia de investigación.

LIXIVIACION DE MINERALES UTILIZANDO REACTIVOS ORGANICOS E INORGANICOS

José Guadalupe Moreno Cedillos¹ y Ma. Gloria Rosales Sosa²

RESUMEN

En el presente documento se pretende informar sobre la parte experimental sobre la lixiviación de un mineral conocido comúnmente como Celestita, para hacer su lixiviación experimental se usaron dos ácidos uno inorgánico: ácido clorhídrico y uno orgánico: ácido cítrico, lo que se pretende es poner a competir estos dos ácidos para obtener datos, los cuales nos reflejan cuál de estos ácidos nos tiene un mejor rendimiento de mineral más puro, además de otra variable medida aquí es el efecto del tamaño de la partícula debido a que en el método experimental se puede observar una relación de diferencia de rendimiento al observar la diferencia del tamaño de la partícula utilizada.

ABSTRACT

In this paper we intend to report on the experimental part on the leaching of a mineral commonly known as Celestite, to make its experimental leaching two acids were used inorganic: nitric acid and one organic: citric acid, which is intended to Compete these two acids to obtain data, which reflect us which of these acids we have a better yield of ore. In addition to another variable measured here is the effect of the size of the piece by which in the experimental method a relationship of the difference in performance can be observed by observing the difference in the size of the part used.

INTRODUCCION

La celestita es un sulfato de estroncio $\text{Sr}(\text{SO}_4)$ con peso específico de 3.9 a 4.0; dureza de 3.0 a 3.5; su color es ligeramente azul, puede ser blanco, amarillo y raras veces verde o rojizo; a veces es fluorescente. Los componentes del estroncio tienen una tendencia a precipitar o adsorber pequeñas cantidades de manganeso, hierro y sílice de soluciones de sosa cáustica.

El estado productor de celestita en México es Coahuila; en el 2012, en base a las cifras del Anuario Estadístico de la Minería Mexicana Ampliada, la producción de celestita se ubicó en 46,190 toneladas, teniendo un incremento de 13.6% en relación al año anterior.

Este mineral tiende a utilizarse en la preparación de nitrato de estroncio para fuegos artificiales, balas trazadoras y otras sales de estroncio empleadas en el refinado de azúcar de remolacha. También se usa en la industria de la energía nuclear. En minería el término lixiviación se define como un proceso hidro-metalúrgico. Esto significa que, con la ayuda del agua como medio de transporte, se usan químicos específicos para separar los minerales valiosos (y solubles en dichos líquidos) de los no valiosos.

Lo que se pretende demostrar es como varía el porcentaje de rendimiento del mineral al utilizar un ácido orgánico como lo es el ácido cítrico en lugar de un ácido inorgánico como lo es el ácido clorhídrico al lixiviarse, lo que se pretende demostrar es que puede ser mejor un ácido orgánico, porque puede ser más económico utilizarse y además representa un menor riesgo ecológico, aunque en la literatura la lixiviación de la Celestita nos muestra que desde hace años se ha utilizado el ácido clorhídrico.

METODOS Y MATERIALES

En este método experimental se tuvo que obtener primero el mineral que provenía de la Mina Santa Ana ubicada en Cuatrocienegas Coahuila.

Al tener en nuestras manos el mineral, proseguimos a triturar en la Trituradora una cantidad de 2.5 Kg. De lo cual 1 Kg se depositó en el molino de bolas y por último lo obtenido del proceso anterior se pasó al Tamizador ROTAP.

El proceso de trituración es para obtener pedazos más fragmentados del mineral debido a que como es entregado es en forma de piedras grandes.

En el molino de bolas se pretende hacer aún más pequeño el mineral consiste en un recipiente de metal el cual contiene bolas de diferentes pesos, las cuales irán triturando el mineral, en este proceso se requiere que ese recipiente de 4000 vueltas.

¹Facultad de Ciencias Químicas, Cuahatemosc #362, Zona Centro, C.P: 25000, Saltillo, Coahuila, josemorenocedillos@uadec.edu.mx

²Facultad de Metalurgia, Monclova, Coahuila. mrosales@uadec.edu.mx

Después de haber sido triturado el mineral se pasa al Tamizador el cual se encarga de separar el mineral en diferentes tamaños de partículas atreves de las mayas que se han utilizado en este caso fueron mayas de medidas de 200, 325 y 400

Después de haber obtenido el material con el que se trabajó se prosiguió a realizar la lixiviación.

Como primer paso se requiere preparar las soluciones al 8% de ácido nítrico como de ácido cítrico, para el primer caso se tomaron 8 ml de ácido nítrico y se agregar 92 ml de agua para el caso del ácido cítrico se agregaron 8 g de ácido y 92 ml de agua.

Se tomaron 100 gramos de cada maya de tamaño de partícula esto con el fin de realizar un ensayo con cada acido en diferentes tiempos a 10 min y 20 min, es decir se tomaron 25 gramos para cada prueba.

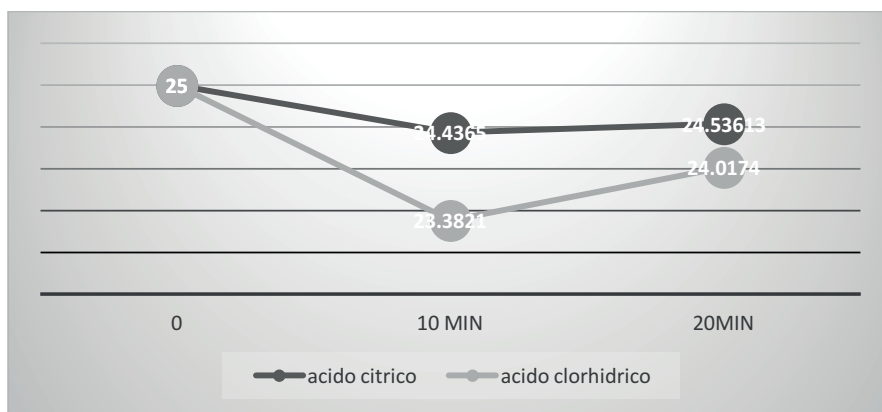
Una vez pesado el mineral se prosigue a agregar a la solución acida la cual se pondrá en agitación Magnética con una velocidad del número 2 y se dejó 10 o 20 min dependiendo de cuál ensayo estuviéramos llevando a cabo. El material utilizado fue una Parilla de calentamiento con agitador de la marca Dahian Labtech 2016062474.

Después de la agitación se prosigue a filtrar para lo cual se necesita un papel filtro previamente pesado.

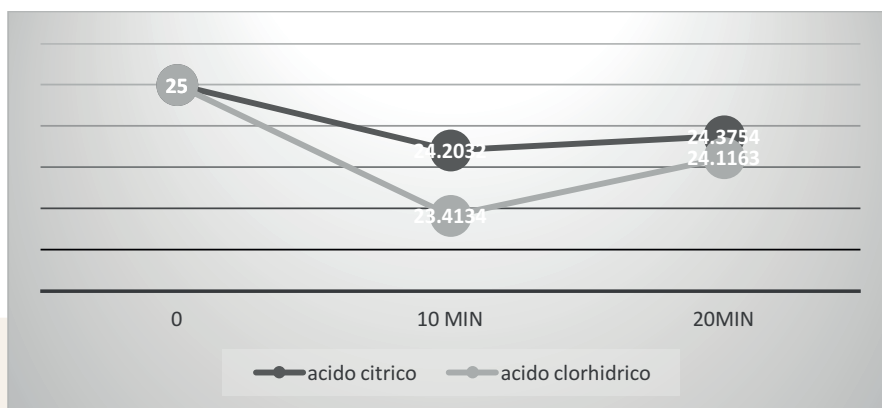
Ya una vez el papel filtro seco con nuestro mineral se pesa, para sacar el rendimiento total obtenido.

RESULTADOS

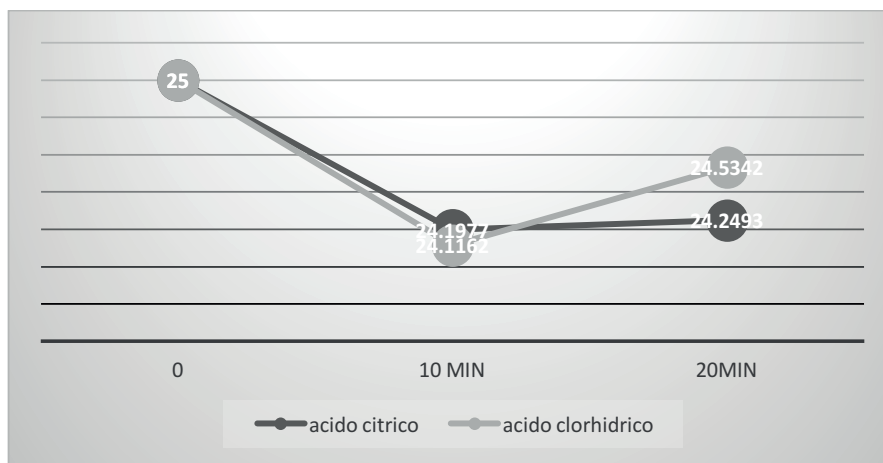
Mis resultados se interpretaran a través de gráficas, las cuales mostraran el peso obtenido de cada muestra en relación al acido usado y el tiempo expuesto agitación.



Grafica 1. Efecto de la maya 200 en ácido clorhídrico y cítrico a diferentes tiempos



Grafica 2. Efecto de la maya 325 en ácido clorhídrico y cítrico a diferentes tiempos



Grafica 3. Efecto de la maya 400 en ácido clorhídrico y cítrico a diferentes tiempos

Se determinó el uso de gráficas para facilitar la interpretación de quien le este reporte, en las gráficas podemos observar el comportamiento del proceso de lixiviación a diferentes tiempos, a diferente tamaño de partícula y con diferentes ácidos.

A menor tamaño de partícula con el ácido cítrico, es menor el rendimiento obtenido, además se puede deducir que el tiempo de agitación es proporcional también al rendimiento es decir entre más tiempo de agitación este expuesto mayor será la concentración final mientras que con el uso del ácido clorhídrico a mayor tamaño de partícula más rendimiento se obtendrá pero de igual manera lo afecta el tiempo de agitación.

CONCLUSIONES

Se logró determinar que el efecto que tiene un ácido orgánico contra uno inorgánico en el proceso de lixiviación de celestita es diferente es decir, con el ácido orgánico obtuvimos un mayor rendimiento que es lo que se pretendía desde un inicio para poder ver la posibilidad de sustituir de manera permanente el uso de un ácido inorgánico. Sin embargo aún hay un camino amplio que recorrer debido a que es conveniente realizar una caracterización del mineral obtenido en ambos casos para observar su grado de pureza, y saber si este puede ser un método viable para la industria de la Celestita.

BIBLIOGRAFÍA

Libros

M.H. Klaproth, *Beiträge zur Chemischen Kenntniss der Mineralkörper*, II, 1797, p. 92-98 (as Schwefelsaurer Strontianit aus Pennsylvanien).

Artículos en línea

http://www.economia.gob.mx/files/comunidad_negocios/industria_comercio/informacionSectorial/minero/pm_celestita_1013.pdf (fecha de consulta 15/07/2017)

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE CEPAS CON CAPACIDAD DE BIODEGRADACIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES “COV’S”

Pérez Mireles Karen Allinet¹ y Conde Bajas Eloy²

RESUMEN

En la actualidad existen diversos procesos industriales que generan gases contaminantes, que al ser de difícil degradación se acumulan en el ambiente, o reaccionan con otras sustancias generando compuestos peligrosos que dañan a este, y provocan a su vez serios daños a la salud de la población que habita en la cercanía. Un problema principal de la generación de gases contaminantes es la emisión de los llamados Compuestos Orgánicos Volátiles (COV's), que son contaminantes tóxicos ambientales prioritarios, debido a su potencial carcinogénico y toxicidad incluso a bajas concentraciones. En México y Guanajuato existen giros artesanales e industriales que utilizan mezclas de COV's o componentes individuales que son difíciles de degradar, es por esto que existen diversas tecnologías para dar tratamiento a las emisiones de estos, una alternativa viable es la biofiltración, esta implica la utilización de microorganismos aplicados en sistemas controlados, donde son utilizadas fases bióticas previamente adaptadas a degradar un contaminante en específico, el cual es utilizado como única fuente de carbono y energía. El presente trabajo abordó la caracterización de consorcios microbianos CRI, CRII y CRIII previamente identificados con capacidad de degradar COV's en específico Benceno, Tolueno, Etilbenceno, Xilenos “BTEX”. La caracterización bioquímica se desarrolló utilizando técnicas de microbiología convencional y bioquímicas. La caracterización bioquímica servirá para un desarrollo tecnológico utilizando reactores biológicos denominados “biofiltros” para el tratamiento de COV's en la región centro.

Palabras clave: actividad enzimática, BTEX, consorcios microbianos.

INTRODUCCIÓN

Un método de tratamiento biológico de contaminantes gaseosos como BTEX y con sus características principales es la biofiltración el cual es un proceso para el tratamiento de contaminantes gaseosos orgánicos e inorgánicos. En este proceso el aire contaminado pasa a través del material filtrante (lecho) donde se encuentran adheridos los microorganismos en una biopelícula, el flujo gaseoso es transferido al medio líquido en donde los microorganismos utilizan al contaminante como su fuente de carbón y energía, dando como resultado dióxido de Carbono, agua, sales inorgánicas, biomasa y residuos poliméricos nuevos. Los microorganismos utilizados para la degradación dependen de las características de los contaminantes. La degradación del contaminante se da en la biopelícula formada, después de que se transfiere al medio líquido, ya que los microorganismos no pueden tomarlo directamente de la fase gaseosa (Hernández-Vega P., 2012). En referencia a los microorganismos utilizados en sistemas de biofiltración, estos pueden ser propios del material orgánico filtrante, por ejemplo microorganismos presentes en suelo o compostas (Cox y col, 1993 citado por Conde Barajas, 1999), aunque también se desarrollan consorcios especializados en la degradación de ciertos contaminantes para obtener mayores eficiencias de eliminación del contaminante al tener desde un inicio organismos adaptados y capaces de utilizarlo como fuente de carbono y energía (Hernández-Vega P., 2012, 2002). Los microorganismos elegidos para el tratamiento de COV's deben ser capaces de oxidar los contaminantes en condiciones de no esterilidad, ya que los gases contaminados normalmente no tienen un tratamiento previo como esterilidad, principalmente por cuestiones económicas (Hernández-Vega P., 2012). Para los tratamientos de aire contaminado, sin embargo, la mayoría de los microorganismos presentes en los biofiltros son bacterias y hongos, encontrándose bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Bacillus corynebacterium*, *Sphingomonas*, *Xanthomonas*, *Nocardia*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Xanthobacter*, *Clostridium* y *Enterobacter*. En cuanto al reino fungi se pueden encontrar *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *fusarium*, *Bjerkandera adusta* entre otros (Bedolla R. H.I., 2015). Muchos microorganismos pueden utilizar compuestos aromáticos como única fuente de carbono, la degradación de este tipo de compuestos es muy importante debido a su naturaleza tóxica, los microorganismos capaces de degradarlos previenen la acumulación en el ambiente, impidiendo una seria contaminación de los suelos y agua subterránea, logrando evitar un gran daño ecológico (Bedolla R. H.I., 2015). De lo anterior se hace importante entonces la caracterización microbiológica y bioquímica-enzimática de microorganismos que conforman consorcios microbianos con capacidad de biodegradación e BTEX. Bajo este contexto, el objetivo de este trabajo fue caracterizar por técnicas microbiológicas convencionales y pruebas bioquímicas cepas microbianas pertenecientes a consorcios microbianos previamente adaptados y seleccionados por su capacidad de biodegradar BTEX en fase gas (validados de estudios previos), con la finalidad de integrar un desarrollo tecnológico de degradación de COV's en la región bajo denominados biofiltros.

MÉTODOS Y MATERIALES

Obtención de cepas microbianas. Las cepas microbianas se aislaron de muestras de suelos, el muestreo se realizó al azar, tomándose las muestras a una profundidad de 20 cm, de acuerdo a la norma NOM-021-RECNAT-2000 de SEMARNAT. Se tomaron muestras de suelo de tres zonas del TNM-Instituto Tecnológico Nacional de México – Instituto Tecnológico de Celaya Guanajuato., y muestras de suelo en tres zonas agrícolas del poblado de Acolman en el Estado de México. Las muestras fueron llevadas al laboratorio para ser procesadas y acondicionadas para obtener los consorcios microbianos. El consorcio 1 (CIR) se obtuvo de las primeras

muestras, el consorcio 2 (CIIR) se obtuvo de las muestras de suelo agrícola y el consorcio 3 (CIIR) se elaboró con la mezcla de los dos consorcios anteriores. **Adaptación de cepas microbianas.** Se realizaron una serie de pre-incubaciones aerobias de las muestras de suelo, utilizando frascos de vidrio de un litro, en primera instancia con thinner en una concentración del 2% v/v por espacio de 6 a 8 meses (Hernández-Vega P., 2012), se continuo el proceso de adaptación utilizando una mezcla de tolueno, etilbenceno y xilenos a una concentración del 2% v/v, posteriormente con una mezcla BTEX al 2% v/v y finalmente se disminuyó la concentración de la solución BTEX al 1% v/v. De las muestras de suelo se tomaron 10 g, colocándose nuevamente en frascos de vidrio de un litro, en donde se les ajusto la humedad al 60%, se saturó la atmósfera con BTEX por espacio de 1 mes, posteriormente se hicieron sub-muestreos los cuales se mantuvieron bajo condiciones antes mencionadas. **Preparación de los consorcios.** Este proceso se realizó mediante la técnica de centrifugación fraccionada extrayendo las células de las muestras de suelo saturado con solución BTEX. De las células obtenidas se elaboraron los consorcios, los cuales se mantuvieron en sistemas microcosmos con medio mineral (80 mL) y solución BTEX a una concentración del 1% v/v, con un pH de 7.0, a una temperatura de 30°C, realizando aireaciones semanales para asegurar la no limitación de oxígeno de manera axénica, con un cambio del medio mineral cada 2 semanas. El medio mineral se usó como suplemento de minerales en las etapas de adaptación, selección, preparación de consorcios y en los ajustes de humedad en los sistemas microcosmos durante las dinámicas de degradación de los compuestos BTEX. **Aislamiento, mantenimiento y conservación de las cepas.** De los sistemas microcosmos se tomaron muestras de 1 mL para siembras en cajas Petri con medio agar infusión de cerebro y corazón (BHI), las cajas Petri se mantuvieron en desecadores con una atmósfera saturada de BTEX, utilizando un algodón impregnado de dicha solución, a temperatura ambiente por un mes, en el cual se siguió añadiendo solución BTEX al algodón bajo condiciones estériles. Posterior al procedimiento antes mencionado, las cepas con un mayor crecimiento en el medio agar infusión de cerebro y corazón (BHI), fueron separadas por técnicas convencionales mediante resiembra continua hasta obtener cultivos axénicos. Las cepas axénicas se han mantenido realizando resiembras en medio agar infusión de cerebro y corazón (BHI), y agar Nutritivo. Las cajas Petri se colocaron bajo refrigeración y se han realizado resiembras cada mes y medio, también se llevó a cabo la conservación en sistemas microcosmos con medio mineral (80 mL) adicionado con solución BTEX 1% (v/v) y realizándose la crio-conservación de las cepas en glicerol con solución BTEX (2 µL), estas muestras se mantienen en refrigeración a una temperatura de -20°C. **Caracterización de cepas.** En este procedimiento se observó características morfológicas (microscópicas y macroscópicas), utilizando pruebas bioquímicas de asimilación de sustratos, así como pruebas con medios selectivos y diferenciales (TSI, MacConkey, SIM, EMB) y la técnica de tinción de Gram (Bedolla R. H.I., 2015). Para las pruebas enzimáticas-bioquímicas se utilizó un kit denominado APIZYM® la cual contempla un test de actividad de 19 enzimas relacionadas con diferentes metabolismos de diferentes sustratos orgánicos e inorgánicos. Las determinaciones de las 19 enzimas destacan la familia de las fosfatasa, esterasas, amino peptidasas, proteasas y glicosil hidrolasas. Para su medición por el kit APYZIM® se realizó mediante la obtención de un extracto enzimático con la metodología de Boluda et al. (2014) y por el proveedor bioMérieux. Para la lectura de los valores obtenidos fue mediante la carta de colores establecida por el proveedor bioMérieux.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Morfología colonial. Se reactivaron las cepas axénicas de los diferentes consorcios mediante una serie de resiembras con estria cruzada en medio sólido, agar nutritivo (AN) a temperatura ambiente o a 37 °C por espacio de 24, 48 y 72 horas. Se realizó una reactivación previa a la caracterización morfológica a nivel macroscópico, ya que algunas de las cepas se habían contaminado de sus cultivos originales. Para la verificación de su condición axénica se tomaron muestras en fresco-húmedo de cada cultivo y se observó en un microscopio óptico marca LEYCA en los campos de luz visible 40X y 100X su pureza o condición axénica. De los cultivos axénicos comprobados por microscopia óptica se observaron las características morfológicas o coloniales que a continuación se muestran en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Características Morfológicas de las cepas en estudio.

Cepas-Nombre ID	Forma	Elevación	Margen	Color
CIR-C2	circular	convexa	entero	Crema
CIIR-C1	circular	convexa	Entero	Crema
CIIR-C2	irregular	plana	entero	Amarilla
CIIR-C3	puntiforme	convexa	entero	Crema
CIIR-C4	circular	elevada	entero	Crema
CIIR-C5CH	irregular	convexa	entero	Amarilla
CIIR-C5M	irregular	Plana	entero	Crema
CIIR-C5N	puntiforme	convexa	entero	Amarilla

Morfología celular. Del paso anterior se verificaron los cultivos en medio sólido su morfología celular en un microscopio óptico marca LEYCA en los campos de luz visible 40X y 100X su pureza o condición axénica, así. Se tomó de 200 a 250 microlitros de solución salina al 0.85% p/p estéril, para realizar la suspensión celular en húmedo o fresco. Se toma una asada de cada cultivo axénico de cada uno de los consorcios microbianos en estudio y se realizó la suspensión en portaobjetos de vidrio estériles. Las suspensiones, así como las asadas se realizaron en condiciones estériles en una campana de siembra de flujo laminar. También se verificó su tinción de Gram mediante un kit marca HyCel siguiendo las instrucciones del proveedor. Ver **Tabla 2**.

Tabla 2. Morfología celular y Tinción de Gram.

Cepas-Nombre ID	GRAM	Morfología celular
CIR-C2	+	Bacilos
CIIR-C1	+	Bacilos
CIIR-C2	+	Bacilos
CIIR-C3	-	Cocos
CIIR-C4	+	Bacilos
CIIR-C5CH	-	Cocos
CIIR-C5M	+	Bacilos

CIIR-C5N	-	Cocos
----------	---	-------

Crecimiento en medios selectivos y diferenciales (pruebas bioquímicas): TSI (triple hierro azúcar). Medio universalmente empleado para la diferenciación de enterobacterias, en base a la fermentación de glucosa, lactosa, sacarosa y a la producción de ácido sulfhídrico. Ver **Tabla 3**.

Tabla 3. Prueba de TSI

Cepas-Nombre ID	PICO/FONDO*	Producción de Gas	Producción de ácido Sulfhídrico
CIR-C2	A/A	-	-
CIIR-C1	K/K	-	-
CIIR-C3	A/A	-	+
CIIR-C4	K/A	-	-
CIIR-C5 CH	A/A	-	-
CIIR-C5 M	A/A	-	-
CIIR-C5 N	K/K	-	-

***Nota:** 1-Pico alcalino/fondo ácido (pico rojo/fondo amarillo): el microorganismo solamente fermenta la glucosa. 2-Pico ácido/fondo ácido (pico amarillo/fondo amarillo): el microorganismo fermenta glucosa, lactosa y/o sacarosa. 3-Pico alcalino/fondo alcalino (pico rojo/fondo rojo): el microorganismo es no fermentador de azúcares. 4-La presencia de burbujas, o ruptura del medio de cultivo, indica que el microorganismo produce gas. 5-El ennegrecimiento del medio indica que el microorganismo produce ácido sulfhídrico.

Medio SIM. Es un medio semisólido destinado a verificar la movilidad, producción de indol y de sulfuro de hidrógeno en un mismo tubo. Es útil para diferenciar miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. Ver **Tabla 4**.

Tabla 4. SIM

Cepas-Nombre ID	Movilidad	Producción de ácido Sulfhídrico
CIR-C2	+	-
CIIR-C1	+	-
CIIR-C3	+	-
CIIR-C4	+	-
CIIR-C5 CH	+	-
CIIR-C5 M	+	-
CIIR-C5 N	+	-

Nota: *Cepas móviles:* producen turbidez del medio, que se extiende más allá de la línea de siembra. *Cepas inmóviles:* el crecimiento se observa solamente en la línea de siembra. *Cepas SH₂ positivas:* ennegrecimiento a lo largo de la línea de siembra o en todo el medio. *Cepas SH₂ negativas:* el medio permanece sin cambio de color. *Cepas indol positivas:* desarrollo de color rojo luego de agregar el reactivo de Kovac's o de Erlich. *Cepas indol negativas:* sin cambio de color.

Medio EMB. Este medio (también denominado E.A.M.) es utilizado para el aislamiento selectivo de bacilos Gram negativos de rápido desarrollo y escasas exigencias nutricionales. Permite el desarrollo de todas las especies de la familia *Enterobacteriaceae*. Ver **Tabla 5**.

Tabla 5. Medio EMB

Cepas-Nombre ID	EMB
CIR-C2	-
CIIR-C1	-
CIIR-C3	-
CIIR-C4	-
CIIR-C5 CH	-
CIIR-C5 M	-
CIIR-C5 N	-

Medio MaC Conkey.

Este medio se utiliza para el aislamiento de bacilos Gram negativos de fácil desarrollo, aerobios y anaerobios facultativos. Permite diferenciar bacterias que utilizan o no, lactosa en muestras clínicas, de agua y alimentos. Todas las especies de la familia *Enterobacteriaceae* desarrollan en el mismo. Ver **Tabla 6**.

Tabla 6. Medio MaC Conkey

Cepas-Nombre ID	MAC CONKEY
CIR-C2	Blancusca y rosada
CIIR-C1	-
CIIR-C3	-
CIIR-C4	-
CIIR-C5 CH	-
CIIR-C5 M	-
CIIR-C5 N	-

Pruebas Enzimáticas APIZYM.

Finalmente, la tabla 7. se muestran los resultados del APIZYM de cada una de las cepas axénicas aisladas de los consorcios microbianos con capacidad de degradar BTEX. Ver **Tabla 7**.

Enzimas CLAVE	MICROORGANISMOS								
	CIIR-C1	CIIR-C2	CIIR-C1	CIIR-C2	CIIR-C3	CIIR-C4	CIIR-C5CH	CIIR-C5M	CIIR-C5N
Control	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FAL	-	-	-	-	-	-	-	-	+
EST	+	+	-	+	-	+	-	+	-
EST-LIP	+	+	+	+	+	-	+	+	-
LIP	-	-	-	-	+	-	-	-	-
LEU-AA	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VAL-AA	+	-	+	-	-	+	-	+	+
CIS-AA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TRIP	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α -QUI	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FAC	-	+	-	-	-	-	-	+	+
n-AS-BI-p	-	-	-	-	-	-	-	-	+
α -GAL	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β -GAL	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β -GRD	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α -GSD	-	-	+	-	+	-	+	-	+
β -GSD	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N-a- β -GSD	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α -MAN	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α -FUC	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Nota: Actividad enzimática determinada mediante kit APIZYM. FAL: Fosfatasa alcalina; FAC: Fosfatasa ácida; n-AS-BI-p: naphthol-AS-BI-phosphohydrolasa; FHD: Fosfohidrolasa; EST: Esterasa; EST-LIP: Esterasa-lipasa; LIP: Lipasa; LEU-AA: Leucina arilamidasa; VAL-AA: Valina arilamidasa; CIS-AA: Cisteína arilamidasa; TRIP: Tripsina; α -QUI: α -Quimiotripsina; α -GAL: α -Galactosa; β -GAL: β -Galactosidasa; β -GRD: β -Glucoronidasa; α -GSD: α -Glucosidasa; β -GSD: β -Glucosidasa; N-a- β -GSD: N-Acetil- β -D-Glucosaminidasa; α -MAN: α -Manosa; α -FUC: α -Fucosidasa).

CONCLUSIONES

Las cepas difieren en sus características morfológicas coloniales excepto en el margen, en su morfología celular y tinción Gram, las cepas CIIR-C3, CIIR-C5CH y CIIR-C5N son cocos gram negativos, siendo las demás cepas bacilos gram positivos. Para la diferenciación de enterobacterias, en base a la fermentación de glucosa, lactosa, sacarosa y a la producción de ácido sulfhídrico las cepas mostraron resultados negativos. En cuanto al medio SIM que es útil para diferenciar miembros de la familia *Enterobacteriaceae* el enfoque que se dio en su utilización fue para encontrar movilidad lo cual se obtuvo en todas las cepas. Para el aislamiento selectivo de bacilos Gram negativos de rápido desarrollo y escasas exigencias nutricionales se utilizó el medio EMB, corroborando de esta manera que las observaciones son correctas pues en todas las cepas el resultado fue negativo. En medio MacConkey solo se obtuvieron resultados en la cepa del consorcio 1 (CIIR). En todas las cepas se encontró actividad de la enzima Leucina arilamidasa. Se logró rescatar las cepas y poder hacerlas crecer en agar nutritivo de manera axénica para así continuar con más pruebas para su caracterización final, las cepas de los consorcios no crecidos se someterán a pruebas para crecimiento en otros medios.

BIBLIOGRAFIA

- Bedolla R. H.I. (2015). Estudio de la Cinética de Biodegradación de COV's en Mezcla o Individualmente. Tesis de Maestría. Departamento de Ing. Bioquímica TNM-Instituto tecnológico de Celaya, Gto., México.
- Boluda, R., Roca- Pérez, L., Iranzo, M., Gil, C., & Mormeneo, S. (2014). Determination of enzymatic activities using a miniaturized system as a rapid method to assess soil quality. *European journal of soil science*, 65(2), 286-294.
- Conde E. (1999). Evolución de un consorcio microbiano durante la degradación la eliminación de compuestos orgánicos volátiles (COVs) por biofiltración. Tesis de Maestría. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV-IPN. D.F., México.
- Hernández-Vega P. (2012). Biodegradación de una Mezcla Compleja de COV's (Thinner) en Sistemas Microcosmos, Tesis de Licenciatura. Departamento de Ingeniería Ambiental, Instituto Tecnológico de Celaya. Guanajuato, México.

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DEL HONGO *BEAUVERIA BASSIANA* PROVENIENTES DEL ESTADO DE GUANAJUATO.

Bañuelos Vaquera Karla Lizeth ¹ y Padilla Guerrero Israel Enrique ².

RESUMEN

Con el objetivo de la obtención de aislados de *Beauveria bassiana*, para posteriores estudios de interacciones de plantas con este hongo entomopatógeno, fue necesario tomar muestras de suelo de la rizosfera de la región y emplear medios selectivos previamente estandarizados para el crecimiento de algunos hongos entomopatógenos, especialmente *Beauveria spp.* Se seleccionaron las cepas según la morfología de *Beauveria* y se realizó la caracterización molecular de cada uno de los aislados. Se sembró un total de 57 muestras de suelo de las cuales se obtuvieron 35 aislados de *Beauveria spp.* y solo a 12 se les extrajo DNA, se amplificó el fragmento del factor de elongación 1- α , se clonó en el vector pGEM-T easy y se transformó en células de *E. coli* DH5 α y purifiqué el plásmido para su posterior secuenciación.

ABSTRACT

With the objective of obtaining *Beauveria bassiana* isolates, for future studies of interactions of plants with this entomopathogenic fungus, was necessary to take soil rhizosphere samples of the region and employ selective mediums previously standardized for some entomopathogenic fungus growth, especially *Beauveria spp.* The strains were selected according to the *Beauveria* morphology and the molecular characterization of each of the isolates. A total of 57 samples of soil was sown of which we obtain 35 isolates of *Beauveria spp.* and only 12 of its DNA was extracted, the fragment of the elongation factor 1- α was amplified, cloned into the pGEM-T easy vector and transformed into *E. coli* DH5 α cells, and purified the plasmid for further sequencing.

Palabras clave: *Beauveria bassiana*, rizosfera, hongos entomopatógenos, caracterización molecular, DNA, Factor de elongación 1- α .

INTRODUCCIÓN

Los hongos entomopatógenos son microorganismos que parasitan insectos, existen aproximadamente 700 especies de hongos entomopatógenos y alrededor de 100 géneros, estos hongos son empleados en la agricultura como control de insectos (biopesticidas) sin tomar en cuenta la interacción simbiótica que existe entre la planta y el endófito. Se postula que la patogenicidad de insectos es una adaptación que permite ciertas especies de hongos endófitos para acceder a una fuente especializada de nitrógeno (insectos), u otros nutrientes de insectos para intercambiarlos con carbohidratos de las plantas (Behie, *et al.*, 2012). Las 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). En la rizosfera, las raíces liberan una amplia gama de compuestos que están implicados en la atracción de organismos beneficiosos y la formación de asociaciones mutualistas en esta. Estos compuestos incluyen azúcares, polisacáridos, aminoácidos, ácidos aromáticos, ácidos alifáticos, ácidos grasos, esteroides, compuestos fenólicos, enzimas, proteínas, reguladores del crecimiento vegetal y metabolitos secundarios (Bradi, *et al.*, 2009).

Debido a que estas interacciones han sido poco documentadas, crece el interés de utilizar diversos microorganismos, con el objetivo de proporcionarle a la planta protección contra patógenos y, al mismo tiempo, promover el crecimiento vegetal. (Cano., 2011). Uno de los más importantes *Beauveria bassiana*, que es un hongo filamentoso de la clase Hyphomycete, división Deuteromycetes. Se caracteriza morfológicamente por conidios globosos a subglobosos (Rehner & Buckley., 2005). Tanto las esporas (conidios) como las hifas, no son pigmentadas (hialinas), por lo que su apariencia es blancuzca para el ojo humano (Barron., 2001).

Se utilizan medios muy selectivos para poder aislar este tipo de hongos, estos medios contienen antibióticos para evitar el crecimiento de bacterias, y fungicidas como el dodine, ya que se encontró que el dodine generalmente suprime el crecimiento de mucorales, permitiendo el lento crecimiento de colonias ocasionales de *Beauveria bassiana* (Beilharz, *et. al.*, 1982) pudiendo actuar como un buen agente selectivo.

El reconocimiento de aislados, está basado en métodos fenotípicos como la morfología de las esporas (conidios) e hifas, o bioquímicos, como el perfil de proteínas extracelulares, los cuales son influenciados grandemente por la interpretación y dependen de un alto grado de especialización. Una de las técnicas más ampliamente utilizadas, es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Esta técnica pretende aumentar el número de copias de fragmentos de DNA de una muestra de manera *in vitro*, según las condiciones establecidas y el propósito de su uso. Empleando una secuencia de oligonucleótidos conocidos, es posible aislar fragmentos no mayores de 6 kb (kilobases), y con ello explorar, detectar y aislar fragmentos con información genética útil. Uno de los principales marcadores moleculares utilizados para la identificación es el factor de elongación 1- α , ya que codifica para una proteína expresada de forma constitutiva de manera abundante, es utilizado para dirigir la expresión de genes exógenos en células transfectadas. Otras funciones conocidas de EF-1 α en las células eucariotas son la proteólisis dependiente de microtúbulos y la ruptura de la ubiquitina. Además, EF-1 α es regulador de la apoptosis programada (Ríos., 2011).

METODOLOGÍA

Se obtuvieron 57 muestras de la rizosfera en diferentes áreas naturales protegidas del estado de Guanajuato y se prepararon con tritón al 0.01%. Se sembraron todas las muestras en cajas Petri con medio suplementado con dodine y en otro medio con los mismos componentes, adicionando cristal violeta. Se incubaron a temperatura ambiente de 20 a 25 días.

Se seleccionaron las colonias de hongos que concordaban con la morfología (color blanco y consistencia terrosa) y conidios (redondos y aglobados) de *Beauveria* y se resembraron para obtener los aislados. Se pasaron a medio de resiembra y se incubó a 26 °C con foto periodo 16 horas luz/ 8 horas oscuridad hasta observar conidiación de los aislados.

Se realizaron diluciones de cada aislado hasta obtener 500 conidios por mL y se sembraron en medio M-100 2N. Se observó al microscopio cada muestra para observar morfologías y se resembraron aquellas cuya morfología de micelio y conidios concordaba a *Beauveria*. En cajas Petri con medio PDA, se colocó en el centro de la caja, 100 μ L de solución de tritón al .01% con conidios para observar morfología colonial.

Una vez seleccionadas las colonias, se prosiguió con la extracción de DNA por el método de fenol-cloroformo, se amplificó el fragmento del factor de elongación 1- α de aproximadamente 800 pb por medio de PCR utilizando los oligos específicos para *Beauveria*. Dicho fragmento fue purificado y clonado al plásmido pGEM-T easy. Posteriormente se transformó en células de *E. coli* DH5 α mediante transformación por choque térmico, se seleccionaron aquellas células con el fragmento ligado al vector y se purificó el vector, usando el kit GenElute™HP Plasmid Miniprep de la marca Sigma siguiendo las recomendaciones del fabricante, para su posterior secuenciación. La extracción, amplificación y digestión enzimática se comprobaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

AT	Atarjea.
LCP	Cuenca de la Esperanza.
MA	Muestra de suelo agrícola.
RPV	Rincón de Parangueo.
UG	Universidad de Guanajuato.
XR	Xichu.

Tabla 1. Etiqueta de las muestras según la zona donde fueron tomadas. Se les asignó un número que corresponde al número de muestra.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento.

De un total de 57 muestras de suelo de la rizosfera, se obtuvieron 35 colonias de *Beauveria spp*, las cuales se resembraron obteniendo diferentes cepas (figura 1). Se observaron al microscopio conidios y micelio de cada cepa (figura 2), la morfología concordó con cada una de ellas a excepción de RPV10 2- colonia



Figura 1. Obtención de los aislados de *Beauveria spp*; Las flechas rojas indican la presencia de la colonia del hongo *Beauveria*.



Figura 2. Micelio y conidios redondos, característicos de *Beauveria bassiana*.

Morfología colonial.

Para identificar entre los diferentes aislados de *Beauveria spp* se realizó una caracterización morfológica de las colonias en medio PDA. Se observó un tñido de color rosado en alguna de las cepas, lo cual se consideró normal.



Figura 3. Morfología colonial.

Extracción de DNA y amplificación.

Se realizó la extracción de 12 de las cepas para continuar con la realización de PCR, comprobando con electroforesis. Hubo presencia de DNA genómico de todas las cepas, al igual de el EF-1 α .



Figura 4. DNA genómico; se muestra que la extracción se llevó a cabo de la manera correcta.

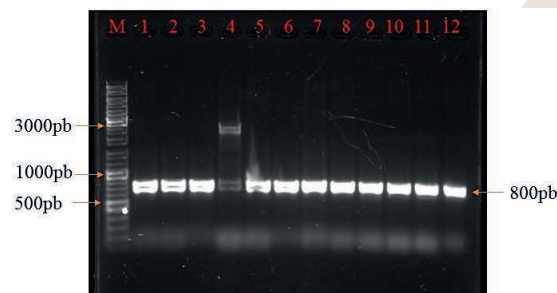


Figura 5. Amplificación de aproximadamente 800 pares de bases de EF-1 α por PCR.

De las figuras 2 y 3; 1) AT5, 2) LCP12, 3) LCP19, 4) MA2, 5) RPV2, 6) RPV10-2 Colonia2, 7) RPV12 8) RPV19 Colonia1, 9) RPV19 Colonia2, 10) UG1-2, 11) UG4-2, 12)XR2-3, M) Marcador.

Transformación y purificación.

La cepa UG1-2 no se logró transformar, por lo que solo se purificó el plásmido y se realizó el corte enzimático de 11 cepas, lo cual se comprobó por electroforesis. No se logró realizar el corte enzimático de la cepa LCP12, por lo que se repitió por triplicado.

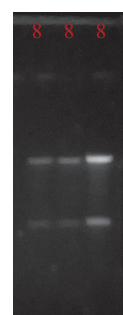


Figura 6. Corte enzimático; 1)AT5, 2)MA2, 3)RPV2, 4)RPV10-2 Colonia2, 5)RPV12, 6)RPV19 Colonia1, 7)RPV19 Colonia2, 8)LCP12, 9)LCP19, 10)UG4-2, 11)XR2-3, M)Marcador.

CONCLUSIONES

Se obtuvieron 35 cepas de *Beauveria spp* de 57 muestras de la rizosfera, se seleccionaron 13 debido al poco tiempo que se tuvo para la realización del experimento. Una de ellas (RPV10-2 colonia1) se aisló pensando que se trataba de *Beauveria* pero al no cumplir con las características morfológicas, no se continuó con su procedimiento. Al realizar la transformación, UG1-2 no logró transformarse, por lo cual se repitió la transformación pero nuevamente no se realizó, por este motivo se decidió no seguir con su procedimiento. Por lo que del total de las cepas solamente se obtuvo el plásmido purificado de 11 cepas de *Beauveria spp*.

Estos plásmidos obtenidos se guardaron en el laboratorio del departamento de Biología ya que posteriormente serán secuenciados para así poder conocer aquellas cepas de *Beauveria* que pertenezcan a la especie *bassiana*. Con la obtención de cepas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*, podrá estudiarse la interacción que existe entre este y las plantas para su posterior uso en la agricultura, futuro proyecto del laboratorio.

BIBLIOGRAFÍA

- Cano, M. (2011). "Interacción de microorganismos benéficos en plantas: Micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp", en U.D.C.A Actualidad y Divulgación Científica, Núm.14 , Vol. 2, [pp. 15-20].
- Bradi, D., Weir, T., Lelie, D. & Vivanco, M. (2009). "Rizosphere chemical dialogues: plant-microbe interactions" en Current opinión in Bioechnology, Núm.9, Vol.14, Octubre- Noviembre, [pp. 642-643].
- S. W. Behie, P. M. Zelisko, M. J. Bidochka. (2012). "Endophytic Insect-Parasitic Fungi Translocate Nitrogen Directly from insects to plants". En Science del American Association for the Advancement of Science, Núm. 537 Vol. 336, Mayo-Junio, [p. 84].
- Rehner, S., Buckley, E. (2005). "A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-! sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs". En The Mycological Society of America, Lawrence. Núm.97 Vol.1, [pp. 1-2].
- Beilharz, V., Parbery, D. & Swart, H. (1982)." DODINE: a selective agent for certain soil fungi". En la Escuela de Agricultura y Silvicultura, Universidad de Melbourne, Australia. Núm 79 Vol.3, [p. 507].
- Ríos, S., Ríos, L. (2011). "Principales marcadores moleculares utilizados para la identificación de *Babesia* bovis y *Babesia bigemina*" en MVZ Córdoba, Núm.16 Vol. 2, Mayo-Agosto [p. 2476].

AGRADECIMIENTOS

Al comité organizador del 19° Verano Regional de la Ciencia Región Centro por la oportunidad y la beca otorgada. A la Universidad Autónoma de Coahuila por aceptar mi participación en el 19° VCRC. Al Dr. Israel Enrique Padilla Guerrero por la atención y por permitirme trabajar en el laboratorio. Al M. C. Iván Horacio Piña Torres por la ayuda, paciencia, tiempo y atención recibida a lo largo del proyecto.

ANÁLISIS DE LA MORFOLOGÍA DE PARTÍCULAS DE CUARZO POR MICROSCOPIA ÓPTICA

Kassandra Arantxa Vega Treviño¹ y Nancy Verónica Pérez Aguilar²

RESUMEN

La arena sílice está constituida principalmente por cuarzo; en México existen importantes yacimientos, algunos son depósitos sedimentarios por lo que los granos de arena se caracterizan por poseer una morfología angular y subangular. Es de interés identificar de manera cuantitativa el grado de redondez o de angularidad de los granos de arena de un sitio específico, ello permitiría su clasificación para conocer su potencial aplicación industrial. En esta investigación se evalúa la morfología de granos de arena, de dos muestras procedentes de yacimientos al noreste de México y una procedente de Veracruz. Para ello se utilizó un microscopio óptico portátil, que facilita la observación en campo, así como el software imageJ v.1.51j8 para el análisis de las imágenes. Los resultados mostraron que en las muestras predominan granos de forma cilíndrica, por lo que sería necesario utilizar algún proceso abrasivo para modificar la forma de los granos hacia una morfología redondeada.

ABSTRACT

Silica sand consists mainly of quartz; in Mexico, there are some locations where sedimentary silica sand can be exploited. The morphology of those grains of sand is mostly angular and subangular shape. It is important to quantitatively identify the degree of the roundness or angularity of the grains of a particular site; this would allow their classification to know their potential industrial application. This research evaluates the degree of roundness and sphericity of quartz particles, from two samples taken from Northeastern sand mines in Mexico and other one from Veracruz. For this, a portable optical microscope was used, to observation grain samples at 20X, as well as the imageJ 1.51j8 software for image analysis. The results showed that grains of cylindrical shape prevailed in those samples, so it would be necessary to use some attrition process to modify their morphology of the silica sand grains toward a rounded shape.

Palabras Clave: Arena sílice, Microscopía óptica, Redondez de los granos.

INTRODUCCIÓN

La arena sílice es una materia prima compuesta por mineral de cuarzo y constituye el mineral más abundante de la Tierra. Químicamente, la arena sílice está constituida por un átomo de sílice y dos de oxígeno (SiO_2); esta estructura es insoluble en agua. El cuarzo pertenece a la clase de los silicatos con estructura cristalina trigonal. Este mineral es muy rico en estructuras cristalinas, algunas pueden ser microcristalinas y criptocristalinas, formadas por cristales microscópicos. La arena sílice tiene varias aplicaciones en la industria, en su forma más fina, se utiliza como relleno en pinturas, caucho con buena durabilidad, yeso, plásticos, jabones, en la elaboración de lozas de pisos etc. Cuando se usa como un material de moldeo, el tamaño de la partícula y el área superficial tienen características de gran importancia. Además, es extensamente usado en la fabricación del vidrio, la cerámica e incluso en la nano-industria. La arena de cuarzo tiene muy poca porosidad, en algunas aplicaciones se puede utilizar la molienda para obtener un material suficientemente fino para su procesamiento. Algunas características de esta arena son su alto punto de fusión, superior a 1700°C , elevada dureza, transparencia y resistencia química. Otras características físicas que son de interés para algunas industrias son la forma y grado de redondez de los granos de arena. Para este fin, existen varios métodos analíticos, uno de los más utilizados es la observación directa de los granos con un microscopio; puede utilizarse un microscopio óptico o un microscopio electrónico de barrido, en función del nivel de detalles que desean observarse en la morfología de una muestra particular. Un microscopio es un sistema óptico complejo que permite observar la imagen ampliada de un objeto, además, puede adoptar varias configuraciones que permiten la observación de diferentes tipos de muestras. En el caso de los granos de arena, su forma puede describirse considerando la relación entre las dimensiones de dos ejes imaginarios que pueden trazarse en una imagen adecuada. El objetivo de esta investigación es identificar y clasificar la morfología de los granos de arena de tres muestras de diferentes yacimientos, utilizando un microscopio óptico para su observación y obtención de imágenes.

MARCO TEORICO

Existen dos aspectos fundamentales para describir la forma geométrica de los granos de arena de una muestra, estos son la esfericidad y la redondez. La morfología de los granos puede describirse por medio de la razón entre las dimensiones de un eje mayor "a", que se traza entre los extremos más alejados del grano y un eje intermedio "b", que se traza en forma perpendicular al eje a (Figura 1). La relación entre los ejes b/a proporciona un criterio para clasificar la forma de los granos de una muestra, de acuerdo a la metodología propuesta por Zingg (1935): Ovalados: $b/a > 2/3$ y Cilíndricos: $b/a < 2/3$. Adicionalmente se considera una dimensión adicional, para identificar si los granos tienden a ser mas o menos planos, en este caso, se identifican granos con forma Discoidal cuando $b/a = 0.05$ a 1 , o Acicular cuando $b/a = 0$ a 0.05 .

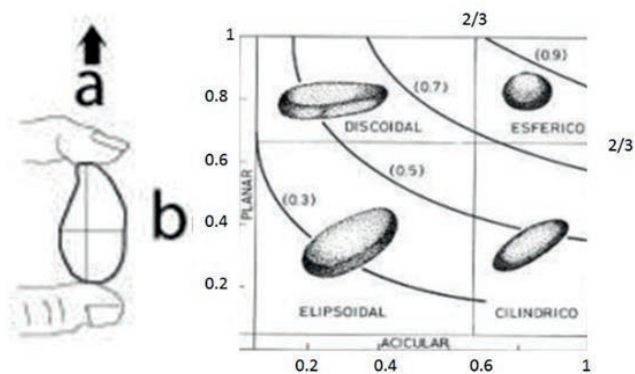


Figura 1. Clases de forma de los granos según Zingg (1935)

La redondez de los granos de arena indica el grado de abrasión a que han sido sometidos, refleja la historia de transporte a través del tiempo. Cuantitativamente, la redondez se expresa por la ecuación de Wadell (1933);

$$d = \frac{\sum(r_i/R)}{N} \quad (1)$$

donde **d** es la redondez, **r_i** es el radio de curvatura de la esquina **i**, **R** es el radio del círculo máximo inscripto y **N** es el número de esquinas consideradas. Este procedimiento, sin embargo, está sujeto a ambigüedades, pues no se tiene en cuenta las superficies con radio de curvatura superior a **R**, lo que determina que dos partículas como las de la Figura 2, muestren igual redondez, aunque visiblemente no la tienen.

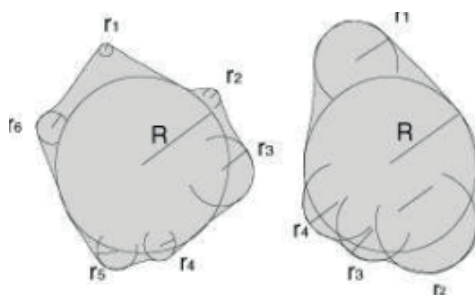
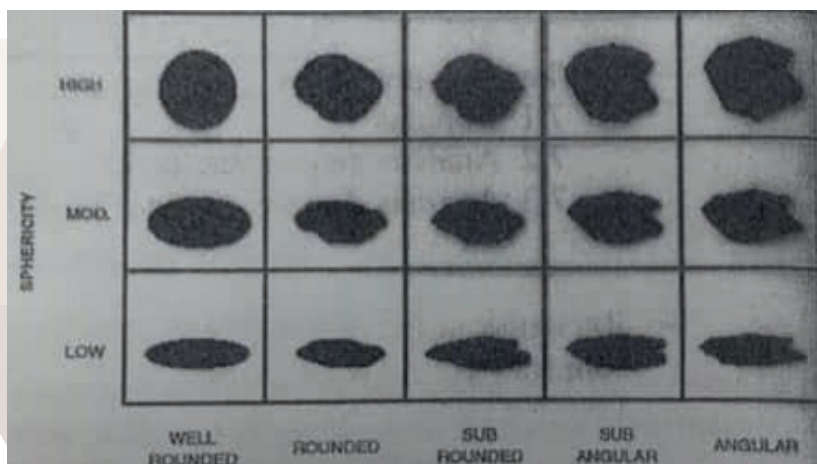


Figura 2. Naturaleza geométrica de los granos de arena

La esfericidad es el grado de acercamiento de la forma de la partícula a una esfera, el grado de esfericidad es función de la naturaleza y estructura de la roca original. En general, esta propiedad depende de la relación entre el área superficial y el volumen de la partícula. La redondez también se puede definir como una propiedad que depende de la agudeza relativa de las aristas y vértices de la partícula. Numéricamente es la razón entre el radio de curvatura promedio de las aristas y vértices reales de la partícula, y el radio del círculo inscrito máximo. En la práctica, es prácticamente imposible efectuar estas mediciones, por lo que es más común usar términos descriptivos de los granos de una muestra de arena, en términos de su redondez y esfericidad (Figura 3).

- Angular: Leve evidencia de desgaste en la superficie de las partículas
- Subangular: Su evidencia algo de desgaste en las caras y aristas. Las caras se hacen insensibles
- Subredondeado: Hay regular desgaste, el área de las caras se reduce notablemente
- Redondeada: Hay un desgaste, casi no se aprecian las caras originales.
- Muy redondeado: No hay caras originales



Se analizaron tres muestras de arena sílice previamente lavada, identificadas como M1, M2 y M3; estas muestras se recolectaron de yacimientos en Veracruz y Nuevo León, respectivamente. Las muestras se observaron con un microscopio digital (Dino- Lite Basic Digital Microscope model AM2111) que funciona con 4 luces blancas LED, que ofrece magnificaciones desde 10x hasta 230x con resolución de 640 x 480 píxeles. De cada muestra se registraron imágenes a 200X para observar con nitidez al menos 40 granos de arena sílice de cada muestra. Las imágenes se registraron con el software Dino Capture 2.0 v. 1.5.15. Posteriormente, se utilizó el software imageJ 1.51j8 y con una hoja milimétrica se calibró la escala para medir las dimensiones de los radios a y b, en cada una de las partículas de curazo. Se estableció como el diámetro “a” el radio de mayor longitud y el diámetro “b” al de menor longitud. Finalmente, los datos de cada partícula se registraron en excel para calcular la relación de la longitud de los diámetros b/a y finalmente clasificar la forma de las partículas. Los resultados se reportaron en porcentaje de granos ovalados o cilíndricos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las muestras de arena M1, M2 y M3 se observaron con un microscopio óptico portátil para medir dos dimensiones, el diámetro a y el diámetro b, con los que se calculó su relación b/a y clasificarlos de acuerdo a su forma (Figuras 4 a 6). Se tomaron 40 partículas de cada muestra; si la relación b/a es mayor de 2/3, se consideró que la forma del grano es ovalada, de lo contrario se consideró que el grano es de forma cilíndrica. La muestra M1 mostró un 20% de granos cilíndricos, la muestra M2 un 28% y la M3 un 30% (Tabla 1). Todas las partículas registraron características subredondeadas y subangulares con una esfericidad moderada. Los diferentes tipos de muestras a simple vista se veían de manera distinta y su textura difería unas con las otras, sin embargo, al utilizar el microscopio digital, las partículas mostraron varias similitudes entre sí.

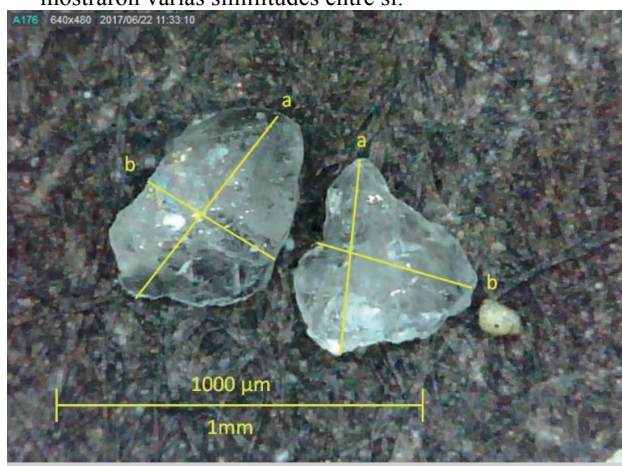


Figura 4. Muestra de arena M1

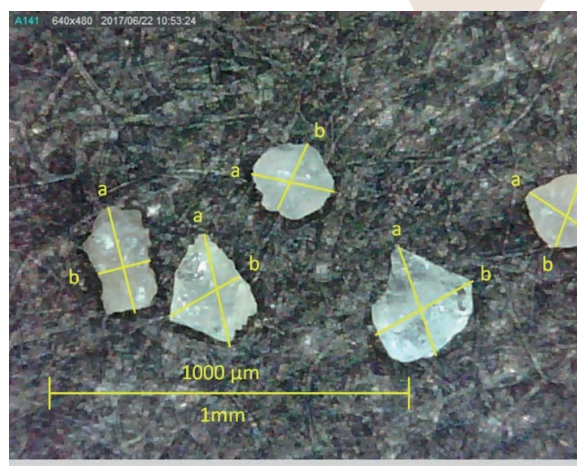


Figura 5. Muestra de arena M2

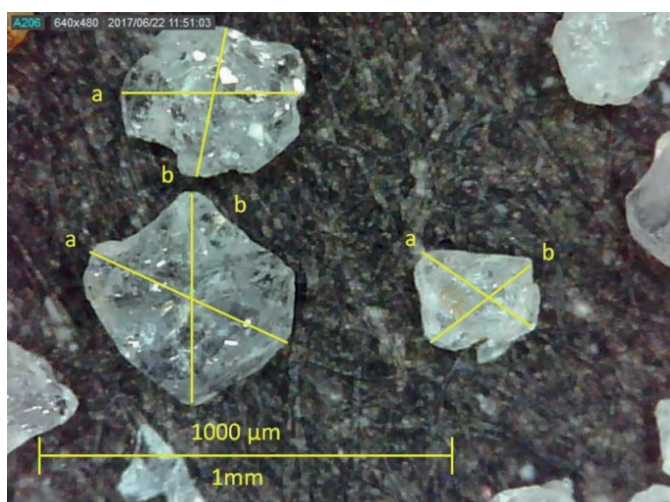


Figura 6. Muestra de arena M3

Tabla. 1. Clasificación de la forma de grano de muestras de arena sílice

Forma	M1	M2	M3
ovalados	80%	73%	70%
cilíndricos	20%	28%	30%

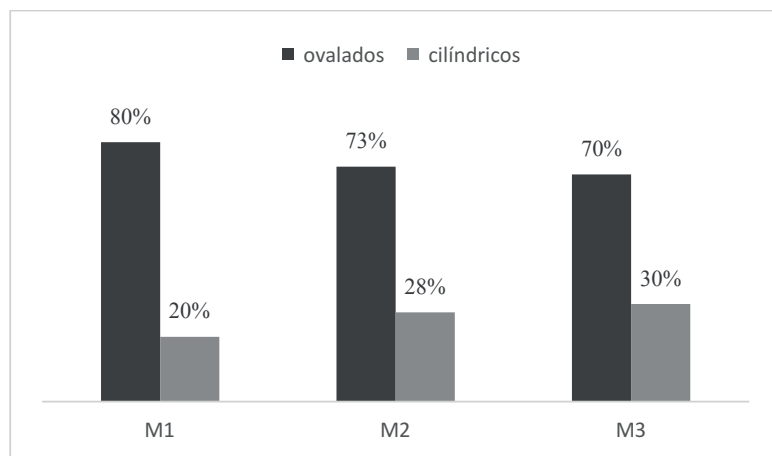


Figura 7. Gráfica de la clasificación de las arenas

En la Figura 7 se presenta la forma de granos que predominó en cada muestra de arena observada, la muestra M1 de Veracruz, presentó mayor porcentaje de granos con forma ovalada (80%), en relación a las muestras de Nuevo León, M2 y M3, que presentaron aproximadamente 70% de estos granos.

En un estudio reportado por Méndez Báez (2000), se investigó el efecto del tamaño del grano de arena sílica en la formación de inclusiones gaseosas en la producción de vidrio calizo, utilizaron diferentes tipos de granos, las muestras reportadas eran de Oklahoma, Lampazos y San José. La arena de Lampazos mostro una similitud con las muestras de Nuevo León, las arenas registraron una esfericidad moderada con una redondez subangular, lo que indica que las arenas reportadas por el estudio de Méndez y este estudio son similares en relación a su morfología.

CONCLUSIONES

El método de análisis de la forma de grano de muestras de arena puede ser fácil, rápido y económico si se dispone de un microscopio adecuado, en este caso, un microscopio portátil proporciona imágenes con suficiente amplitud y nitidez para identificar y trazar dos diámetros, que al relacionarse entre si, pueden proporcionar un criterio para clasificar la forma de los granos. En cuanto a las muestras observadas, M1, de Veracruz, contiene mayor porcentaje de granos ovalados en comparación con las muestras M2 y M3 de Nuevo León. Estas muestras de arena podrían utilizarse para la fabricación de corazones de fundición, siempre y cuando se utilice un proceso para modificar los granos hacia formas redondeadas.

BIBLIOGRAFÍA

Zingg, T. (1935). Beitrage zur Schotteranalyse. Schweiz. Mineral. Petrogr. Mitt: 39-140

Curry, J.R. y Griffiths, J.C. (1955). Sphericity and roundness of quartz grains in sediments. Bulletin of the Geological Society of America:1075–1096.

Wadell, H. (1935). Volume, shape and roundness of quartz particles, Journal of Geology : 250–280.

Leamson R.N., Thomas Jr. Ehrlinger III H.P.(1969) “A study of the Surface Areas of Particulate Microcrystalline Silica Sand” pp.2-3
<https://www.ideals.illinois.edu/bitstream/handle/2142/44623/studyofsurfacear444leam.pdf?sequence=2> (fecha de consulta 22-06-2017)

Méndez, J. (2000). “Estudio del efecto del tamaño de grano de la arena sílica en la formación de inclusiones gaseosas en la producción de vidrio calizo” pp. 33-42. Consultada en <http://eprints.uanl.mx/7445/1/1020129169.PDF> (fecha de consulta 18-07-2017).

Comprobación de la Capacidad Adsorbente de Residuos de Café mediante Isotermas de Adsorción y Punto de Carga Cero

Kassandra T. Ávila-Alvarez¹ & Nancy V. Pérez-Aguilar².

RESUMEN

El presente trabajo fue realizado con el fin de comprobar la capacidad de adsorción de residuos de café y cuáles son las condiciones idóneas para trabajar con este adsorbente. La importancia de este es encontrar una solución sustentable al problema de contaminación que se actualmente a nivel mundial, el desarrollo experimental de trabajo se realizó utilizando deshechos de café, provenientes de una cafetería local, se utilizó café lavado alcalinamente, para remover los compuestos lignocelulíticos, y sin lavar, se realizó determinación de PZC para proceder a la adsorción de fenol por isotermas de adsorción. Los resultados obtenidos nos ayudan a concluir que es importante que el café sea lavado previamente para ser utilizado, ya que el fenol logra degradar los compuestos lignocelulíticos obstruyendo la lectura en el espectrofotómetro UV-visible.

ABSTRACT

This paper was carried out in order to verify the adsorption capacity of coffee residues and which the ideal conditions to work with this adsorbent are. The importance of this is to find a sustainable solution to the pollution problem that is currently a world-wide level, the experimental development of work is done using coffee wastes, from a local coffee shop, it is used alkaline washing coffee to eliminate lignocellulosic compounds, and without washing, perform the determination of PZC to proceed to the adsorption of phenol by adsorption isotherms. The results obtained help us to conclude that it is important that the coffee be washed previously to be used, since the phenol manages to degrade the lignocellulosic compounds obstructing the reading in the UV-visible spectrophotometer.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad nuestro país y el mundo entero enfrentan un problema severo por la contaminación de las fuentes naturales de agua debido a los desechos de las industrias textil, alimentaria, agrícola y farmacéutica que en los últimos años ha incrementado considerablemente debido a la demanda de la población, estos desechos muestran diferencias en su composición química, peso molecular y grado de toxicidad y al combinarse causan daños, muchas veces irreparables, al medio ambiente, afectando también al ser humano (García, 2007).

Existe gran cantidad de residuos orgánicos generados en procesos industriales contaminan el agua, uno de los más dañinos es el fenol, compuesto producido como resultado de muchos procesos químicos industriales (Galicia et al, 2016), su estructura tiene como base un anillo de benceno y un grupo OH (Figura 1), volatiliza más lento que el agua (Tabla 1) y cuando cambia su estructura cambia su toxicidad afectando más a la materia viva. Al entrar en contacto con el organismo, ya sea humano o animal, causa diversos efectos a la salud. En humanos causa deficiencias cardíacas, renales, estomacales y cutáneas y el medio de exposición puede ser cutáneo y oral. En animales y microorganismos es más tóxico ya que, aun en bajas concentraciones, logra penetrar las membranas celulares propiciando la muerte de estas y por lo tanto del organismo (García, 2007).

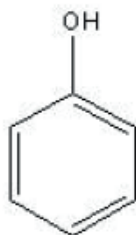


Figura 1. Estructura del fenol

Propiedad	
Punto de fusión (°C)	41
Punto de ebullición (°C)	182
Densidad (gr/cm ³)	1.049
Solubilidad 25°C (%)	8.7
Presión de vapor 25°C (Pa)	47

Tabla 1. Propiedades del fenol.
 K_{ow} = coeficiente octanol/agua, K_{oc} = coeficiente de partición

1. Universidad Autónoma de Coahuila Campus Torreón, Facultad de Ciencias Biológicas, Carretera Torreón-Matamoros Km. 7.5. Ciudad Universitaria. C.P. 27276. Torreón, Coahuila. kassandraavila5@gmail.com.
2. Universidad Autónoma de Coahuila Campus Saltillo, Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Ingeniería Ambiental, Blvd. V. Carranza s/n Col. República Oriente C.P. 25280. Saltillo, Coahuila. nancyperez@uadec.edu.mx.

Existen diversos métodos para la extracción de componentes de aguas residuales como por ejemplo oxidación, osmosis inversa, extracción, electrocoagulación, degradación fotocatalítica y adsorción. Adsorción es el método más usado debido a que es altamente efectivo, simple y puede utilizar diversos adsorbentes (Zhu et al, 2014). En este estudio se plantea usar un residuo de café como biosorbente, ya que la producción anual en México es de 9.7×10^7 dejando el casi el 80% de residuos, estos son altamente húmedos y ácidos.

Se han realizado diversos estudios para comprobar la capacidad adsorbente del café, Tokimoto demostró que la temperatura no afecta esta capacidad y que las proteínas contenidas en estos residuos son las responsables de que ocurra la adsorción. Kaikake et al. concluyó que el mejor modelo para trabajar las isotermas usadas en el proceso de extracción era el de Langmuir, pero que este necesita la comprobación con el modelo de Freundlich (Gómez-González et al, 2016).

Aunque aún no se ha reportado trabajo de adsorción de fenol usando residuos de café, se debe tomar en cuenta la misma preparación de nuestro adsorbente que consiste en un lavado alcalino usando hidróxido de sodio para eliminar el color café y el residuo orgánico, este se realiza hasta que obtener un sólido estable que garantice que no abra residuos en el extracto final (Roh et al, 2011).

Para medir la cantidad de compuesto adsorbido se utilizan isotermas con temperatura y pH constante, estas son medidos mediante espectrofotometría UV visible, para la medición se realiza previamente una isoterma a

temperatura y pH constante. Los valores usados para la medición del compuesto son 760 nm para el fenol con pH 6.5 (Cheng et al, 2016).

El presente trabajo propone la preparación de un biosorbente para la remoción de fenol en solución acuosa, a partir de residuos de café lavado con solución alcalina y sin lavar, para medir su capacidad de sorción de fenol.

MARCO TEÓRICO

La capacidad de sorción de un contaminante determinado sobre un material se determina con experimentos de equilibrio denominados isotermas de adsorción y consisten en la representación gráfica que describe el equilibrio de adsorción de un material a una superficie a una temperatura constante. Los datos experimentales se analizan frecuentemente con modelos matemáticos, para conocer los parámetros que describen el fenómeno. Los modelos más utilizados son dos: la Isoterma de Langmuir una isoterma de Tipo I, corresponde a una adsorción en monocapa, la cantidad adsorbida aumenta según la presión, es un proceso característico de un proceso de quimiosorción. La superficie del adsorbente determina las posiciones disponibles para la adsorción y todas son equivalentes y las moléculas adsorbidas no tienen interacción entre sí. La Isoterma de Freundlich que describe un proceso de adsorción por multicapas que aumenta según el aumento de presión y no deja de aumentar hasta que se llega a la máxima presión, aunque es de origen empírico, se demuestra según la cantidad de calor adsorbido que varía exponencialmente con el recubrimiento de la superficie (Hyung-keun et al, 2015).

Por otra parte, para medir la concentración de fenol en la solución en el equilibrio, se utiliza la espectrofotometría UV-visible, una técnica espectroscópica de emisión de fotones que utiliza radiación electromagnética (luz) de las regiones visible, ultravioleta cercana (UV) e infrarroja cercana (NIR) del espectro electromagnético, es decir, una longitud de onda entre 380nm y 780nm. La radiación absorbida por las moléculas desde esta región del espectro provoca transiciones electrónicas que pueden ser cuantificadas. Se utiliza para identificar algunos grupos funcionales de moléculas, y además, para determinar el contenido y fuerza de una sustancia. Se utiliza de manera general en la determinación cuantitativa de los componentes de soluciones de iones de metales de transición y compuestos orgánicos altamente conjugados (Zhenjun et al, 2016).

MÉTODOS Y MATERIALES

Lavado del café

Se realizaron 2 lavados con agua destilada a los residuos de café, estos se colocaron en charolas de aluminio para proceder a un secado en estufa a 50 °C durante 48 horas. El café totalmente seco se pesó en balanza analítica obteniendo una masa inicial seca de 400 g. La masa inicial se dividió en 2 partes y a 200 g se le realizaron lavados alcalinos para retirar la materia lignocelulosa que contiene el café, se realizaron 5 lavados con una solución de NaOH 1 N, el primero usando una relación masa-volumen (m/V) 1:10, se colocaron en una incubadora orbital a 40 °C, 150 rpm durante 3 horas, se dejó reposar para proceder a un decantado y un lavado con agua desionizada, para los demás lavados se utilizó una relación m/V de 1:5, se colocó en horno a 40 °C por 3 horas agitando cada 30 minutos. Al término de los lavados alcalinos se realizó un lavado con agua desionizada hasta que el pH del sobrenadante se acercara a 7. El pH final del sobrenadante fue de 7.9.

Punto de carga cero (PCZ) café sin lavar

Se realizaron 3 pruebas, referencia y 2 ensayos con café, con 12 tubos cada uno, las soluciones valoradas usados fueron NaOH y HCl 0.01 N, las relaciones m/V fueron de 10 mL por g de café en el ensayo 1 y 10 mL por mg de café para el segundo ensayo. De los tubos 1 al 6 de ambos ensayos contenían HCl en cantidades de 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25 mL completando con agua desionizada a 40 mL, los tubos del 7 al 12 contenían NaOH en cantidades de 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 mL completando con agua desionizada a 40 mL y un blanco con solo 40 mL de agua desionizada. Se midió el pH de cada tubo después de agregar el café. El PCZ es determinado con los resultados obtenidos del ensayo 2.

Punto de carga cero (PCZ) café lavado

Se colocaron 4 g de café lavado en 40 mL de agua destilada, se colocó en una incubadora a 25°C durante 24 horas, transcurrido el tiempo se midió el pH. Este se compara con los resultados del ensayo 1 con café sin lavar.

Adsorción de fenol

Se prepararon 500 mL de solución madre de fenol a 100 ppm y agua desionizada con un pH 7.

Isotermas de adsorción café sin lavar:

Se prepararon 7 puntos para la isoterma con 0.04 g de café y un volumen total de 40 mL, cada tubo tenía una concentración de fenol distinta de 5, 10, 20, 40, 60, 80 y 100 ppm. Durante 7 días se controló el pH a 7 hasta que este estuvo en equilibrio, luego se procedió a medir la absorbancia en un espectrofotómetro UV visible a 220 nm.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Los resultados obtenidos del ensayo 1 se muestran el pH en equilibrio de la interacción de café con las soluciones estandarizadas (Figura 2). Después de esto se calculó la concentración de iones liberados para la determinación de punto de carga cero (Figura 3) dando como resultado pH de equilibrio 6, siendo este el punto óptimo de trabajo para que el café adsorba el fenol. El ensayo 2 se utilizó para compararlo con el resultado obtenido de la obtención del PCZ en café lavado, el pH del café lavado fue igual a 5.14.

Los resultados obtenidos de la isoterma de adsorción después de medirlos a 220 nm en el espectrofotómetro fueron negativos en todas las concentraciones, lo que nos hizo creer que se había adsorbido el fenol por completo, pero al

realizar la segunda y tercera medición notamos que había interferencia debido a los compuestos orgánicos liberados del café impidiendo la medición correcta de la cantidad de fenol presente en cada muestra.

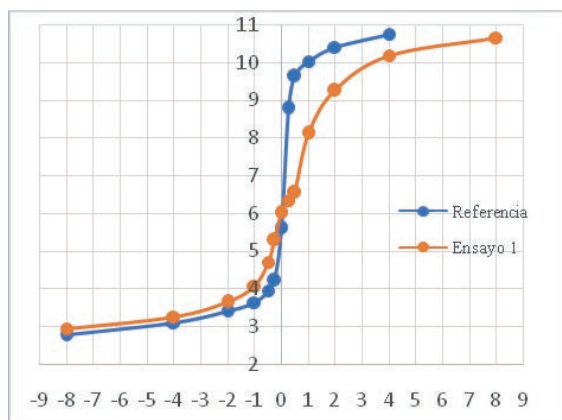


Figura 2. pH en equilibrio del café sin lavar, comparación del ensayo de café y el ensayo con relación 10 mL por mg de café.

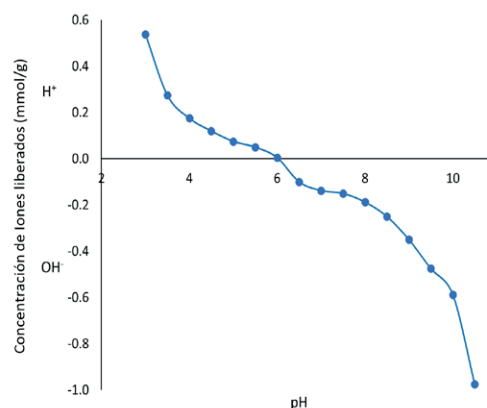


Figura 3. Iones liberados, el punto de carga cero corresponde al punto de donde la concentración es igual a cero.

CONCLUSION

Para lograr una adsorción de fenol nuestro sorbente debe estar limpio de cualquier compuesto orgánico ya que según las condiciones de pH, punto de carga cero y concentración, el fenol degrada estos compuestos impidiendo una correcta lectura en el espectrofotómetro.

BIBLIOGRAFIA

- García, M. J. (2007) Biodegradación de Fenol en un Reactor Discontinuo de Alimentación Secuenciada. Universidad Autonoma del Estado de Hidalgo. Instituto de ciencias básicas e ingenierías. [pp 3-10].
- Galicia, J., Santamarina, J., Badillo, M., Sánchez-Cantú, M. & Verela, J. (2016). Synthesis and Caracterization of AN/EGDEMA-base Adsorbent for Phenol Adsorption. *Reactive & Functional Polymer*. p 3.
- Zhe, W., Yao, W. & Zhan Y. (2014). Phenol Removal from Aqueous solution by Adsorption onto Solidified Landfilled Sewage Sludge and its Modified Sludges. *Japón. CrossMark*. [pp. 2-4]
- Gomez-Gonzalez, R., Cerino-Córdova, F., García-León, A., Soto-Regalado, E., Davila-Guzman, N. & Salazar-Rabago, J. (2016). Lead Biosorption onto coffee grounds: Comparative Analysis of Several Optimization Techniques using Equilibrium Adsorption Models and ANN. *Nuevo León, Mexico. CrossMark*. [pp. 1-3].
- Rho, J., Umh, H., Yoo, C., Rengaraj, S., Byunghwan, L. & Younghun, K. (2011) Waste Caffee-Grounds as Potencial Biosorbents for Removal of Acid Dye 44 from Aqueous Solution. *Seul, Corea. Korean J. Chemistry Engineer*. [pp 3-4].
- Cheng, W., Gao, W., Cui, X., Ma, J. & Li, R. (2016). Phenol Adsorption Equilibrium and Kinetics on Zeolitic X/activated Carbon Composite. *China*. [p. 4].
- Hyung-Keun, C., Woom-Hoe, K., Jeongwon, P., Jinwoo, C., Tae-Young, J. & Youn-Kyu, P. (2015). Aplicacion of Langmuir and Freundlich Isotherms to Predict Adsorbate Removal Efficiency or Required Amount of Adsorbent. *Elsevier. Corea*. [pp 242-245].
- Zhenjun, W., Hongfei, W., Ting, Z. & Chuang, X. (2016). Investigation on Absorption Performance between Cement and Emulsified asphalt whitUV-visible Spectrophotometer. *Elsevier. China*. [p. 257].

ADSORCIÓN MULTICOMPONENTE DE METALES PESADOS EN CONDICIONES DINÁMICAS EMPLEANDO COLUMNAS DE LECHO FIJO DE CARBÓN DE HUESO

Luis Alberto Guzmán Astrain¹ y Adrián Bonilla Petriciolet²

RESUMEN

En el presente trabajo se estudió la remoción multicomponente de iones de Cd^{2+} , Ni^{2+} y Zn^{2+} en solución acuosa empleando columnas de lecho fijo empacadas con carbón de hueso. Los datos experimentales fueron empleados para obtener parámetros de diseño como capacidades de adsorción, tiempo de ruptura y puntos de agotamiento. Dicha información fue correlacionada con los modelos de Thomas y de Yang. De acuerdo con los resultados las capacidades de adsorción del carbón de hueso para Cd^{2+} , Ni^{2+} y Zn^{2+} a las condiciones evaluadas son de 41.2, 2.6 y 21.4 mg/g, respectivamente. El modelo de Yang correlaciona los datos experimentales adecuadamente.

ABSTRACT

In this study, the simultaneous removal of the Cd^{2+} , Ni^{2+} and Zn^{2+} from aqueous solution using fixed bed columns packed with bone charcoal has been evaluated. The experimental data were used to obtain some design parameters such as adsorption capacities, breakthrough time and exhaustion points. Experimental results were correlated with Thomas and Yang models. The adsorption capacities of bone charcoal at the evaluated conditions for Cd^{2+} , Ni^{2+} and Zn^{2+} are 41.2, 2.6 and 21.4 mg/g, respectively. The Yang model correlated the experimental data adequately.

Palabras clave: adsorción, carbón de hueso, metales pesados, tratamiento de agua

INTRODUCCION

La remoción simultánea de metales pesados a partir de soluciones que contengan dos o más especies iónicas desempeña un papel importante en el diseño y operación de procesos de tratamiento, ya que la presencia de varios iones en un medio pueden generar efectos de competencia, inhibición o interacción entre los contaminantes, los cuales afectan positiva o negativamente el comportamiento del adsorbente (Escudero y col., 2013). Por tanto, es necesario evaluar el efecto de la concentración de un metal sobre la adsorción de otros cationes para identificar la presencia de tales procesos y establecer la viabilidad de aplicar determinado adsorbente en el tratamiento de aguas residuales. Debido a lo anterior, en este trabajo se estudió la remoción multicomponente de Cd^{2+} , Ni^{2+} y Zn^{2+} en columnas de lecho fijo con carbón de hueso, con el objetivo de identificar los efectos de competencia existentes bajo condiciones de operación dinámicas. Específicamente, se evaluó el efecto de la presencia de los iones de Cd^{2+} , Ni^{2+} y Zn^{2+} en sistemas conformados por dichos cationes.

MÉTODOS Y MATERIALES

Los experimentos de adsorción se realizaron empleando columnas de plástico de 12 cm de largo y 1.2 cm de diámetro interno, empacadas con 13.5 gramos de carbón de hueso con un diámetro de partícula de 0.4 mm. Se obtuvieron curvas de ruptura a 30 °C, pH 5, con flujo ascendente de 8 mL/min, empleando una solución equimolar de Cd^{2+} , Ni^{2+} y Zn^{2+} de 2.5 mmol/L. Se tomaron muestras del efluente a intervalos regulares de tiempo. Las concentraciones de los metales se determinaron mediante absorción atómica. Los resultados obtenidos fueron empleados para calcular la capacidad de adsorción para cada metal utilizando el método del trapecio, mediante las siguientes fórmulas.

$$h = Q(t_2 - t_1) \quad (1)$$

$$q = \frac{(\sum_{i=1}^{n-1} \frac{h}{2} (1 - \frac{C_{t2}}{C_i}) + (1 - \frac{C_{t1}}{C_i})) (C_i)}{m} \quad (2)$$

donde h representa el tamaño de paso en L, t_2 y t_1 representan el tiempo en el que fueron tomadas las muestras en h, Q es el flujo de alimentación expresado en L/h, C_i es la concentración inicial del metal i en la solución en mg/L, m es la masa de adsorbente en g, q representa la capacidad de adsorción en mg/g, C_{t2} es la concentración a la salida de la columna en el tiempo t_2 y C_{t1} es la concentración a la salida de la columna en el tiempo t_1 ambas dadas en mg/L. Adicionalmente, se calcularon los tiempos de ruptura (TR) a concentraciones del 5 y 10 por ciento con respecto a la concentración inicial. Para el modelamiento de los datos se utilizaron las ecuaciones de Thomas (Eq. 3) y de Yang (Eq. 4), cuyas ecuaciones se definen a continuación

$$\frac{C_i}{C_f} = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{k_t}{Q}(q_t m - C_i V_{ef})\right)} \quad (3)$$

$$\frac{C_i}{C_f} = 1 - \frac{1}{1 + \left(\frac{Q^2 t}{k_y q_y m}\right)^{\frac{k_y C_i}{Q}}} \quad (4)$$

donde V_{ef} es el volumen de la solución a la salida de la columna en L, t es el tiempo en h, q_t y q_y representan la capacidad de adsorción estimada por el modelo de Thomas y el modelo de Yang en mg/g, k_t y k_y son las constantes de Thomas y de Yang en L/h-mg, respectivamente. Los parámetros q_t , q_y , k_t y k_y se obtuvieron mediante regresión no lineal de las curvas de ruptura usando un modelo de optimización global (Rojas-Mayorga y col., 2015).

RESULTADOS

En la Figura 1 se muestran las curvas de ruptura de Cd^{2+} , Ni^{2+} y Zn^{2+} . Como se puede observar, todas las curvas de ruptura presentan una forma “S”. La velocidad de saturación y el tiempo de ruptura dependen del adsorbato, ver Figura 1 y Tabla 1. En forma particular, los resultados obtenidos indican que el tiempo de ruptura se alcanza al poco tiempo de operación de la columna (0.75 horas), no obstante, para llegar al punto de agotamiento se requieren alrededor de 1.2 horas. La capacidad de adsorción del carbón de hueso sobre los metales evaluados incrementa en el siguiente orden: $\text{Ni}^{2+} < \text{Zn}^{2+} < \text{Cd}^{2+}$, ver Tabla 1. En la Figura 1 también se observa que bajo ciertas condiciones la concentración de salida del níquel es superior a la concentración de entrada del mismo ($C_i/C_o > 1$). Dicho comportamiento se debe a los efectos de competencia y se basa en la naturaleza de adsorción de estos cationes en el carbón de hueso. Específicamente, cuando la columna esta próxima a alcanzar su punto de saturación, los iones metálicos con menor afinidad (Ni^{2+}) son parcialmente desplazados del adsorbente por el o los adsorbatos con mayor afinidad. Resultados similares han sido reportados por Escudero y col. (2013). Con respecto a los resultados de la modelación, las curvas de ruptura se ajustan mejor con el modelo de Yang que con el modelo de Thomas. Esto debido a que el modelo de Thomas puede tener problemas al momento de correlacionar los datos de las curvas de ruptura porque este asume un proceso de adsorción-desorción sin dispersión axial, en tanto que, el modelo de Yang es una ecuación empírica que puede superar algunos de las problemáticas presentadas por el modelo de Thomas (Escudero y col., 2013)

Tabla 1. Capacidades de adsorción y parámetros de las curvas de ruptura para la adsorción multicomponente de Cd^{2+} , Ni^{2+} y Zn^{2+} empleando una columna de lecho fijo empacada con carbón de hueso.

Metal	q (mg/g)	q_t (mg/g)	q_y (mg/g)	TR 5% (min)	TR 10% (min)	k_t (L/h-mg)	k_y (L/h-mg)
Cd^{2+}	41.2	38.5	17.17	74.7	89	0.002	0.004
Ni^{2+}	2.6	2.4	0.6	4.5	9	0.050	0.010
Zn^{2+}	21.4	19.6	10	62.8	76.6	0.004	0.006

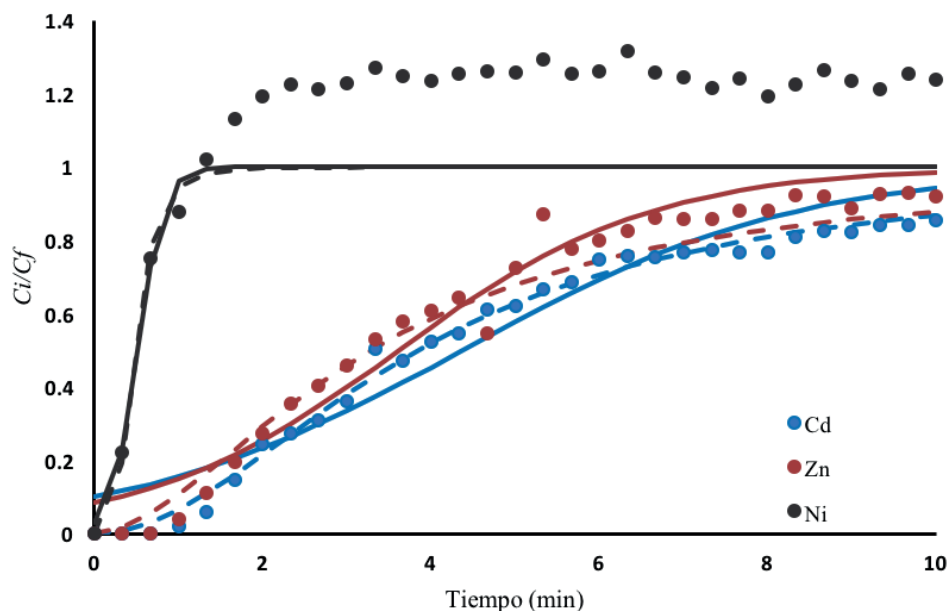


Figura 1. Curvas de ruptura y resultados del ajuste de los modelos de Thomas (línea continua) y de Yang (línea punteada) para la adsorción de Cd^{2+} , Ni^{2+} y Zn^{2+} empleando una columna de lecho fijo empacada con carbón de hueso. Condiciones de operación: pH 5, 30 °C y flujo ascendente de 8 mL/min.

CONCLUSIONES

Con el experimento realizado se puede observar que el carbón de hueso presenta mayor afinidad por el ion Cd^{2+} . Por otra parte, el ion que se remueve en menor cantidad es el Ni^{2+} . De forma global, se demuestra que el carbón de hueso es una alternativa para ser utilizado como adsorbente en el tratamiento de aguas contaminadas con metales pesados, debido a que se observa afinidad frente los tres metales en la solución utilizada. Es importante continuar con el estudio de este tipo de sistemas empleando otros contaminantes y condiciones de operación como temperatura, flujo, pH o geometría de las columnas.

BIBLIOGRAFÍA

Escudero, C., Poch, J., y Villaescusa, I. (2013) Modelling of breakthrough curves of single and binary mixtures of Cu(II), Cd(II), Ni(II) and Pb(II) sorption onto grape stalks waste. *Chemical Engineering Journal*, 217: 129-138.

Rojas-Mayorga, C.K., Bonilla-Petriciolet, A., Sánchez-Ruiz, F.J., Moreno-Pérez, J., Reyel-Ávila, H.E., Aguayo-Villarreal I.A. y Mendoza-Castillo D.I. (2015) Breakthrough curve modeling of liquid-phase adsorption of fluoride ions on aluminum-doped bone char using micro-columns: Effectiveness of data fitting approaches. *Journal of Molecular Liquids*, 208: 114-121.

RESISTENCIA DE AISLADOS MICROBIANOS RESISTENTES A CO Y ZN.

Miriam Anguiano Morales¹ y Cesar Díaz Perez²

RESUMEN

Durante las últimas décadas en el estado de Zacatecas se han reportado altos niveles de metales pesados (MPs), un caso de esto es la contaminación que se han encontrado en la presa del Bote. En estudios anteriores a este se lograron obtener 86 aislados bacterianos en este sitio. El objetivo del presente trabajo fue conocer la concentración máxima inhibitoria de 18 aislados microbianos seleccionados de los 86 que se tenían, a la presencia de MPs. Los metales usados en este estudio fueron cobalto, cromo, cadmio, cobre, mercurio y zinc a diversas concentraciones. De los resultados obtenidos se encontró que los aislados S401-1A y S401-B tuvieron una multiresistencia en todos los metales. Se realizó una segunda confrontación a dos MPs, Co y Zn, se midió la absorbancia de cada una de las concentraciones con las que se trabajó. Los datos obtenidos indicaron que en presencia de Co a 0.05 mM, tiene un efecto benéfico para el aislado S401-B, ya que tiene un incremento en su crecimiento a comparación del control sin metal, a comparación del aislado S114-1A que tuvo un decremento. Sin embargo en el caso del Zn, no se obtuvieron resultados concretos ya que en medio líquido la morfología de ambos aislados no permitían una homogeneidad del medio, por lo tanto, los resultados no se pudieron interpretar.

ABSTRACT

During the last decades in the state of Zacatecas have been reported high levels of heavy metals (MPs), a case of this is the pollution that have been found in the dam of the Bote's. In previous studies, 86 bacterial isolates were obtained at this site. The objective of the present work was to know the maximum inhibitory concentration of 18 microbial isolates selected from the 86 that had, to the presence of MPs. The metals used in this study were cobalt, chromium, cadmium, copper, mercury and zinc at various concentrations. From the results obtained it was found that the isolates S401-1A and S401-B had a multiresistance in all the metals. A second comparison was made to two MPs, Co and Zn, and the absorbance of each of the concentrations was measured. The data indicated that in the presence of Co at 0.05 mM, has a beneficial effect for the isolate S401-B, since it has an increase in its growth compared to the control without metal, compared to the isolate S114-1A that had a decrease. However, in the case of Zn, no concrete results were obtained since in liquid medium the morphology of both isolates did not allow a homogeneity of the medium, therefore, the results could not be interpreted.

Palabras Clave: Metales; Contaminación; Bacterias; Remediation

INTRODUCCIÓN

Son considerados como metales pesados aquellos metales que tienen una densidad mayor a 5 gr/cm³ (De lima *et al.*, 2012). Estos se encuentran de manera natural, sin embargo se consideran contaminantes cuando se acumulan. Fuentes antropogénicas, minería, estaciones de energía, la aplicación de pesticidas que contienen metales, fertilizantes así como lodos de depuradoras, tienden a ser de los principales responsables de la contaminación ambiental por metales pesados (Samanta *et al.*, 2012).

A lo largo de la historia, los microorganismos han desarrollado mecanismos los cuales les permitieron tener tolerancia a metales pesados, esto sea por la presencia de los mismos, causando una complejacion, reducción de los iones o bien como aceptores finales de electrones durante la respiración anaerobia (Samanta *et al.*, 2012).

Bacterias resistentes y que además crecen en presencia de metales, representan un rol importante en el ciclo biogeoquímico de esos iones metálicos (Samanta *et al.*, 2012). Diversos estudios se han realizado sobre la tolerancia de plantas y bacterias a metales pesados. Entre las bacterias que se han estudiado se encuentran *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas mendocina*, *Chromobacterium violaceum*, *Burkholderia cepacia*. Dichas bacterias han reportado hasta una resistencia y acumulación de 90 ppm de Cr, As y Pb (Mendoza *et al.*, 2010). A diferencia de estas, *Bacillus sp.* Ha reportado una resistencia mayor ya que tolera hasta 1.0 mg/ml (Samanta *et al.*, 2012).

En el estado de Zacatecas a lo largo de los años se han presentado diversas alteraciones en los ecosistemas, esto se debe a la actividad minera, algunos de los factores de selección para los microorganismos presentes pueden ser resistentes a metales pesados (MPs) de los sitios en los que se encuentran. En estos sitios los MPs que se han reportado son principalmente Ag, Pb, Zn, Cu, Cd. (Panorama Minero del Estado de Zacatecas, 2016). Siendo así, en el presente trabajo se estudian 18 aislados obtenidos de la presa del Bote, en el cual se buscó demostrar la resistencia a metales de interés como lo son Zn y Cd.

MÉTODOS Y MATERIALES

- Selección de 18 aislados con mayor resistencia a MPs.
- Tinción Gram
- Realización de Mics a diferentes concentraciones de metales Co, Cr, Cu, Hg, Zn y Cd.
- Curvas de susceptibilidad en los aislados S401-B y S114-1A.

RESULTADOS

Selección de aislados

De los 86 aislados obtenidos de trabajos previos del Departamento de Ciencias básicas de la Universidad Autónoma de Zacatecas, se seleccionaron 18 aislados bacteriano las cuales mostraron mayor resistencia. Para conocer la concentración inhibitoria de MPs dichos aislados se inocularon en medio solido (agar nutritivo) y se agregó Co, Cd, Cu, Cr, Hg y Zn a distintas concentraciones. Los resultados obtenidos mostraron un crecimiento de la mayoría de los aislados (Figura 1).

Para verificar que se contaba con cultivos axénicos, se hizo la tinción Gram de todos los aislados. Además, también se caracterizó la morfología microscópica de cada aislado (Figura 2). Morfológicamente observaron principalmente bacilos y cocos.

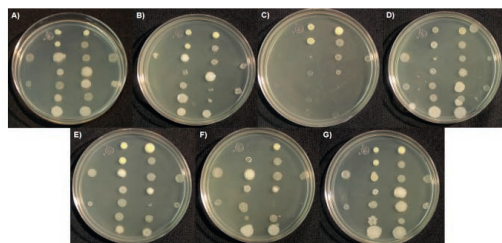


Figura 1. Crecimiento de aislados bacterianos en MPs.

A) Control; B) Cd 0.1mM; C) Co 0.2mM; D) Cr 0.1mM; E) Cu 1.0mM; F) Hg 0.1mM; G) Zn 0.2mM.

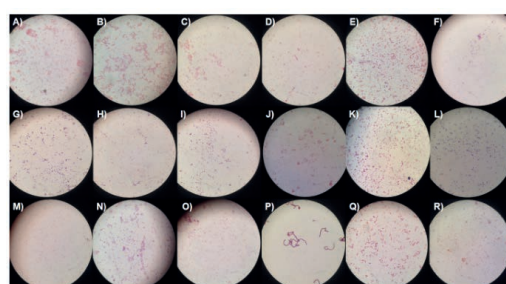


Figura 2. Morfología microscópica de los aislados. A) S103; B) S106; C) S106-2; D) S106-2A; E) S109-2; F) S110-2; G) S114-1A; H) S114-2; I) S115; J) 203-2A; K) S204-2; L) 302; M) S401-2A; N) S401-A; O) S401-B; P) S404-2; Q) S407-0; R) SL101.

Caracterización de las capas S401-B, S114-1A

Se observó que los aislados, S401-B, S114-1A son multiresistentes, por lo que se decidió trabajar con estos.

Para conocer las concentraciones mínimas inhibitorias (MICs) de los aislados que fueron seleccionados, se confrontaron a concentraciones crecientes de MPs, los resultados se muestran en la (Tabla 1). Dado nuestro interés para trabajar con cobalto y zinc, se decidió trabajar con el aislado S401-B, S114-1A, que es el aislado que mejor resiste a este MP.

Tabla 1. Aislados bacterianos en las concentraciones mayores las que fueron expuestos.

Nombre	Cd (mM)	Co (mM)	Cr (mM)	Cu (mM)	Hg (mM)	Zn (mM)
S110-2	1.0	0.4	0.30	2.0	N.d.	0.4
S203-2A	1.0	0.6	0.30	3.0	0.5	0.4
S302	1.0	0.4	0.30	2.0	0.5	0.4
S401-A	0.5	0.4	0.15	2.5	0.5	0.4
S401-B	0.5	0.8	0.30	2.5	0.5	0.4
S204-2	0.5	N.d.	0.15	2.0	0.5	0.4
S401-2A	0.5	0.4	0.15	2.0	0.5	0.4
SL101	0.5	0.4	0.15	2.0	0.5	0.6
S407-0	0.5	0.4	0.30	1.5	0.5	0.4
S115	0.5	0.4	0.20	2.0	0.5	0.4
S114-1A	0.5	0.8	0.30	1.5	0.5	0.4
S103	0.5	0.4	0.15	1.5	0.5	0.4
S404-2	0.5	N.d.	0.30	1.5	N.d.	0.6
S114-2	0.5	N.p	0.30	1.5	N.d.	0.4
S109-2	0.5	0.4	0.30	1.5	0.5	0.4
S106	0.5	0.4	0.30	1.5	0.5	0.4
S106-2	0.5	0.4	0.20	1.5	0.5	0.4
S106-2A	0.5	0.4	0.20	1.5	0.5	0.4

*N.d. No se determino

Se midió la absorbancia de los aislados que se confrontaron a Co y Zn en distintas concentraciones presentes en la (Figura 3, Figura 4, Figura 5, Figura 6).

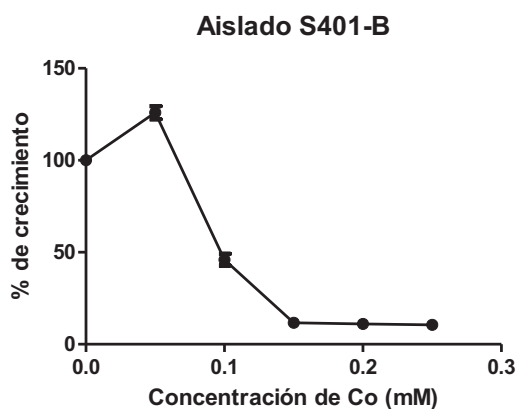


Figura 3. Se muestra el porcentaje de crecimiento del aislado S401-B a distintas concentraciones de Co.

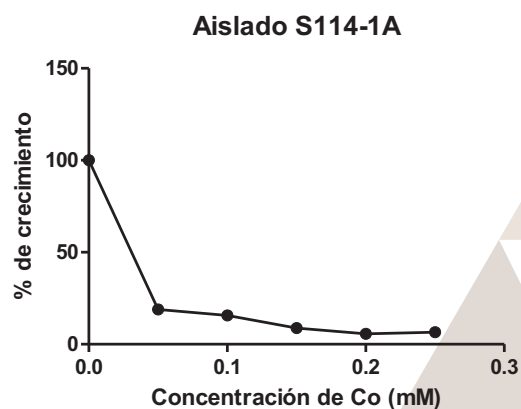


Figura 4. Se muestra el porcentaje de crecimiento del aislado S114-1A a distintas concentraciones de Co.

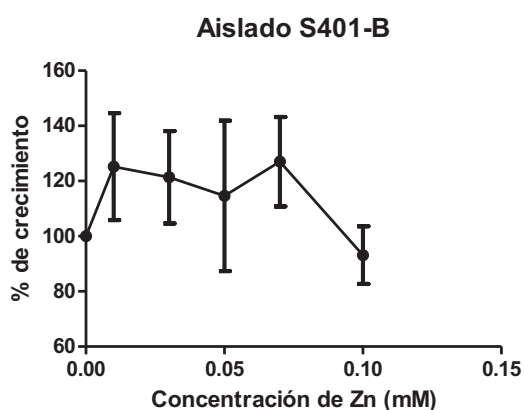


Figura 5. Se muestra la absorbancia que presentó el aislado S401-B a distintas concentraciones de Zn.

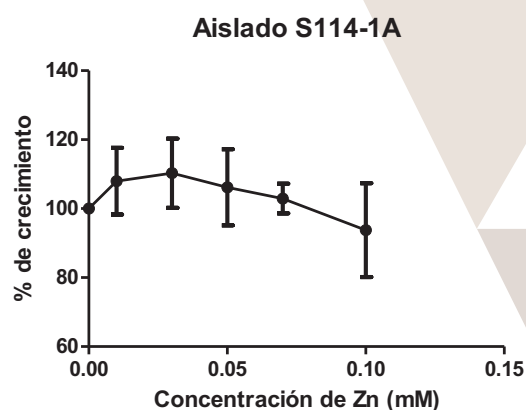


Figura 6. Se muestra la absorbancia que presentó el aislado S114-1A a distintas concentraciones de Zn.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos, los aislados S401-B y S114-1A, fueron los aislados con mayor resistencia a los MPs. Posteriormente se realizaron más estudios sobre la tolerancia de estos aislados bacterianos a Co y Zn. Se encontró un incremento en presencia del Co en el aislado S401-B a una concentración de 0.05 mM, en mayores concentraciones hubo un decremento, esto se podría explicar ya que en dicha concentración es benéfico para las bacterias, utilizado como un micronutriente. En el caso del aislado S114-1A tuvo un decremento en presencia del metal. Sin embargo para el caso del Zn, los resultados obtenidos no fueron claros, ya que en medio líquido y en presencia de este metal, se formaron biopelículas las cuales no permitían una homogeneidad, dando resultados no concretos.

BIBLIOGRAFIA

- De Lima A., Ribeiro M., De Souza S., Teixeira P., Da Silva R., Meirelles C., Melo C., & Hofer H. (2012). Heavy metal tolerance (Cr, Ag and Hg) in bacteria isolates from sewage. *Brazilian Journal of Microbiology*: 1620-1631.
- Mendoza J. C., Perea Y. S., Pretelin C., Silveti A., Martinez M. A., Pérez G., Espinosa B. & Arriola J. (2010). *Revista Latinoamericana el Ambiente y las Ciencias*, 1(2): 67-73.
- Samanta A., Bera P., Khatun M., Sinha Ch., Pal P., Lalee A. & Mandal A. (2012). An investigation on heavy metal tolerance and antibiotic resistance properties of bacterial strain *Bacillus* sp. isolated from municipal waste. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*. 2 (1):178-189
- Servicio Geológico Mexicano, Panorama Minero del Estado de Zacatecas, 2016.

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE AISLADOS BACTERIANOS DE GUANAJUATO

Patricia Jaqueline Nava Hernández¹ y Juan Gualberto Colli Mull²

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue conocer cómo influyen los microorganismos en el suelo y que tan grande es su diversidad en la Sierra de Lobos. Se caracterizaron 35 aislados bacterianos obtenidos de la vegetación de matorral de los cuales sólo 27 se caracterizaron bioquímicamente en su capacidad de promover el crecimiento vegetal, mientras que en las pruebas moleculares, 23 amplificaron exitosamente en el gen 16 s ribosomal y posteriormente se realizó un análisis de restricción tipo (ARDRA) con el fin de agrupar los aislados según su diferencia filogenética. Basado en los resultados obtenidos se obtuvo un dendograma, el cual nos indica que a pesar de que algunos de los aislados bacterianos pertenecen a las mismas familias en las pruebas bioquímicas actuaron de diferente manera.

ABSTRACT

The objective of this work was to know how the microorganisms influence in the soil and how big its diversity in the Sierra de Lobos. We characterized 35 bacterial isolates obtained from scrub vegetation, of which only 27 were characterized biochemically in their ability to promote plant growth, while in the molecular tests, 23 successfully amplified in the ribosomal 16 s gene and subsequently performed an analysis Of restriction type (ARDRA) in order to group the isolates according to their phylogenetic difference. Based on the results obtained a dendogram was obtained, which indicates that although some of the bacterial isolates belong to the same families in the biochemical tests they acted differently.

Palabras clave: caracterización bioquímica y molecular, PCR, ARDRA y dendograma.

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos son los seres más numerosos que existen en la tierra; son organismos ancestrales que han colonizado exitosamente cada nicho ecológico posible. Los microorganismos se encuentran prácticamente en todas las regiones del planeta, desde los polos, en ambientes bajo el punto de congelación y muy secos, hasta los trópicos con temperaturas altas y con elevada precipitación pluvial. Existen microorganismos que degradan la materia orgánica haciéndola nuevamente disponible para las plantas, actividad sin la cual el mundo sería un enorme basurero; otros han jugado un papel significativo en relación con el hombre y su productividad, participando en la agricultura y en la elaboración de alimentos y medicinas (Tate, 1995). 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 lo que llamamos vida, y que de manera directa o indirecta gobiernan todos los procesos en la tierra (Atlas, 1984). Las bacterias y algas verde- azules, son organismos fijadores del nitrógeno atmosférico, lo cual los hace útiles al planear una adecuada rotación de cultivos. Tanto bacterias como hongos intervienen en la elaboración de quesos y derivados lácteos (Brock, 1978). Las bacterias asociadas con la rizósfera de las plantas son capaces de generar varios mecanismos por los cuales afectan positivamente su crecimiento y desarrollo, se conocen mecanismos directos e indirectos para la promoción del crecimiento vegetal.

1

Los mecanismos directos se relacionan con la producción de fitohormonas de tipo auxinas y giberelinas o la regulación de la producción 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 de nitrógeno y la solubilización de nutrientes tan importantes como el fósforo (Ahmad et al., 2006).

El material genético de las bacterias esta ordenado en una sola molécula de DNA llamada cromosoma. Además, las bacterias también pueden tener otras moléculas de DNA independientes, llamadas plásmidos, relativamente más pequeñas. Estas últimas constituyen una fracción variable y no esencial del genoma de la célula bacteriana. En los organismos eucariotas el DNA se encuentra en estructuras mucho más complejas que comprenden varios cromosomas propiamente dichos, puesto que el nombre del cromosoma se aplica en las bacterias solamente en sentido análogo (Parés y Juárez, 2002).

METODOLOGÍA

Primero se realizó la reactivación de los aislados haciéndolos crecer en medio de cultivo LB. 100µL de la cepa e inocularlo en 5mL de caldo LB, se dejó crecer por 48 horas a 37°C.

SOLUBILIZACIÓN DE FOSFATOS

En muchos hábitats, los fosfatos se combinan con el calcio, volviéndose inaccesibles para las plantas y para muchos microorganismos. La solubilización del fosfato se lleva a cabo por las bacterias heterótrofas, normalmente excretando ácidos orgánicos, aunque algunos organismos quimiolitotrofos, movilizan el P, gracias a la producción de ácido nítrico y ácido sulfúrico. En el caso de suelos con fosfatos insolubles de hierro, magnesio o aluminio, la solubilización suele estar ligada a la reducción del metal (Castillo *et al.*, 2005).

Se preparó medio Pikovskaya para la solubilización de fosfatos. Se añadió 10µL del cultivo bacteriano. Se dejó incubar a 32°C por 48 horas. Después de esas horas se observaron resultados y todas aquellas que hubiesen creado un halo alrededor de la bacteria se tomarían como positivas.

PRUEBA DE AUXINAS

Se denomina típicamente auxinas a aquellos compuestos que estimulan la elongación celular, pero las auxinas también influyen en un amplio rango de respuestas en el crecimiento y desarrollo. La respuesta de las plantas a las auxinas depende de la concentración, pero a altas concentraciones se vuelve inhibitorio (Mashiguchia *et al.*, 2011).

En una placa Micro titer se añadieron 100µL de medio para auxinas que contiene glucosa, extracto de levadura, L-Trp (triptófano). Se inoculó con 10µL de la muestra, se dejó incubar por 72 horas aproximadamente a temperatura ambiente. El revelado de síntesis de auxinas se llevó a cabo añadiendo 10µL de solución Salkowsky Reagen que contiene: ácido perclórico y FeCl₃, según el color de rosa, naranja y rojo se tomaría como baja, media y alta producción de auxinas.

EXTRACCIÓN DE ADN

La extracción del DNA se llevó a cabo por el método de lisis alcalina. Se agregó medio LB líquido inoculado con los aislados a tubos eppendorf de 1.5 ml y se obtuvo un pellet bacteriano tras centrifugaciones de 11000 rpm. Para la lisis se agregaron 300µl de TRIS-EDTA y en un tubo que contuvo perlititas se hizo lisis mecánica, se le agregó 10 µl de SDS 10% incubando 5 min en ambiente y se centrifugó. Para desnaturalizar se agregó 200µl de acetato de potasio 5M, se centrifugó, se agregó un volumen de fenol: cloroformo a lo obtenido, se agitó y se centrifugó. Para purificar se agregaron 2 volúmenes de ETOH absoluto, se centrifugó, se lavó agregando 800µl de ETOH 70% y se centrifugó nuevamente. A continuación se decantó. Para finalizar, se dejó secar la muestra y se resuspendió en 50µl de H₂O miliQ. Al concluir la extracción se realizó una electroforesis con las muestras para el análisis del producto de la extracción en gel de agarosa al 1%.

PCR

La reacción en cadena de la polimerasa, o PCR, es una técnica que sirve para hacer infinidad de copias de una determinada región de ADN *in vitro* (en un tubo de ensayo en lugar de un organismo). Depende de una ADN polimerasa termoestable, la Taq polimerasa, y requiere de cebadores de ADN diseñados específicamente para la región de ADN de interés, la reacción se somete a un ciclo de cambios de temperatura que permiten la producción de muchas copias de la región blanco (McPherson and Moller, 2000).

Se sometieron 27 muestras a PCR con los iniciadores universales F27 (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y r1492 (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') se realizó en un termociclador MultiGene™ OptiMax de Labnet International, Inc, las reacciones fueron realizadas en tubos eppendorf 0.2mL en un volumen total de reacción de 25 µL. 1 µL de ADN genómico (molde), 12.5 µL de DreamTaq® Super Mix, 1 µL de cada indicador y 9.5 µL de agua miliQ. El programa de reacción de termociclaje consistió de un paso de desnaturalización de 95°C (3 min), seguido por 35 ciclos de 94°C (1 min), 53°C (1 min), 72°C (2 min), y un paso final de elongación de 72°C (10 min). Para verificar la calidad de la amplificación, los productos se separaron en una electroforesis en un gel de agarosa (1%) durante 30 min a 100V. Una vez hecha la electroforesis los geles se visualizaron con ayuda de un transiluminador.

ARDRA (amplified ribosomal DNA restriction analysis)

ARDRA es una herramienta adecuada para diferenciar los productos de PCR sobre la base de la digestión con enzimas. Los perfiles electroforéticos obtenidos pueden ser utilizados para identificar especies, siempre y cuando se cuente con el número y tipo adecuado de enzimas de restricción. Esta técnica se basa en la digestión del gen ribosomal 16S previamente amplificado mediante la PCR con lo cual el producto obtenido se separa mediante electroforesis en gel de agarosa para una identificación adecuada (Malik *et al.*, 2008).

La digestión de las muestras se llevaron a cabo con una mezcla de 0.3µL de la enzima Hind III, 0.3µL de la enzima RSA I, 2µL de buffer Tango, 7.4 µL de agua milli-Q y 10µL del producto de PCR. Las muestras se incubaron a 37°C por 3 horas y 30 minutos para el proceso de digestión. Los productos de la digestión fueron separados en gel de agarosa al 2% con amortiguador TAE durante 3 horas aproximadamente a 90 Voltios.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los 35 aislados bacterianos a caracterizar, se obtuvieron 27 de la reactivación para las pruebas bioquímicas.

Tabla I. Resultados de la solubilización de fosfatos

Total de aislados	Positivos	Negativos
27	66%	34%

En la solubilización de fosfatos más de la mitad resultaron positivos con un porcentaje del 66% como se muestra en la tabla I, lo que nos quiere decir que ese número de aislados bacterianos producen más ácidos orgánicos los cuales solubilizan los fosfatos insolubles en dicha planta de la zona rizosférica.

Tabla II. Resultados de la prueba de Auxinas

Total de aislados	Baja producción	Media producción	Alta producción	No hubo producción
-------------------	-----------------	------------------	-----------------	--------------------

27	62%	11%	5%	22%
----	-----	-----	----	-----

De los 27 aislados bacterianos para la prueba de auxinas el 78% de ellos se produjo exitosamente como se muestra en la tabla II, esto pudo ser debido a que ese gran número de aislados estimulan el crecimiento celular más rápido que el 22% restante.

De los 27 aislados bacterianos a caracterizar en las pruebas moleculares, se obtuvieron 23 amplificados de PCR, éstos se sometieron a un Análisis de Restricción (ARDRA) en donde se pudo agrupar los aislados según la separación de sus bandas, comparado con el marcador inicial. Los geles de agarosa de la electroforesis se observaron en un transluminador de luz UV, donde se tomó las fotos para el análisis final.

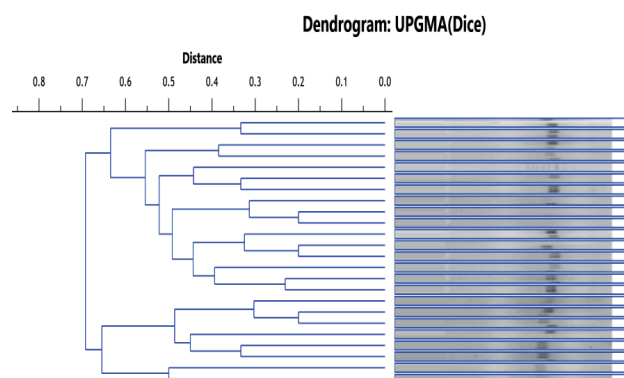


Figura 1. Análisis de restricción mostrados en un dendrograma.

Por último las fotografías capturadas se observaron en el programa llamado CLIQS , el cual detecta con precisión carriles y bandas, dando como resultado un dendrograma mostrado en la figura 1 en donde podemos observar que se dividieron en 2 grupos y cada uno se fue ramificando según las similitudes que compartieran cada uno de los aislados.

CONCLUSIÓN

En las pruebas bioquímicas como la solubilización de fosfatos y producción de auxinas las cuales se hicieron en este proyecto porque son actividades que regulan múltiples procesos fisiológicos en las plantas, se llevo a cabo con éxito ya que en ambas pruebas hubo crecimiento en más del 50% de los aislados. Las técnicas moleculares como el PCR y el ARDRA las cuales fueron utilizadas en este proyecto son de gran importancia para la caracterización molecular de los aislados bacterianos. La caracterización molecular se realizó con éxito y con un porcentaje muy alto de efectividad ya que de las 27 muestras sólo 4 fallaron al momento de la lectura y análisis. Concluyendo con el trabajo se puede decir que aunque las bacterias se agrupen de acuerdo a sus similitudes, pueden actuar de manera distinta en tanto a su producción de auxinas y solubilización de fosfatos.

BIBLIOGRAFÍA

- Tate, R.L. (1995). Soil microbiology. New York, USA.: Marshall, editorial. p. 75.
- Atlas, R.M. (1984). Diversity of microbial communities. New York, USA.: Marshall, editorial. p.140.
- Brock, T.D. (1978). Biología de los microorganismos. Barcelona, España: Editorial, Omega. p. 120.
- Ahmad F., G. & Khan MS. (2006). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. New York, USA.: Marshall, editorial. p.162.
- Parés, R., F. & Juárez, G., A. (2002). Bioquímica de los microorganismos. Barcelona: Editorial, Reverté. p.20.
- Castillo, R., Roldán, R., Blasco, P., Huertas, R., Caballero, D., Moreno, V. & Luque, R. (2005). Biotecnología ambiental. Madrid: Editorial Tébar. p.240
- Mashiguchia, K., Tanakaa, K., Sakaic, T., Sugawraa, S., Kawaideb, H., Natsumeb, M., Yaenaa, T., Shirasua, K., Yoad, H., McSeend, P., Zhao, Y., Hatashif, K., & Kasahara, H. (2011). The main auxin biosynthesis pathway in Arabidopsis. New York: Proceedings of the National Academy of Sciences. p.108
- McPherson, M. & Moller, S. (2000). PCR. New York: BIOS Scientific. P.96.
- Malik, S., Beer, M., Megharaj, M., & Naidu, R. (2008). «Review article: The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water». En: Environment International, 34, pp. 265-276.

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE AISLADOS BACTERIANOS DE GUANAJUATO

Rosa Ddariela Rosales Mejía¹ Y Juan Gualberto Colli Mull²

RESUMEN

El objetivo principal de este trabajo fue poder identificar de manera bioquímica y molecular aislados bacterianos recolectados de la reserva ecológica de Sierra de Lobos, Guanajuato, México, con el fin de hacerles algunas pruebas para conocer de qué manera influyen en el crecimiento vegetal. Es así como se reactivaron 35 aislados bacterianos, de las cuales se les hizo pruebas de producción de auxinas y de solubilización de Fosfatos en la parte bioquímica se realizó la técnica de PCR, a la vez que se utilizó un análisis de restricción (ARDRA) para así poder agrupar a los aislados para diferenciarlos conforme al patrón de restricción. Con los resultados obtenidos en la parte bioquímica se interpretaron de manera cualitativa, mientras que en la molecular se realizó un Dendograma el cual es una representación gráfica que con el que se agruparon por especie cada uno de los aislados y con él se puede dar una idea de que tan relacionadas están las bacterias entre sí.

ABSTRACT

The main objective of this work was to be able to identify in a biochemical and molecular way isolates recollected from the ecological reserve of Sierra de Lobos, Guanajuato, Mexico, from pine in order to do some tests to know how they influence plant growth. This is how reactivated 35 isolates, from which tests of auxin production and Solubilization of phosphates were done in the biochemical part, while in the molecular the PCR technique was realized, once restriction pattern. With the results obtained in the biochemical part were interpreted qualitatively, while in the molecular was made a Dendogram which is a graphic tool with which of the isolates were grouped by the species and with it can give an idea of how closely related the bacteria are to each other.

Palabras Clave: Crecimiento Vegetal, Auxinas, Fosfatos, PCR, ARDRA.

INTRODUCCIÓN

En el mundo, existen millones de microorganismos, los cuales están presentes en casi cualquiera lugar que se examine. El suelo es el ambiente donde existe mayor cantidad y variedad de microorganismos, pero todos ellos se encuentran mezclados, es decir, en poblaciones mixtas. (Casanova, 2005). En años recientes, se ha retomado el interés de utilizar bacterias promotoras de crecimiento vegetal en la producción de cultivos. Estas bacterias se han aplicado a semillas, tubérculos o raíz, y son capaces de colonizar las raíces de las plantas y estimular el crecimiento y rendimiento de cultivos. Para esto, las investigaciones se focalizan en la evaluación de la diversidad genética y bioquímica de los microorganismos rizosféricos, su caracterización en relación a la fijación biológica del Nitrógeno atmosférico, solubilización de fosfatos, aporte de nutrientes, producción de hormonas vegetales (auxinas, giberelinas, citocininas y etileno) y de sustancias capaces de captar hierro(sideróforos) (Díaz *et. al.*, 2001). Ha sido ampliamente demostrado que los microorganismos del suelo interactúan con las raíces de las plantas y constituyentes del suelo en la interfase raíz-suelo. Este gran conjunto de interacciones entre suelos, raíces y microorganismos da lugar al desarrollo de un ambiente dinámico conocido como rizósfera, donde una variedad de formas microbianas pueden desarrollarse activamente y en equilibrio. (Pedraza *et. al.* 2010). Es así que en la rizosfera se detecta la máxima actividad microbiana, que se refleja en una mayor densidad de la población microbiana heterotrófica, comparada con la que existe en el suelo libre de raíces. La microbiota bacteriana y fúngica de la rizósfera del pino, es clave en su sano desarrollo y en la posible selección de rizomicroorganismos para programas de reforestación. (Alexander, 1977)

MÉTODOS Y MATERIALES

Activación de los aislados: Se inocularon 100µL de muestras en 5 mL de medio LB y se dejó en Shaker por aproximadamente 72 hrs. Sólo se pudieron reactivar 26 muestras.

Prueba de Solubilización de Fosfatos. Muchos microorganismos del suelo tienen la capacidad de transformar el P en formas insolubles en formas asimilables para las plantas, entre ellos se destacan las bacterias Solubilizadoras de Fosfato (BSF) que constituyen una excelente alternativa para reducir la cantidad de fertilizantes aplicados a diferentes cultivos. (Patiño y Sanclemente, 2014).

En cajas Petri con medio Pikovskaya, se agregó en cada cuadro 10µL de cada muestra y finalmente se llevó a una incubadora por aprox. 72 hrs a una temperatura de 32°C.

Prueba de auxinas. Las auxinas son un grupo de compuestos reguladores del desarrollo de las plantas que, entre otros efectos, influyen en el crecimiento, la división celular y la formación de las raíces. Los usos de las auxinas en la esfera agrícola son muy diversos y se aplican de forma rutinaria en biofábricas, en los cultivos in vitro de material vegetal y en las plantaciones. (G. Castillo *et al.*, 2005)

En una placa microfiter de 96 pocillos se agregó 100µL de medio para auxinas con 10µL de cada una (cada muestra se hizo por duplicado para evitar algún error). La placa se envolvió en papel, y se dejó incubar por aprox. 72 horas a 32°C Al pasar el tiempo, para el rebelado, en una campana de flujo, se agregó a cada uno de los pocillos 10µL de la solución de HClO₄ al 35% con FeCl₃ al 3mM y se dejó reposar por 10 minutos para obtener resultados.

Proceso de extracción de DNA genómico. La extracción consiste en el aislamiento y purificación de moléculas de ADN y se basa en las características fisicoquímicas de la molécula. (Sambrook et al. 1989)

Se añadió 1.5mL del medio de LB previamente inoculado a los tubos Eppendorf y se centrifugó a 10000rpm por 5 min. Se decantó el sobrenadante y se repitió los 2 pasos anteriores. Se añadieron 300 µL de una solución de Tris HCl más EDTA (esto para crear una lisis, con una concentración de 0.1M con pH de 8 cada una) a cada tubo y se resuspendió agitando en Vortex. Luego se pasaron a tubos con perlas y se añadieron 50 µL de SDS 1%, se homogenizó por 2 minutos, y se agregó 1 µL de RNAasa, e incubo por 10 minutos. Se añadieron 200 µL de acetato de sodio (para desnaturalizar las proteínas) y se pasó a centrifugar a 10000rpm por 5 minutos, se recuperaron los sobrenadantes y se vaciaron a otros tubos a los cuales se les agregó 400 µL una solución de Fenol-Cloroformo-Isomilico (25:24:1) los cuales se homogenizaron durante 2 minutos. Se pasó a centrifugar a 11000rpm durante 5 min. De aquí se obtuvieron 3 fases: Orgánica, proteica y soluble. Se extrajo únicamente la parte orgánica y se pasaron a otros tubos y se añadieron 2 volúmenes de etanol absoluto, se centrifugó a 12000rpm por 30 minutos y se decantaron los sobrenadante rápidamente para así poder lavarlos con 1mL de etanol al 70%. Se pasaron a centrifugar a 12000 rpm por 10 min. Se decantaron y se dejaron secar en gradilla por 10 min. Para así agregarle 30 µL de agua mili-Q con el fin de resuspender el precipitado y así analizarlas por la técnica de electroforesis con una corriente de 90v por 60 min.

PCR. En PCR, el ácido desoxirribonucleico (ADN) es el analito. Por tanto, una buena muestra implica siempre un correcto proceso de obtención de esta molécula a partir del material genético. La extracción de ADN consta de una etapa en romper las estructuras que confinan el citoplasma y liberar al medio su contenido y otra de purificación, que implica la retirada de la solución final de la mayoría de elementos que pueden interferir en la PCR. (Rådström, P. *et al.*, 2004)

Para esta prueba se hizo una mezcla de 25 µL en su totalidad, de la cual estaba conformada por 12.5 µL de Super Mix a 2X, 1 µL de Oligo₁₄₉₂, 1µL de Oligo_{F27}, 9.5 µL de agua mili-Q y por último 1 µL de la muestra de DNA de la bacteria anteriormente extraída. Esta mezcla se realizó en pequeños tubos Eppendorf para así pasarlos al termociclador (Este proceso tiene una duración de aprox. 3 hrs 30 min) para después ser analizadas las muestras por la técnica de electroforesis.

ARDRA (amplified ribosomal DNA restriction analysis). Es una herramienta adecuada para diferenciar los productos de PCR sobre la base de la digestión con enzimas. Los perfiles electroforéticos obtenidos pueden ser

utilizados para identificar especies, siempre y cuando se cuente con el número y tipo adecuado de enzimas de restricción. Esta técnica se basa en la digestión del gen ribosomal 16s previamente amplificado mediante la PCR. (Becerra *et. al.*, 2012)

En este método se utilizó una mezcla de 2μL de un buffer a 10X, 0.3μL de la enzima RSA I, 0.3μL de la enzima Hind III, 7μL de agua mili-Q y por último 10μL del producto de PCR. Las muestras se pasaron a la incubadora a 37°C por 3hrs. Después de esto se pasó a un proceso de electroforesis con un gel agarosa al 2.5% en TAE 1X, mezclándolo con 2μL de buffer de carga para DNA, todo esto en una corriente de 90v por 3hrs.

RESULTADOS

En la prueba de auxinas se interpretaron resultados de manera cualitativa en lugar de cuantitativa, ya que sólo ocurre un cambio de color diferente al del blanco. Mientras que en el de Solubilización de Fosfatos se pudieron ver los microorganismos que generarán un halo en la colonia formada en la caja Petri. Mientras que en la digestión se realizó un Dendograma.

	Auxinas	Fosfatos	Muestra	Auxinas	Fosfatos
400	Prod. Media	Positiva	414	Prod. Baja	Positiva
401	Prod. Media	Positiva	415	Prod. Baja	Positiva
402	Prod. Media	Positiva	421	Prod. Baja	Positiva
403	Prod. Media	Negativa	423	Prod. Baja	Positiva
404	Prod. Media	Negativa	424	Prod. Baja	Positiva
405	Prod. Media	Negativa	427	Prod. Baja	Positiva
406	Prod. Media	Positiva	428	Prod. Baja	Positiva
407	Prod. Alta	Positiva	429	Prod. Baja	Negativa
408	Prod. Media	Positiva	457	Prod. Media	Negativa
409	Prod. Media	Positiva	458	Prod. Alta	Positiva
410	Prod. Media	Positiva	459	Prod. Media	Positiva
411	Prod. Media	Positiva	460	Prod. Baja	Positiva
412	Prod. Alta	Positiva	461	Prod. Baja	Positiva

Tabla 1. Pruebas Bioquímicas

Total aislados	de	Fosfatos Positivos	Fosfatos Negativos	Producción Alta	Producción Media	Producción Baja
26		81%	19%	12%	50%	38%

Tabla 2. Resultados en porcentajes

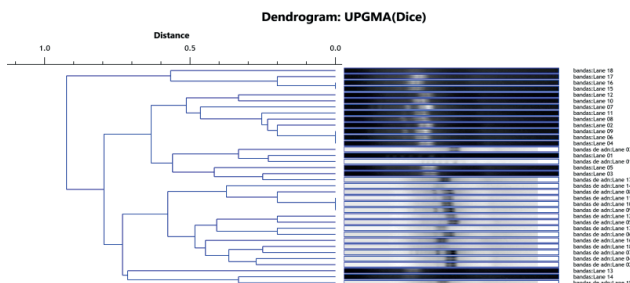


Figura 1. Análisis de restricción

Como podemos ver en la tabla 1 y 2, el 81% de las bacterias resultó positivo para la solubilización de fosfatos mientras que el 50% tienen una producción media de auxinas, estos resultados son satisfactorias para saber que estas bacterias serían promotoras del crecimiento vegetal, por otro lado en la figura 1, podemos observar que principalmente se dividió en 2 grupos y después se fue ramificando, por las similitudes que comparten. Comparando estas 2 pruebas podemos decir que aunque las bacterias se asimilen en cuanto a especie, pueden actuar de manera diferente y tener diferentes funciones a pesar de su similitud.

CONCLUSIONES

Como se observa en los resultados, la mayoría de las bacterias aisladas de pino, se pueden utilizar como bacterias promotoras del crecimiento vegetal de manera teórica, aunque se necesitaría realizar algunos consorcios para poder comprobar de manera práctica que los resultados obtenidos en el laboratorio fueron acertados. Mientras que en la parte molecular, con el análisis de PCR se podrán secuenciar cada una de las muestras, mientras que con ARDRA algunas de las ventajas que resultan del empleo de esta técnica, radican en su simplicidad, rapidez, rentabilidad y efectividad en estudios de identificación microbiana.

BIBLIOGRAFÍA

Casanova, E. (2005) Introducción a la ciencia del suelo. Venezuela.

Díaz Vargas, P., Ferrera Cerrato, R., Almaraz Suárez, J. J., Alcántar González, G., Inoculación de bacterias promotoras de crecimiento en lechuga *Terra Latinoamericana* [en línea] 2001, 19 (octubre-diciembre).

Pedraza, Raúl O., Teixeira, Kátia R.S., Fernández Scavino, Ana, García de Salamone, Inés, Baca, Beatriz E., Azcón, Rosario, Baldani, Vera L.D., Bonilla, Ruth, Microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos. *Revisión Corpoica. Ciencia y Tecnología Agropecuaria* [en línea] 2010, 11 (Julio-Diciembre).

Patiño-Torres, Carlos Omar, Sanclemente-Reyes, Oscar Eduardo, Los microorganismos solubilizadores de fósforo (MSF): una alternativa biotecnológica para una agricultura sostenible *Entramado* [en línea] 2014, 10 (Julio-Diciembre)

G. Castillo et al. Cuantificación del contenido de ácido indolacético (AIA) en un caldo de fermentación microbiana. *Anales de Biología* 27, 2005

Sambrook J., E. F. Fritsch y T. Maniatis. 1989. *Clonación Molecular: Manual de laboratorio*, New York, EE.UU.

Rådström, P. *et al.* (2004) Pre-PCR procedimientos Estrategias para generar ejemplos compartibles de PCR. *Biotecnología Molecular*. 26, 133– 46.

Illán Morales Becerril, (2008) ELECTROFORESIS, en http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Exposicion_electroforesis_5087.pdf

Laura Becerra, Viviana Puentes, Julio Martínez, Javier Hernández Fernández. ARDRA para la identificación de las bacterias coliformes *Citrobacter sedlakii* y *Citrobacter gilleni*, del humedal “Laguna de Tierra Blanca” Soacha, Cundinamarca. *REVISTA MUTIS*, Volumen 2, Número 2, pp. 76-88 (2012). UNIVERSIDAD JORGE TADEO LOZANO.

Alexander, M. 1997 *Introducción a la biotecnología del suelo*. 2°. ed. Ed. Wiley and Sons

¿CÓMO REGULA LA EXPRESIÓN DE ALGUNOS FACTORES DE VIRULENCIA EL HONGO PATÓGENO OPORTUNISTA *CANDIDA GLABRATA*?

Zulema Carlos López¹ e Irene Beatriz Castaño Navarro²

RESUMEN

El silenciamiento es una regulación negativa importante para la virulencia del hongo patógeno oportunista *Candida glabrata*. Éste mecanismo esta mediado por un complejo de proteínas Sir, Rap1, Ku70 y Ku80 en algunos casos Rif 1, sin embargo en esta investigación se determina que Abf1 tiene un papel sustancial en esta regulación. Se diseñó un plásmido de E.coli que contiene el alelo trunco de Abf1, URA3 como gen reportero, un casete de resistencia NAT y sitios de corte específicos reconocidos por enzimas de restricción, para luego transformar una cepa de *C. glabrata*, y obtener su replicación por recombinación homóloga. De esta forma se tiene un punto de comparación y así comprobar la importancia de Abf1.

ABSTRACT

The silencing is an important negative regulation for the virulence of the opportunistic pathogen fungus *Candida glabrata*. This mechanism is mediated for a protein complex Sir, Rap1, Ku70 y Ku80, and in some cases Rif 1, nevertheless in this investigation determined that Abf1 has a substantial role in this regulation. Was designed an E.coli plasmid who contains the truncated allele of Abf1, URA3 like a reported gene, a cassette of resistance NAT and specific crop site recognized by restriction enzymes, to later transform a *C. glabrata* strain and to obtain its replication by homologous recombination. Of this way has a comparison point and a manner of proof the importance of Abf1.

Palabras clave: Silenciamiento, Abf1, transformación, recombinación homóloga

INTRODUCCIÓN

Candida glabrata es un hongo patógeno oportunista, localizado comúnmente en las mucosas o en el tracto gastrointestinal de individuos sanos, toma ventaja y ataca cuando el sistema inmunológico del hospedero se encuentra comprimido o debilitado, quedando como segundo lugar en generar enfermedades hospitalarias sistémicas de candidiasis seguido de *Candida albicans* en Estados Unidos. (Castaño, Cormack, & De la Peñas, 2006) *C. glabrata* posee una familia de genes subteloméricos en su mayoría, que le brindan una de las características que le permiten ser exitoso: la capacidad de adherencia a las células epiteliales y endoteliales del hospedero. Principalmente Es mediado principalmente por uno de ellos, el gen EPA 1 (Epithelial Adhesin 1 por sus siglas en inglés) quien participa en la producción de una proteína llamada adhesina que se encuentra en la pared celular de la levadura y regula la adhesión a las células epiteliales del hospedero. Éste gen es activado en la fase logarítmica temprana y tiene la capacidad de expresarse in vitro. A excepción de EPA 1 los genes involucrados en la producción de adhesinas están silenciados tal y como EPA 2 Y EPA 3 localizados en el telómero derecho del cromosoma E. El silenciamiento subtelomérico conocido también como TPE ("Telomere position effect") es un sistema de regulación negativa de genes en el cual son reprimidos en determinada área, donde participan algunas proteínas como lo son Sir2, Sir3, Sir4, Rap1, Ku70, Ku80 y en algunos casos Rif1 dependiendo de la región subtelomérica. El mecanismo de silenciamiento del que hablaremos es el que comprende la modificación de histonas que consiste en el ensamblaje de la proteína Rap1 a los sitios de reconocimiento del telómero uniéndose al complejo Sir formado por Sir3, Sir4 y Sir2 esta última proteína desacetila el extremo N-terminal de los histonas H3 y H4, dando lugar a los sitios de afinidad para Sir3 y Sir 4 formando una estructura condensada que da lugar a la represión transcripcional.

¹ Universidad Autónoma de Coahuila, Facultad de Ciencias Biológicas, Carretera Torreón - Matamoros Km. 7.5 Torreón, Coahuila, México. C.P. 27000, Torreón, Coahuila, zulemacarlos.16@gmail.com

² Irene Beatriz Castaño Navarro, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT), Dpto. Microbiología molecular, Camino a la Presa San José #2055 Col. Lomas 4a. C.P.78216, San Luis Potosí, SLP. icastano@ipicyt.edu.mx

Esta represión puede ser extendida a lo largo del telómero por silenciadores y protosilenciadores en *C. glabrata* puede ser extendido a >20kb (De Las Peñas, y otros, 2015) (De las Peñas, Orta Zavala, Martínez Jiménez, & Castaño). Un silenciador es una secuencia localizada dentro de un locus que puede inhibir la expresión de un gen o grupo de genes, independientemente de la distancia u orientación mediante el reclutamiento de proteínas que se unen al DNA. A diferencia de los protosilenciadores que tienen como función reforzar o mantener la función de los silenciadores (Sleekman, Gorman, & Alt, 1996) Un ejemplo de protosilenciador es Sil2126 en contraste existen activadores transcripcionales un ejemplo es Abf1.

Se sabe que el silenciamiento regional subtelomérico es extendido por la formación de T-loops (bucles en la estructura del ADN)

Preparación de medios:

YPD líquido. Constituido por 20 gr/L de Peptona, 10 gr/L de extracto de levadura, se agregan 940 ml de agua destilada, luego se esteriliza. Posteriormente se le agregan 50 ml de glucosa al 2% y 10 ml de Uracilo una vez que este se encuentre a una temperatura adecuada.

YPD sólido. 20 gr/L de Peptona, 10 gr/L de extracto de levadura, 20 gr/L de agar, 940 ml de agua destilada se lleva a esterilización y se suplementa con 50 ml de glucosa al 2% y 10 ml de Uracilo.

YPD sólido + NAT. Se toman 500 ml del medio anterior y NAT.

Casaminoácidos + NAT. Compuesto por 1 gr/L de ácido glutámico, 6 gr/L de CAA, 1.7gr/L de Base nitrogenada de levadura, 5 gr/L de Sulfato de Amonio y 950 ml de agua destilada. Se procede a la esterilización del medio, una vez obtenida la temperatura adecuada después de mantenerla a temperatura ambiente se suplementa con 50 ml de glucosa al 2%. Por último se agrega NAT.

Se vaciaron cada uno de los medios de cultivo sólidos en cajas Petri.

En 8 tubos de ensaye se agregaron 5 ml de YPD líquido, 3 de ellos se inocularon con la cepa CgM3455 y 3 tubos con CgM3594 por el método de freeze (raspado), mientras que los dos restantes se usaron como control. Se incubaron por 12 horas aproximadamente a agitación constante en el roller.

Medición de D.O.: se homogenizó el tubo contenedor del medio y se tomaron 10 µl y se vació en la celdilla se agregaron 990 µl de agua Milli-Q y se homogenizó nuevamente con vortex. Este procedimiento se efectuó con cada uno de los seis tubos para luego ser medidos en el espectro fotómetro a $\lambda=600$ nm utilizando como blanco agua Milli-Q.

Dilución en serie

Se agregaron 900 µl de agua estéril en 5 tubos eppendorf. En el primer tubo se agregaron 100 µl de la solución homogenizada de los tubos de ensaye contenedores del cultivo obteniendo una concentración de 1×10^{-1} , se homogenizó y se tomaron 100 µl. posteriormente se agregaron a un segundo tubo, se repitió el proceso anterior hasta obtener una concentración de 1×10^{-5} . Se hizo este mismo procedimiento con los 5 tubos de ensaye restantes.

Sembrado en cajas Petri: Se sembraron las 3 cepas 3455 en cajas de YPD y YPD+NAT y las 3 cepas de 3594 en YPD, YPD+NAT, CAA+NAT y 5-FOA. (Tabla 1)

Se diluyeron 50 µl de los eppendorf con concentración de 1×10^{-5} en 150 µl de agua estéril y se plaqueó con perlas. Se incubaron por 24 horas a 35 °C.

Este procedimiento se repitió durante 3 días

Digestión de PC132 y transformación de cepa parental CGM1: Miniprep de cepa 3454 de *E. coli* que contiene el vector PC132 Se agregaron 5 ml de caldo LB que contiene 5gr/L de extracto de levadura, 10 gr/L de triptona, 5gr/L de NaCl más carbenicilina a 4 tubos. 3 de ellos se inocularon por frozen la cepa de *E. coli* 3454. Luego se incubó a 30 °C a agitación constante por 12 horas. Se siguió el protocolo de purificación del laboratorio para la extracción del plásmido.

En dos tubos eppendorf se agregaron 25 µl del DNA plasmidico que se obtuvo en el sobrenadante de la extracción, 5 µl de Buffer 4, 0.5 µl de BSA 100x, 5 µl de SAM, 0.5 µl de Bsg1 (enzimas de restricción) y 14 µl de agua Milli-Q estéril, se sometió a proceso de digestión durante 12 horas a una temperatura de 37°C.

Para verificar la presencia del miniprep en la muestra se cargó un gel de agarosa al .8% se utilizaron 2 µl de la muestra digerida y 2µl del bromuro de fenol (BB10x) y se sometió a electroforesis por 30 minutos a 140 Volts.

Transformación de plásmido:

Se utilizó el protocolo de recombinación homóloga de la inserción de Tn7 en la región subtelomérica de *Candida glabrata* descrito en el Yeast Genetics Networks (Juarez Reyes, De Las Peñas, & Castaño, 2011) En el que se utilizó PEG, semen de salmón y acetato de litio.

Una vez realizada la transformación del hongo se hizo un preinoculo en caldo YPD y se incubó por 48 horas a 30°C . Se plaquearon 50 µl del cultivo con 150 µl de agua Milli-Q estéril en un medio de YPD+NAT, se incubó por 48 horas, Se eligieron colonias y se sembraron por estría en medio de, las colonias resultantes inocularon en 5 ml de caldo YPD, se midió cada media hora la densidad óptica hasta obtener de 1-.8. Se extrajo el DNA genómico por medio del protocolo del kit de extracción de laboratorio.

Verificación de la inserción correcta del vector en el área deseada. Dream taq master mix

En tubos para PCR se agregó 1µl de oligos, 1.5 ADN, 3.3 µl Dream taq Green 2x, se preparó para 8 reacciones (control positivo, control negativo y reacciones). Se colocaron los los tubos en el termociclador y se programó de la siguiente manera: 98°C – 3min, 95°C-30 seg, 58°C-30 seg, 72°C-2min 30seg, 72°C-5 min y 12°C-5min. Una vez terminados los ciclos se cargó un gel de agarosa al .8%, se agregó en cada pozo 3 µl de cada muestra distinta y se utilizó como marcador 2 µl de Bromofenol, se dejó correr por electroforesis a un voltaje de 140 por 35 min. Se utilizaron oligos distintos para cada extremo (5' y 3') más sin embargo se usó el mismo procedimiento. Resultados (Figura 1 y 2)

RESULTADOS

		abf1-43/pcMyc-Abf1(1) 3455	abf1ΔpABF1/pcMyc-Abf1(1) 3594	abf1-43/pcMyc-Abf1(2) 3455	abf1ΔpABF1/pcMyc-Abf1(2) 3594	abf1-43/pcMyc-Abf1(3) 3455	abf1ΔpABF1/pcMyc-Abf1(3) 3594
DÍA 0	ODi	23.181	28.076	22.925	23.706	22.363	30.444
	Cell/mL	4.64E+08	5.62E+08	4.59E+08	4.74E+08	4.47E+08	6.09E+08
	10 ⁻¹	4.64E+07	5.62E+07	4.59E+07	4.74E+07	4.47E+07	6.09E+07
	10 ⁻⁵	4.64E+03	5.62E+03	4.59E+03	4.74E+03	4.47E+03	6.09E+03
DÍA 1	ODi	27.246	32.654	20.508	33.972	26.404	35.889
	Cell/mL	5.45E+08	6.53E+08	4.10E+08	6.79E+08	6.79E+03	7.18E+08
	10 ⁻¹	5.45E+07	6.53E+07	4.10E+07	6.79E+07	5.28E+07	7.18E+07
	10 ⁻⁵	5.45E+07	6.53E+03	4.10E+03	6.79E+03	5.28E+03	7.18E+03
DÍA 2	ODi	27.319	35.083	22.156	40.21	27.307	39.087
	Cell/mL	5.46E+08	7.02E+08	4.43E+08	8.04E+08	5.46E+08	7.82E+08
	10 ⁻¹	5.46E+07	7.02E+07	4.43E+07	8.04E+07	5.46E+07	7.82E+07
	10 ⁻⁵	5.46E+03	7.02E+03	4.43E+03	8.04E+03	5.46E+03	7.82E+03

Se

obtuvo crecimiento en los cultivos de *C. glabrata* después de la transformación en los medios de 5-FOA.

Tabla. 1. Densidad óptica de los medios y concentraciones en los tres días.

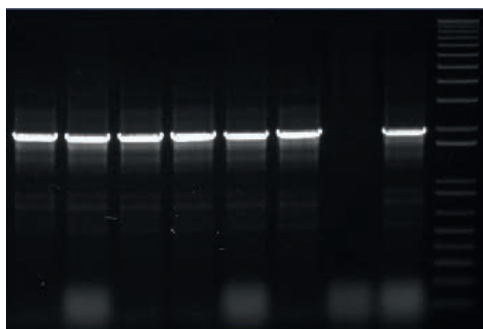


Imagen. 1. Resultado de electroforesis del extremo 3'. Tamaño del segmento 1.2 kb.

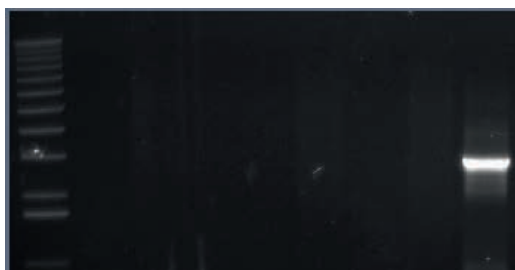


Imagen. 2. Resultado de electroforesis del extremo 5'. Tamaño del segmento 2.6 kb.

CONCLUSIONES

El gen reportero URA3 es usado comúnmente para evaluar el silenciamiento subtelomérico, ya que para la síntesis de uracilo produce un metabolito tóxico para la levadura llamado oritidina 5 fosfato descarboxilasa a partir de 5 FOA (5 fluoro-orotic acid) (Juarez Reyes, De Las Peñas, & Castaño, 2011) basado en esto comprobamos que obtuvimos una transformación positiva ya que las colonias crecieron positivamente en éste medio. De acuerdo a los resultados obtenidos de la extracción del genómico por medio de PCR y electroforesis nos marcan que el vector fue insertado en el área correcta ya que se esperaba un segmento con un tamaño de 1.2 kb en el extremo 3' que se logró conseguir en las muestras.

BIBLIOGRAFÍA

Castaño, I., Cormack, B., & De la Peñas, A. (2006). Virulencia del hongo patógeno oportunista *Candida glabrata*. *Revista latinoamericana de Microbiología ALAM*, 66-69.



De Las Peñas, A., Juárez-Cepeda, J., López-Fuentes, E., Briones-Martín-del-Campo, M., Gutiérrez-Escobedo, G., & Castaño, I. (2015). Local and regional chromatin silencing in *Candida glabrata*: consequences for adhesion and the response to stress. *FEMS*, 1-7.

De las Peñas, A., Orta Zavala, E., Martínez Jiménez, V., & Castaño, I. (s.f.). *Adherence, virulence and cell wall proteins of Candida glabrata*.

Juárez Reyes, A., De Las Peñas, A., & Castaño, I. (2011). Analysis of Subtelomeric Silencing in *Candida glabrata*. En A. B. (editor), *Yeast Genetic Networks* (págs. 279-300). New York, USA: Springer.

Sleekaman, B., Gorman, J., & Alt, F. (1996). Accessibility control of antigen-receptor variable-region gene assembly: role of cis-acting elements. *Annu. Rev. Immunol.*, 459-481.

PRUEBAS DE CONTROL BIOLÓGICO DE ACTINOMICETOS DE SUELO DE ÁREAS NATURALES PROTEGIDAS CONTRA HONGOS FITOPATÓGENOS

Albo Josué Hernández Rojas¹ y Blanca Estela Gómez Luna²

RESUMEN

En la rizosfera se encuentran bacterias que promueven el crecimiento vegetal, en las áreas naturales se encuentran especies de actinomicetos que promoverían el crecimiento de plantas de esas zonas, así como también de plantas de interés comercial, el uso de estos actinomicetos además de ser una herramienta biológica se promueve como herramienta natural no agresiva contra el medio ambiente para el crecimiento vegetal. En el presente trabajo se utilizaron cepas aisladas de la zona de las Cruces que es un área natural protegida ubicada entre Salvatierra y el Cerro de Culiacán en el estado de Guanajuato, estas bacterias se sometieron a pruebas bioquímicas para verificar la producción de quitinasa, celulasa y sideróforos, así como también se les realizó ensayos de antagonismo contra *Fusarium oxysporum*, *Alternaria spp.*, *Bipolaris spp.*, que son hongos fitopatógenos. De las pruebas se obtuvo que solo 4 cepas presentaron antagonismo óptimo y de esas 4 cepas solo una producía los 3 mecanismos evaluados para presentar antagonismo. La cepa 304 fue la mejor para trabajos como PGPR. El uso de actinomicetos para la búsqueda de compuestos usados en la agricultura es una alternativa amigable con el medio ambiente.

Palabras clave: Actinomiceto, PGPR, fitopatógeno, antagonismo.

ABSTRACT:

In the rhizosphere are bacteria that promote plant growth, in the natural areas are species of actinomycetes that would promote the growth of plants in those areas, as well as plants of commercial interest, the use of these actinomycetes in addition to being a tool is promoted as a natural non-aggressive tool against the environment for plant growth. In the present work we used strains isolated from the Cruces area, which is a protected natural area located between Salvatierra and Cerro de Culiacán in Guanajuato state, these bacteria were submitted to biochemical tests to verify the production of chitinase, cellulase and Siderophores, as well as tests of antagonism against *Fusarium oxysporum*, *Alternaria spp.*, *Bipolaris spp.*, which are phytopathogenic fungi. From the tests it was obtained that only 4 strains presented optimal antagonism and of those 4 strains only one produced the 3 mechanisms evaluated to present antagonism. Strain 304 was the best for jobs like PGPR. The use of actinomycetes for the search for compounds used in agriculture is an environmentally friendly alternative.

Keywords: Actinomycete, PGPR, phytopathogen, antagonism.

1. INTRODUCCIÓN

En suelos agrícolas se encuentran hongos fitopatógenos tales como *Alternaria spp.*, *Fusarium spp.*, y *Bipolaris spp.*, entre otros que atacan cultivos de importancia económica a nivel mundial, causando grandes pérdidas económicas. Con las nuevas regulaciones y restricciones en el uso de plaguicidas y la demanda de productos orgánicos, crece el interés por el uso de tácticas alternativas a los fungicidas para el manejo de enfermedades, particularmente el uso de microorganismos benéficos, y sus metabolitos primarios y secundarios (Ezziyani et al., 2004).

Actualmente, diversas investigaciones se han centrado en la búsqueda de nuevos antimicrobianos, principalmente de origen en actinomicetos, por su prolífica producción de antibióticos naturales y metabolitos secundarios (Oskay et al., 2004; Prashith et al., 2010). Los actinomicetos son bacterias Gram-positivas y no ácido alcohol resistente, que se caracterizan por formar filamentos ramificados semejantes a los hongos, son saprofitos y sus células son procarióticas; son quimioautótrofos que realizan respiración aeróbica o en algunos casos fermentativa (Bergey et al., 2000). Se caracterizan por no producir mucopolisacáridos, de ahí que se observen en placas de agar como colonias secas y no cremosas. Dentro de sus características particulares presentan un olor típico a suelo húmedo por la producción de un metabolito llamado "geosmina" (Ben-Omar et al., 1997). Los actinomicetos son abundantes y cosmopolitas en el ambiente, lagos, ríos, suelo y estiércol de animales; son aerobios y se ubican en la superficie del suelo, aunque también viven en los horizontes inferiores, en especial en suelos alcalinos (Betina, 1994).

Los productos de actinomicetos incluyen principalmente: antibióticos, antifúngicos, metabolitos, enzimas extracelulares (quitinasas, peroxidasas, glucanasas), inhibidores enzimáticos, neurotransmisores, terpenoides, pigmentos, anticancerígenos y pesticidas entre otros; presentan una alta actividad metabólica y son capaces de degradar la materia orgánica vegetal y animal, producen sideróforos, sustancias promotoras del crecimiento vegetal in vitro, ayudan a la asimilación del hierro, en la fijación de nitrógeno, lo cual contribuye indirectamente a la

promoción de crecimiento vegetal. El orden de los Actinomycetales constituye 63 géneros, constituyendo aproximadamente de 20-60% de la población microbiana del suelo (Crawford et al., 1993; Ezziyani et al.).

El uso de estos organismos como agentes de control biológico de enfermedades radiculares es de gran interés en la actualidad, la presencia endofítica de *Streptomyces sp.*, puede jugar importantes roles en el desarrollo y salud de plantas, ya que ellos pueden afectar el crecimiento de las mismas por la asimilación de nutrientes o por la producción de metabolitos secundarios (Sánchez-Yáñez, et al., 2007). Los actinomicetos producen diferentes tipos de metabolitos, por lo cual surgen como una prometedora fuente de controladores biológicos; de ahí la importancia del objetivo de este trabajo:

Evaluación del antagonismo con actinomicetos de áreas naturales protegidos contra los hongos fitopatógenos *Alternaria spp.*, *Bipolaris spp.*, y *Fusarium oxysporum* El control microbiológico se plantea como una alternativa ecológica sin repercusión tóxica en el ser humano y con grandes perspectivas en el control de éstos patógenos.

2. METODOLOGIA

2.1 Materiales, reactivos y soluciones.

Medio ADP y CDP: Se pican 200 g de papa posteriormente los trozos de papa se ponen a hervir en 1 L de agua destilada durante 20 min y luego se filtra el líquido con algodón y gasa. Para preparar Agar Dextrosa Papa (ADP) se agrega agar y glucosa al 2% o si es Caldo Dextrosa Papa solo agregar glucosa al 2%. Se esterilizan por 15 minutos a 15 lb de presión.

Medio de selección ACC: Este medio de cultivo contiene por litro 4 g KH₂PO₄, 6 g NaHPO₄, 0.2 g MgSO₄, 1 mg FeSO₄, 10 µg H, 10 µg MnSO₄, 50 µg CuSO₄, 10 µg MoO₃, 70 µg ZnSO₄, glucosa 0.2%, ácido glucónico 0.2%, agar bacteriológico al 2% y ACC 3mM (SIGMA) por Penrose & Glick, (2003).

Medio agar-CAS: Consiste en 4 soluciones de las cuales se esterizaron por separado antes de formar el medio final. La solución 1 o solución indicadora Fe-CAS se preparó mezclando 10 mL de una solución de 1 mM de FeCl₃•6H₂O (en HCl al 10mM) con 50ml de una solución acuosa de CAS-aminoácidos (Cromo azurol S) con una concentración de 1.21 mg/mL. La mezcla púrpura oscuro que resulto se adiciono lentamente y con agitación constante a 40 mL de una solución acuosa de HDTMA (Bromuro de Hexadecil-trimurti-amonio) que tiene una concentración de 1.82 mg/mL. Es importante mencionar que todos los reactivos en la solución indicadora se deben preparar justo antes de preparar el agar CAS-aminoácidos. La solución 2 o solución reguladora se preparó disolviendo 30.24 g de PIPES (piperazina-N, N'-bis [2-ácido etanosulfónico]) en 750 mL de una solución salina que contenía 0.3 g de KH₂PO₄, 0.5 g de NaCl y 1.0 g de NH₄Cl. Se ajusta el pH a 6.8 con KOH al 50% y se adiciono agua destilada hasta alcanzar un volumen de 800 mL. Se agregó 15 g de agar bacteriológico. Para preparar la solución 3, en 70 mL de agua se agregó 2 g de glucosa, 2 g de manitol, 493 mg de MgSO₄•7H₂O, 11 mg de CaCl₂, 1.17 mg de MnSO₄•H₂O, 1.4 mg de H₃BO₃, 0.04 mg de CuSO₄•5H₂O, 1.2 mg de ZnSO₄•7H₂O y 1.0 mg de Na₂MoO₄•2H₂O. Las soluciones 1, 2 y 3 se esterizaron por separado y se enfriaron a 50° C. La solución 4 consistió en preparar 30 ml de CAS-aminoácidos al 10% (p/v) esterilizados por filtración a través de una membrana Millipore tipo GS de 0.22 µm de diámetro. La solución 3 se adiciono a la solución reguladora junto con la solución de CAS-aminoácidos. La solución indicadora se adiciono hasta el final, con suficiente agitación para mezclar los ingredientes evitando la formación de burbujas (Alexander & Zuberer, 1991). Se utilizó el método por picadura para sembrar las cepas aisladas y se incubo a 28° C por 24 horas. Se observó alrededor de la picadura un halo de color naranja lo cual es positivo a la liberación de hierro a partir del complejo colorido Fe-CAS por los aislados.

Medio para enzimas líticas de quitina y celulosa: Es el medio minino agar Czapek el cual contiene 3 g NaNO₃, 0.50 g MgSO₄, 0.50 g KCl, 0.01 g FeSO₄, 1.31 g KH₂PO₄, agar bacteriológico al 2% y 2 g de quitina o celulosa microcristalina como fuente de carbono para un litro de agua destilada y se calentó a disolución completa, se esterilizo durante 15 minutos a 121° C y 15 lb de presión. Se utilizó el método por picadura y se incubo a 28° C por 5 días. Después se observó cuáles de los aislados son capaces de degradar la quitina o la celulosa por formación de un halo de degradación alrededor de la colonia.

2.2 Recolección de muestra

La muestra se recolecto en el ANP que se encuentra ubicada en la comunidad "Las Cruces" con coordenadas geográficas 200° 55'5" latitud Norte, 100° 58' 38" longitud Oeste, en Salvatierra, Guanajuato. Para ello se excavo en áreas cercanas a las raíces y se tomó la muestra de tierra.

2.3 Tratamiento de la muestra y preselección de bacterias PGPR o BPCV

La muestra se deja secar al sol hasta que pierda suficiente humedad posteriormente es tamizada en malla 140 y se toman 20 g de muestra, se diluyeron en 90 mL de agua estéril colocándolas por 2 h en un agitador orbital a 4200 rpm.

Para la preselección de bacterias PGPR, las muestras de suelo disueltas en agua estéril se sembraron en el medio selectivo ACC usando el equipo *Spiral Plater* en modo exponencial y las placas se incubaron por 48 h. Se seleccionaron cepas de las muestras de suelo y se volvieron a sembrar en medio ACC para verificar que fueran potenciales PGPR y se dejaron incuban por 48 h posteriormente se aislaron en medio ADP y se dejaron incuban por 24 h.

2.4 Caracterización morfológica macroscópica y microscópica

Se realizó la caracterización de la morfología colonial para seleccionar bacterias del género *Actinomicetos*, así como también se les realizó la tinción Gram.

2.5 Ensayo de antagonismo contra hongos fitopatógenos

A las cepas seleccionadas se les realizó la prueba de antibiosis contra tres tipos de hongos fitopatógenos, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria spp.*, *Bipolaris spp.*, en medio ADP. Se tomó un disco de 5 mm de ADP con previo crecimiento del hongo fitopatógeno y se colocó al centro de una caja Petri con medio ADP permitiendo su crecimiento radial y se estrilaron 4 bacterias diferentes en cada uno de los puntos cardinales. Las placas se dejarán en incubación por 48 h a una temperatura de 28°C.

2.6 Ensayo de sideróforos

Se utilizó el medio CAS (CAS-aminoácidos) para la detección de sideróforos, las cepas aisladas se sembraron por duplicado utilizando la siembra por picadura y se incubaron por 48 h a 28°C.

2.7 Actividad de celulasa y quitinasa

En el medio mínimo Agar Czapek para enzimas líticas ya sea para quitinasa o celulasa se realizó la siembra por duplicado de las cepas seleccionadas utilizando la siembra por picadura y se dejaron incubar por 5 días a 28°C.

RESULTADOS Y DISCUSION

Las cepas que se trabajaron son Actinomiceto, estas cepas se aislaron en un trabajo anterior sin embargo no se habían tomado en cuenta para propósitos de promotoras del crecimiento vegetal, en este trabajo se evaluó su capacidad como PGPR con un mecanismo indirecto del crecimiento de la planta que es la inhibición de hongos fitopatógenos tales como *Fusarium oxysporum*, *Alternaria spp.* y *Bipolaris spp.*

Se trabajó con un total de 19 cepas diferentes y se les realizó pruebas de producción de quitinasa, celulasa y sideróforos. En la tabla 1 se plasman los resultados de cada una de las pruebas. Se observa que solo unas cuantas cepas producen las dos enzimas y el elemento quelante sideróforos. La importancia de estas enzimas recae en que la quitina es un elemento de la pared celular de los hongos, si las cepas producen quitinasa serán capaces de degradar la pared celular y ejercer un control sobre hongos, por otro lado está la celulasa, si las cepas son capaces de producir esta enzima entonces serán capaces de degradar la pared celular vegetal y poder anidarse dentro de la planta, si ambas enzimas son producidas entonces la cepa será capaz de anidarse dentro de la planta y además defenderla de la interacción planta-fitopatógeno.

Tabla 2. Porcentaje de antagonismo contra hongos fitopatógeno. En Rosa se indica las cepas con un porcentaje de antagonismo por encima del promedio y con amarillo las cepas que presentaron antagonismo por encima del promedio para los tres hongos.			
	<i>F. oxysporum</i>	<i>Bipolaris spp.</i>	<i>Alternaria spp.</i>
113	42%	11%	40%
121	33%	25%	46%
125	0%	0%	0%
210	49%	27%	55%
254	40%	27%	33%
256	33%	0%	37%
257	40%	22%	0%
257.1	44%	45%	62%
258	40%	28%	33%
263	20%	15%	57%
263.1	36%	20%	36%
264	29%	24%	46%
264.1	44%	15%	60%
265	40%	11%	46%
265.1	40%	21%	42%
266	40%	45%	45%
269	35%	25%	36%
302	55%	11%	54%
303	39%	39%	39%
304	42%	30%	54%

Tabla 1. Producción de quitinasa, celulasa y sideróforo. 1: Presencia de enzima o sideróforo 0: Ausencia de enzima o sideróforo. Amarillo: cepas que producen los 3 elementos.			
Cepa	Quitinasa Halo	Celulasa Halo	Sideróforo
113	1	1	1
121	1	1	1
210	0	0	1
254	1	1	1
256	0	0	1
257	1	1	1
257.1	0	0	1
258	0	0	No creció
263	1	1	No creció
263.1	1	1	1
264	1	1	No creció
264.1	1	1	1
265	1	1	1
265.1	0	1	No creció
266	0	1	1
269	1	1	1
302	1	1	1
303	0	0	0
304	1	1	1

Para probar la capacidad de inhibición de hongos fitopatógenos de las cepas se realizó un ensayo de antagonismo. Los resultados se plasman en la tabla 2. No todas las cepas resultaron de tener capacidad inhibitoria por encima del promedio de las mediciones. En color rojo claro se señalan las cepas que obtuvieron una capacidad inhibitoria por encima del promedio y con amarillo las cepas que presentaron inhibición para los 3 hongos fitopatógenos, la cepa 210, 257.1, 266 y 304.

Si comparamos estos resultados con los de la tabla 1. El mecanismo efector de la cepa 210 y 257.1 es únicamente el sideróforo, la cepa 266 tiene una combinación de quitinasa con sideróforo, y por último esta la cepa 304 que tiene una combinación de los 3 mecanismos evaluados de promoción indirecta del crecimiento vegetal.

El mecanismo por el cual actúa es por el quelante sideróforo, utilizan el hierro como sustrato para su crecimiento y con el secuestro de este por medio del quelante microbiano se inhibe el crecimiento del hongo.

Como trabajo a futuro se realizó el aislamiento de cepas del cerro de los Agustinos con potencial como PGPR, se aislaron un total de 54 cepas en el medio ACC.

CONCLUSIONES

De las cepas aisladas se considera la 304 como la mejor cepa al presentar 3 mecanismos defensivos de hongos fitopatógenos.

El uso de cepas que promuevan el crecimiento de plantas por inhibición de hongos fitopatógenos tiene un amplio potencial tanto comercial como para zonas protegidas. Muchos productos comerciales se ven afectados por hongos tales como los que se usaron para el ensayo de confrontación de este trabajo. Así como también para plantas de zonas protegidas que no crecen debido a la infección de hongos.

El aumentar la población de PGPR en el suelo ayudaría al crecimiento de plantas tanto comerciales como de ANP.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Ezziyyani, M.; Pérez, C.; Requena, M.; Rubio, L. and Candela, M. 2004. Biocontrol por *Streptomyces rochei*- Ziyani-, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. *Anales de Biología*.26:69-78
- [2] Oskay, M.; Tamer, A. U. and Azeri, C. 2004. Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *Afric. J. Biotechnol.* 3:441-6.
- [3] Bergey, J.; Hendriks, D. and Holt, J. 2000. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Sneathy Stanley, J. T. (Eds.). Ed. The Williams and Wilkins Co. Philadelphia. 787 p

- 
- [4] Ben-Omar, N.; Merroun, M. L. M.; Arias Penalver, J. M. and González, M. M. T. 1997. Comparative heavy metal biosorption study of Brewery yeast and *Myxococcus xanthus* biomass. *Chemosphere*. 35:2217-2283.
- [5] Betina, V. 1994. Microbial metabolites affecting plant growth and metabolism. In: Betina, V. (Ed.). *Bioactive secondary metabolite of microorganism*. 192-208 p
- [6] Crawford, D. L.; Lynch, J. M.; Whipps, J. M. and Ousley, M. A. 1993. Isolation and characterization of actinomycetes antagonists of a fungal root pathogen. *USA. Appl. Env. Microbiol.* 59:3899-3905.
- [7] Sánchez-Yáñez, J. M.; Villegas, M. J. y Márquez, B. L. 2007. El papel de los actinomicetos en la agricultura. Laboratorio de Microbiología Ambiental. Instituto de Investigaciones Químico Biológicas. Instituto de Investigaciones en Recursos Naturales. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. <http://www.monografias.com/trabajos47/actinomicetos/actinomicetos.shtml>
- Penrose D., Glick B. (2003). Methods for isolating and characterizing ACC deaminase containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiologia plantarum*. 118:10-15.
- [8] Alexander, M. (1980). Introducción a la microbiología del suelo. AGT Editorial. 11-13. Barreto, D., Valero, N., Muñoz, A. & Peralta, A. (2007). Efecto de microorganismos rizosféricos sobre germinación y crecimiento temprano *Anacardium excelsum*. *Zonas Áridas*. 11(1): 240-250.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad de Guanajuato por el espacio brindado para el trabajo, a la Dra. Blanca Estela Gómez Luna por la guía y brindar la oportunidad de trabajar con ella, a mi alma mater por el apoyo para estas actividades de investigación, a mis compañeros de verano por hacerme pasar el tiempo de manera agradable y siempre brindar una mano en el trabajo.

INTRODUCCION AL MANEJO DE MICROALGAS: *CHORELLA*

Cinthia Alejandra Silva Hernández¹ y Dr. Enrique Arturo Cantoral Uriza²

RESUMEN

En el presente documento se indican los principales lineamientos para la elaboración de los reportes del 19° *Verano de la Ciencia de la Región Centro* y se enumeran los principales elementos que cada artículo debe contener. El resumen constará de 100 a 120 palabras explicando de manera general el contexto del trabajo realizado, es decir, la importancia del mismo, algunas características entre las que se incluya, el tipo de trabajo en cuanto a experimental, básico, de campo u otro, el alcance del mismo y los resultados logrados. Esta plantilla permite la generación del reporte de las estancias en el formato solicitado.

ABSTRACT

This paper presents a general format for technical papers. The main objective of this template is to establish a homogeneous format. In this guide, the main elements that an article should have in order to be published are explained..... El abstract corresponde al resumen en idioma inglés.

Palabras Clave: Incluir en esta parte de 3 a 5 palabras clave relacionadas con el escrito.

INTRODUCCIÓN

Chlorella es un género de cerca de diez especies de algas unicelulares de células pequeñas, esféricas o elipsoidales. Generalmente se producen en el suelo y en agua dulce. También se han encontrado como endosimbiontes en animales invertebrados como *Paramecium*. Son células no flageladas pero contienen un aparato flagelar vestigial. Su reproducción es asexual. Poseen una pared celular de polisacáridos firme que, en parte, está hecha de una sustancia similar a la esporopollenina que se produce en las paredes de los granos de polen de las plantas superiores. Contiene varios nutrientes esenciales y es una rica fuente de luteína. *Chlorella* ha sido ampliamente estudiada y utilizada en diversas aplicaciones prácticas en agricultura y biotecnología.^[1]

La rigidez de la pared celular preserva la integridad de la célula y es básicamente una protección contra los invasores y el medio ambiente áspero. Varía según la fase de crecimiento. Durante su formación temprana, la pared celular recién formada permanece frágil, formando una capa unilaminar delgada de una densidad electrónica de 2 nm. La pared celular de la célula hija aumenta gradualmente de grosor hasta alcanzar 17-21 nm después de la maduración, donde se forma una capa microfibrilar que representa una capa parecida a quitosana compuesta de glucosamina, lo que explica su rigidez. En la etapa madura, el grosor y la composición de las paredes celulares no son constantes porque pueden cambiar de acuerdo con diferentes condiciones de crecimiento y medio ambiente.^[2]

C. vulgaris es una célula reproductiva no móvil (autospore) que se reproduce asexualmente y rápidamente. Así, en 24 h, una célula de *C. vulgaris* crecida en condiciones óptimas se multiplica por autosporulación, que es la reproducción asexual más común en algas. De esta manera, se forman cuatro células hijas que tienen su propia pared celular dentro de la pared celular de la célula madre. Después de la maduración de estas células recién formadas, la pared celular madre se rompe, permitiendo la liberación de las células hijas y los restos restantes de la célula madre serán consumidos como alimentación por las células hijas recién formadas.^[2]

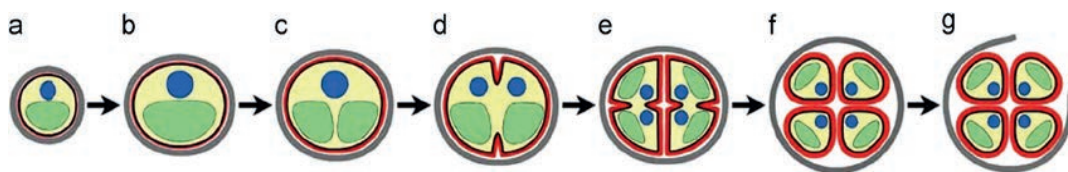


Figura 1. Fases de la reproducción de *Chorella*

La producción anual de *Chlorella* alcanzó 2000 toneladas (peso seco) en 2009, y los principales productores son Japón, Alemania y Taiwán. Esta microalga tiene una velocidad de crecimiento rápida y responde a cada conjunto de condiciones de crecimiento modificando el rendimiento de un componente específico. *C. vulgaris* es ideal para la producción porque es notablemente resistente contra las condiciones duras y los invasores. Por un lado, el contenido de lípidos y almidón aumenta y la productividad de la biomasa cesa o disminuye durante condiciones de crecimiento desfavorables tales como limitación de nitrógeno y fósforo, alta concentración de CO₂, exposición excesiva a la luz, exceso de hierro en el medio o aumento de temperatura. Por otro lado, el contenido de proteínas aumenta durante condiciones de crecimiento normales y controladas. Por lo tanto, se han probado muchas técnicas de crecimiento con el fin de orientar voluntariamente la productividad de la biomasa, lípidos, proteínas, carbohidratos y contenido de pigmentos.^[2]

La tecnología de los biorreactores cerrados se implementó principalmente para superar algunos factores limitantes en los sistemas de estanques abiertos, incrementando así la biomasa en un ambiente manejado (pH, intensidad de luz, temperatura, concentración de dióxido de carbono) para obtener una mayor concentración celular así como que sean más adecuados para la producción de productos farmacéuticos puros, nutracéuticos y cosméticos. Además, estos sistemas son más apropiados para las cepas sensibles que no pueden competir y crecer en un ambiente árido. La alimentación de la biomasa con CO₂ viene burbujeando los tubos. Las luces fluorescentes se utilizan en caso de que los reactores no estén o no suficientemente expuestos a la luz solar. También se utilizan muy comúnmente tubos que tienen generalmente 20 cm o menos de diámetro y el grosor de sus paredes transparentes es de unos pocos milímetros, permitiendo una absorción de luz adecuada. Sin embargo, se han ensayado múltiples diseños: foto-biorreactor de placa plana, fotobiorreactor tubular y fotobiorreactor de columna. No obstante, las principales desventajas de un sistema cerrado son el coste de la sofisticada construcción, el pequeño área de iluminación y los costes de esterilización.^[2]

Muchos estudios han demostrado el notable potencial de *C. vulgaris* en la fijación de hasta el 74% de dióxido de carbono cuando se creció en un fotobiorreactor, y en la absorción de 45-97% de nitrógeno, 28-96% de fósforo y en la reducción de la demanda química de oxígeno -86% de diferentes tipos de aguas residuales como textiles, aguas residuales, municipales, agrícolas y recalcitrantes. Las microalgas proporcionan una vía para la eliminación de nutrientes vitales (nitrógeno y fósforo), dióxido de carbono, metales pesados y patógenos presentes en las aguas residuales y necesarios para su crecimiento. Además, el ahorro y los requerimientos para la remediación química y la posible minimización del uso de agua dulce para la producción de biomasa son los principales impulsores del cultivo de microalgas como parte de un proceso de tratamiento de aguas residuales.^[2]

El concepto de biorrefinería se ha inspirado en el concepto de refinería de petróleo. Refleja una plataforma que integra un proceso para fraccionar los componentes de una biomasa para producir múltiples productos y por lo tanto una biorrefinería aprovecha los diversos componentes de la biomasa para mejorar el valor derivado de cada componente y también generar su propia potencia, Que maximiza la rentabilidad y preserva el medio ambiente. Por lo tanto, *C. vulgaris* con todo su potencial y riqueza en proteínas, carbohidratos, lípidos, pigmentos, minerales y vitaminas descritas anteriormente merece ser completamente refinado sin olvidar que cada unidad de operación debe tener en cuenta la siguiente etapa y preservar la integridad de todos los componentes de interés en el proceso descendente.^[2]

MÉTODOS Y MATERIALES

Se hicieron dos cultivos de *chorella* diferentes, uno a partir de microalgas guardadas en frío y uno a partir de microalgas en crecimiento

Para ambos se prepararon dos litros de medio BG-11

Tabla 1. Preparación medio BG-11

#	Componente	(g · L ⁻¹ dH ₂ O)	Adición por 1 Litro de medio de cultivo
1	NaNO ₃		1.5 g
2	K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	40.00	1 ml
3	MgSO ₄ · 7H ₂ O	75.0	1 ml
4	CaCl ₂ · 2H ₂ O	36.0	1 ml
5	Ácido cítrico	6.0	1 ml
6	Citrato de amonio férrico	6.0	1 ml
7	MgNa ₂ EDTA · H ₂ O	1.0	1 ml
8	Na ₂ CO ₃	20	1 ml
9	Solución de metales traza		1 ml

Tabla 2. Preparación de la solución de metales traza

#	Metal	(g · L ⁻¹ dH ₂ O)
1	H ₃ BO ₃	2.86 g
2	MnCl ₂ · 4H ₂ O	1.81 g
3	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.22 g
4	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.39 g
4	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.08 g
6	Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0.05 g

El medio BG-11 se esterilizó en una autoclave.

En un matraz Erlenmeyer estéril de 150 ml se colocaron 100 ml de medio BG-11 y 5 ml de microalgas guardadas en frío, se les puso una torunda de algodón y se colocaron junto a una ventana donde la luz solar fuera accesible. Agregando 20 ml de medio aproximadamente cada cuatro días.

En un matraz Erlenmeyer estéril de 150 ml se colocaron 100 ml de medio BG-11 y 10 ml de microalgas en crecimiento y se colocaron junto a una ventana donde la luz solar fuera accesible, colocándole un tubo conectado a una bomba de aire con la finalidad de insertar CO₂ al sistema y se cerro con una torunda de algodón para asegurar la esterilidad.

Las microalgas guardadas en frío que se inocularon tuvieron un crecimiento lento y al observarse al microscopio, pocas se encontraban en una fase de reproducción, lo que nos sugiere que a pesar de estar en un medio favorable no despertaron por completo, a la tercera semana después de la inoculación se observaron hifas y bacterias en el medio, a la cuarta semana la mayoría de las microalgas murieron.

Las microalgas en crecimiento que se inocularon se vieron favorecidas por la inyección de CO₂ del ambiente, su crecimiento fue más rápido y al observarse en el microscopio podían verse varias células en estadios propios de la fase de reproducción.

CONCLUSIONES

El estudio de las microalgas es un amplio sector, cuya importancia radica en la capacidad de estos organismos para fijar nutrientes y reducir el CO₂ del ambiente. Las condiciones en las que se hacen los cultivos son cruciales, dado que una contaminación de hongos o bacterias nos conlleva a una reducción en la tasa de crecimiento y la posterior muerte de las algas.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Juan Pablo Ramírez Herrejón por las facilidades otorgadas en el desarrollo del trabajo, a la Dra. Miriam Guadalupe Bojorge García por su guía y amabilidad y al Dr. Enrique Arturo Cantoral Uriza por todo el conocimiento transmitido.

BIBLIOGRAFIA

[1] Wakasugi T, et al. (1997). "Complete nucleotide sequence of the chloroplast genome from the green alga *Chlorella vulgaris*: the existence of genes possibly involved in chloroplast division." Wakasugi T, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997 May 27

[2] Carl, Sofi et. al. "Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review" en *Renewable and Sustainable Energy Reviews* Volume 35, July 2014, Pages 265-278

CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES Y ESPECIES SILVESTRES DE LA FAMILIA DROSOPHILIDAE DEL CENTRO DE LA REPÚBLICA

Cristopher Ivan Gastón Martínez¹ y Dr. Juan R. Riesgo-Escovar²

RESUMEN

Se analizó la población de especies silvestres de *Drosophila*, tanto en una zona urbana como el municipio de Querétaro, como una zona en crecimiento, sin alto impacto poblacional e industrial, como es el municipio de Huimilpan. Se recolectaron especies silvestres en 6 localidades entre estos 2 municipios, se identificaron taxonómicamente, y se extrajo DNA para la identificación del gen mitocondrial CO1, el cual es un parámetro taxonómico para identificar la subespecie. También se encontró una especie invasora, *Zaprionus Indianus*, que aunque su presencia fue mínima, es importante registrarla para controlar su desplazamiento y posibles efectos negativos en el ecosistema. El análisis poblacional de especies de *Drosophila* nos arrojó mayor diversidad de especies en Huimilpan, que en la zona urbana de Querétaro, esta última presentando mayor presencia de especies cosmopolitas.

ABSTRACT

The population of wild species of *Drosophila* was analyzed, both in an urban area as the municipality of Querétaro, as a growing area, without high population and industrial impact, such as the municipality of Huimilpan. Wild species were collected in 6 locations between these two locations, were taxonomically identified, and DNA was extracted for identification of the CO1 gene, which is a taxonomic parameter to identify the *Drosophila* subspecies found. An invasive species, *Zaprionus Indianus*, was also found, although its presence was minimal, it is important to register it to control its displacement and possible negative effects on the ecosystem. The population analysis of *Drosophila* species gives us greater diversity of species in Huimilpan than in the urban area of Querétaro, the latter presenting the mayor of the presence of cosmopolitan species.

Palabras Clave: *Drosophila*, especies silvestres, gen CO1, urbanización.

INTRODUCCIÓN

El cambio climático global puede provocar un cambio en la composición y el funcionamiento de las comunidades biológicas (Parsons, 1991). Aunado a lo anterior la urbanización a menudo conduce a la destrucción de hábitats naturales y cambios significativos en la biodiversidad y abundancia de especies endémicas (Ferreira. Tidon, 2005).

La familia de los Drosophilidae consiste en aproximadamente 4.000 especies distribuidas en aproximadamente 65 géneros, incluyendo *Drosophila*. Los miembros del género *Drosophila* se usan ampliamente en estudios genéticos, de desarrollo y de biología molecular (Strickberger, 1962).

Drosophila tiene el potencial de ser un organismo modelo para estudiar la influencia de la perturbación “antropogénica”, particularmente la urbanización, en la biodiversidad y abundancia de especies. Las especies endémicas de *Drosophila* son a menudo muy sensibles al deterioro natural del hábitat, pueden formar asociaciones de huéspedes muy específicas y no son capaces de adaptarse a las modificaciones ambientales humanas (Avondet, Blair, Berg, y Ebbert, 2003). Lo anterior da como resultado, una disminución en la abundancia de especies. *Drosophila* podría indicar que un hábitat está siendo perturbado por la influencia humana. Por otra parte la colonización de especies cosmopolitas de *Drosophila* que se caracterizan por ser abundantes en ambientes, podrían desplazar a las especies silvestres (Hooper y col., 2008).

La taxonomía es la ciencia de definir y nombrar grupos de organismos biológicos en base a características compartidas. “DNA barcoding” es un método taxonómico que utiliza un marcador genético corto en el ADN de un organismo para identificarlo como perteneciente a una especie en particular (Paul D N, 2003).

La región de “barcoding” más comúnmente utilizada para animales y protistas es un segmento de aproximadamente 600 pares de bases del gen mitocondrial citocromo oxidasa I (COI). COI es adecuado para este papel porque su tasa de mutación es a menudo lo suficientemente rápido para distinguir especies estrechamente relacionadas y también porque su secuencia se conserva entre con específicos (Hebert P D, 2003).

Querétaro, México, se considera un estado con gran potencial en crecimiento industrial, poblacional y económico (INEGI, 2015), predomina principalmente un clima seco y semiseco en la región centro (51%), conformado por los siguientes municipios: Santiago de Querétaro, Corregidora, El Marqués, Colón, Toluca, Peñamiller, Cadereyta de Montes, Ezequiel Montes, Tequisquiapan, San Juan del Río, Huimilpan, and Pedro Escobedo (E. González-Sosa). En esta investigación se recolectaron muestras de especies silvestres de *Drosophila* del estado de Querétaro en varios puntos estratégicos: Juriquilla, Querétaro; y Huimilpan. Lo anterior con el fin de evaluar la población en una zona comercial y urbana en crecimiento como lo es Juriquilla, y otra zona donde la urbanización y crecimiento poblacional no ha sido excesivamente alta; Huimilpan. Se identificarán por un método taxonómico tradicional las subespecies de *Drosophila* para comparar el hábitat entre ambas zonas, y para una confirmación más concreta, se identificó la presencia de gen mitocondrial COX1, por dos métodos de extracción de DNA, para que a futuro en una continuación del proyecto se pueda confirmar, todas las subespecies de *Drosophila* encontradas, y su posterior secuenciación genómica. Esta información podría servir para estudios futuros como el análisis mutaciones presentes en *Drosophila*, en el estado de Querétaro, México.

MÉTODOS Y MATERIALES

Para la recolección de muestras, se realizaron trampas artificiales, las cuales contenían plátano machacado y levadura comercial. Estas trampas fueron colocadas estratégicamente según las recomendaciones de Marcow T A y col., en 6 localidades diferentes como se muestra en la tabla 1. Las 6 trampas tuvieron una duración de 3 a 7 días antes de ser recogidas y llevadas al laboratorio.

Tabla. 1. Localización de las trampas artificiales colocadas en los municipios de Querétaro y Huimilpan.

Ubicación	Dirección	Coordenadas
1	Boulevard Juriquilla 3001, Santiago de Querétaro, Qro	20.699976,-100.444321
2	Boulevard Juriquilla 3001, Santiago de Querétaro, Qro	20.699739, -100.446701
3	Carretera Estatal No. 400 Querétaro-Huimilpan,	20.315503, -100.234139
4	Carretera Estatal No. 400 Querétaro-Huimilpan.	20.315433, -100.233855
5	Parque Nacional El Cimatario, Querétaro.	20.534647, -100.340643
6	San Pedro, Huimilpan, Querétaro.	20.310079, -100.280458

Una vez recolectadas las trampas artificiales, se procedió a la identificación taxonómica, donde se evaluaron características morfológicas como la orientación y cantidad de cerdas en la arista, forma y patrones de color en el mesonotum y tergitas, estructura venal en las alas, presencia o ausencia de combos sexuales, entre muchas otras características descritas según los manuales de identificación de Marcow T. A. y Patterson J. Una vez identificadas, los subgéneros de *Drosophila* similares fueron agrupadas. Lo anterior se realizó para cada una de las seis localidades donde fueron recolectadas las muestras.

Se realizó la extracción de DNA por el método propuesto por Greg Gloor y William Engels, el cual consistió en la preparación del "squishing buffer (SB)" (10 mM Tris-Cl pH 8.1, 1 mM EDTA, 25 mM NaCl, 0.2 % Triton x100). Se colocó una mosca en un tubo de 0.5 mL, se machaco durante 5 a 10 minutos con una punta de pipeta que contenía 55 µL de SB y 0.2 µL de pronasa (200 mg/mL) sin expeler ningún líquido. Realizado el paso anterior se vierte la mezcla completa a la mosca machacada. Se incubó a 37 °C durante 30 minutos, y se elevó la temperatura a 95 °C durante 1 minuto para la inactivación de la pronasa.

Se realizó otro método de extracción de DNA que incluía la purificación del mismo (M2), donde era necesario anestesiarse con CO₂ un total de 15 moscas (mismo subgénero) y colocarlas en un tubo de 1.5 mL, se agregó 100 µL de Buffer A (96 µL EDTA 250 mM, 6.4 µL NaCl, 20 µL SDS, 10 µL Tris pH 8, 40 µL Tris pH 9.2, 227.6 µL agua, 22 mg sacarosa) y se incubó a 68 °C durante 30 minutos. Una vez terminada la incubación se mantuvo el tubo a -4 °C durante 1 hora. Se centrifugó a 13,000 rpm durante 1 minutos. Se decantó el sobrenadante y se agregó 60 µL de acetato de sodio. Se agregó 600 µL de etanol al 70 %. Se centrifugó por 10 minutos a 13,000 rpm. Se agregó 200 µL de Buffer TE (*GFX PCR DNA and GEL Band Purification Kit, GE Healthcare*) y se resuspendió el pellet generado. Se agregó 200 µL de fenol, se mezcló durante 2 minutos y se centrifugó por 5 minutos a 13,000 rpm. Se tomó con una pipeta la primera fase cercana a la tapa de tubom y se agregó 2.5 x volúmenes de etanol 100% por cada volumen de la fase obtenida, se mantuvo en hielo durante 10 minutos y se centrifugó durante 10 minutos a 13,000 rpm. Finalmente se decantó el sobrenadante y se agregaron 20 µL de Buffer TE (*GFX PCR DNA and GEL Band Purification Kit, GE Healthcare*).

Una vez extraído el DNA y purificado (sólo el segundo método), se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Buffer TaqPol 2µL, MgCl 1 µL, dNTP 0.5 µL, DNA 2 µL, Taq polimerasa 0.25 µL, primer reverse/ forward 1 µL por cada uno, agua 13.75 µL), 45 ciclos, T_m= 43 °C. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de PCR. Las bandas se purificaron para su futura secuenciación con ayuda de un kit (*GFX PCR DNA and GEL Band Purification Kit, GE Healthcare*). Se determinó la concentración y pureza del DNA obtenido con ayuda de equipo *Thermo Scientific Nanodrop 2000*.

RESULTADOS

En la tabla numero 2 se muestran las especies de *Drosophila* y otras especies encontradas en las 6 localidades donde se elaboraron las trampas. Se consideran que *Drosophila busckii*, *D. immigrans*, *D. hydei*, *D. simulans* y *D. melanogaster* son de las especies más cosmopolitas, como vemos al menos 2 de ellas se encuentran en su mayoría en todas las regiones (*D. simulans* y *D. melanogaster*), y solo se encontró *D. busckii* en la región 4, lo cual suena lógico ya que esta muy cercano al centro de Querétaro donde existe más urbanización. Los puntos estratégicos se fijaron para hacer un contraste entre una zona urbana (Locación 1 y 2), y una zona con poco nivel poblacional e industrial como lo es Huimilpan (Locación 6), y una zona intermedia que conecta a ambos municipios (4,5,6). Cabe mencionar que desde el punto 3 se alejaba significativamente de la ciudad de Querétaro, no solo a carretera con pocas viviendas sino que la latitud iba en aumento entre más se acercaba al municipio de Huimilpan.

Como podemos ver en la tabla 2, existe mayor diversificación de especies a partir de la localidad 3 a 6, sin contar a las especies cosmopolitas.

Tabla. 2. Especies colectadas e identificadas en las 6 localidades donde se colocaron las trampas artificiales.

Locación	Genero	Subgenero	Cantidad
----------	--------	-----------	----------

1	Drosophila	Simulans	12
		Melanogaster	2
		Mercatorum	1
2	Drosophila (grupo repleta)*	-	11
	Drosophila	Melanogaster	33
		Simulans	4
		Mercatorum	1
	Zaprionus	Indianus	1
3	Drosophila	Simulans	3
		Funebris	1
		Mercatorum	2
		Victoria	1
		Ritae	1
4	Drosophila	Mercatorum	1
		Ritae	3
		Simulans	11
		Mulleri	2
		Busckii	1
		Victoria	3
5	Drosophila	Fulvimacula	1
		Aldrich	1
		Melanogaster	8
		Hamatofila	1
		Ritae	3
		Mojavensis	1
	Drosophila (grupo repleta)*	-	6
6	Drosophila	Simulans	9
		Arizonensis	1
		Aldrichi	1
		Mojavensis	1
	Megaselia	Scalaris	1

*Muestras de drosophila que no sobrevivieron para su identificación taxonómica.

En la tabla 2, también notamos que en la zona urbana (Locación 2) se encontro la presencia de una especie invasora *Z. indianus*, También conocido como el mosca africana de la higuera, es una plaga invasora, la especie fue por primera vez reportada en Brasil en 1999 (Commar y col., 2012). También es notable la presencia de *Megacelia Scalaris*, que es conocida por los problemas sanitarios que conlleva, por la distribución de organismos patogenos por contacto mecánico, debemos tomar en cuenta que la presencia de ésta, no es un indicio de urbanización, al no ser una especie cosmopolita, sino de sanidad, lo que indicaria que el lugar de recolección estaría sufriendo problemas de contaminación probablemente de la propia comunidad.

En la tabla 3 observamos que por el primer metodo de extracción de DNA la cantidad en ng/mL no se obtuvo la cantidad requerida por la Unidad de Proteomica del Instituto de Neurobiologia de la U.N.A.M. (50 ng/μl) para ser mandada a secuenciar, y asi poder verificar que la especie *D. melanogaster* identificada fuera confirmada a través de una bases de datos, por otra parte el segundo metodo existe una mayor concentración, y es mas que suficiente para su posterior secuenciación. Tenemos que tomar en cuenta que en el segundo método se utilizaba mayor cantidad de moscas (~15), y se esperaba que la concentración fuera excesivamente alta como fue en este caso, sin embargo significa un problemaa para unicas subespecies encontradas, donde solo se poseía 1 mosca, y se necesitaba esperar un estado de gestación, en caso de que fuera hembra, para poder obtener una población mayor de esa subespecie. Lo anterior mencionado, fue un factor que impidio la secuenciación de DNA para verificar las subespecies por la falta de tiempo en el proeycto.

Tabla. 3. Concentración y pureza del DNA obtenido con ayuda del equipo Thermo Scientific Nanodrop 2000.

Método	Cantidad (ng/mL)	Relación 260/280
Greg Gloor y William Engels	4.2	2.1
M2	2059.3	1.73

En la figura 1 se muestra los geles de agarosa revelados, algo que hay que destacar es que por el metodo M2 aunque salio una concetración alta de DNA, no se nota una banda clara del gen de interes, esto podría aunarse a la especificidad de los primers o falta de concetración de ellos. Ya que al servir de punto de partida para la replicación de DNA, una concentración menor de primers, y un exceso de DNA, se presento un barrido, que se notaba con menor intensidad, que indicaria DNA que no corresponde al buscado (gen COX1), aunque se hicieron diluciones de DNA en la reacción de PCR con agua, es necesario reformular la cantidad de primers, para lograr una banda clara, como fue en el primer gel (lado izquierdo), realizado por el método de Greg Gloor y William Engels.

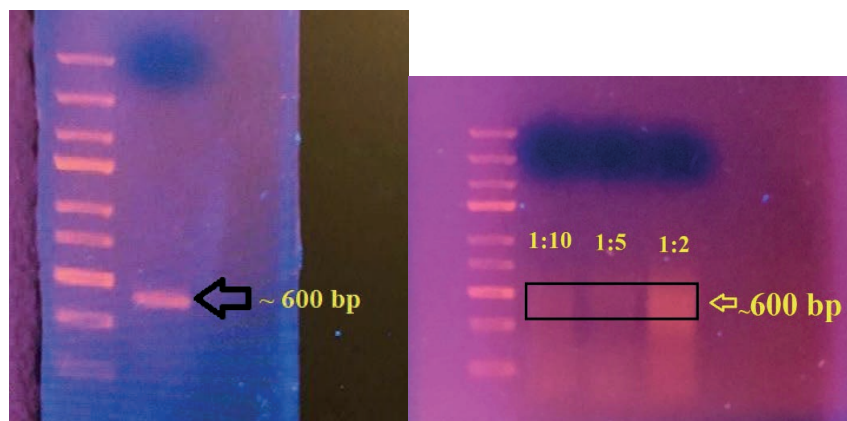


Figura 1. Geles de productos de reamplificación de fragmento CO1 (Izquierda se muestra por el metodo de Greg Gloor Y William Engels, Derecha por método M2)

CONCLUSIONES

El muestreo de poblaciones de especies, en este caso de especies silvestres de *Drosophila* nos da un panorama general sobre los cambios que se presentan en una ciudad, por su urbanización, crecimiento poblacional e industrial, y su comparación en una zona que aún esta en crecimiento como el municipio de Huimilpan. También la presencia de especies invasoras o que sirvan como vector de enfermedades, nos da una idea general, si existe desplazamiento a poblaciones cosmopolitas o silvestres, que en este caso, según la variedad de especies registradas fue mínimo, o del mismo estado sanitario de la zona de recolección. Efectivamente, en un lugar con las características de municipio de Querétaro, predominan especies cosmopolitas como lo es *D. simulans* y *D. melanogaster*. Huimilpan presento mayor diversificación de especies, y esto se ve beneficiado por la poca urbanización e impacto socioindustrial del municipio.

BIBLIOGRAFIA

Libros:

Patterson J, T. Mainland G, B. (1944). The Drosophilidae of Mexico. Texas. The University of Texas Publication.

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.

Artículos de Revista:

AVONDET, J. L., BLAIR, R. B., BERG, D. J., & EBBERT, M. A. (2003). "Drosophila (Diptera:Drosophilidae) response to changes in ecological parameters across an urban gradient. Environmental Entomology", Num.32, [pp.347–358].

COMMAR, L. S., L. G., CERON, C. R., & APARECIDA CARARETO, C. M. (2012). Taxonomic and evolutionary analysis of *Zaprionus indianus* and its colonization of Palearctic and Neotropical regions. Genetics and Molecular Biology, 35 [pp.395–406].

FERREIRA, L. B. TIDON, R. (2005). "Colonizing potential of Drosophilidae (Insecta, Diptera) in environments with different grades of urbanization. Biodiversity & Conservation", 14, [pp. 1809–1821].

GONZÁLEZ E. RAMOS N.M. MASTACHI C.A. AND BECERRIL R. (2004) "Effect of Water Resources in the Queretaro River: Climate Analysis and Other Changes". Chapter 8. 2013 Libros HALBWACHS, M. Los marcos sociales de la memoria, Barcelona: Anthropos Editorial

HEBERT PD, RATNASINGHAM S, DEWAARD JR (2003). "Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species". Proc. Biol. Sci. 270 Suppl 1: S96–9.

HOOPER, D. U., CHAPIN, F. S., EWEL, J. J., HECTOR, A., INCHAUSTI, P., LAVOREL, S. SCHMID, B. (2005). "Effects of biodiversity on ecosystem functioning: a consensus of current knowledge. Ecological monographs", 75,[pp. 3–35].

PARSONS, P. A. (1991). Biodiversity conservation under global climatic change: The insect *Drosophila* as a biological indicator? Global Ecology and Biogeography Letters,1, [pp. 77].

PAUL DN, y col.. (2003). "Biological identifications through DNA barcodes". Proceedings of the Royal Society B. 270: [pp.313–321].

STRICKBERGER, M. W. (1962). "Experiments in genetics with *Drosophila*". New York, NY and London: John Wiley & Sons Inc.

Artículos en Línea:

INEGI 2015 [Monografía en internet]:
<http://www.cuentame.inegi.org.mx/monografias/informacion/queret/poblacion/dinamica.aspx?tema=me&e=22>

CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES Y ESPECIES SILVESTRES DE LA FAMILIA DROSOPHILIDAE DEL CENTRO DE LA REPÚBLICA

Israel Huerta Reséndiz¹ y Juan Riesgo Escovar²

RESUMEN

En el presente documento se ejemplifica la importancia de examinar las relaciones filogenéticas mediante análisis taxonómico y molecular con la amplificación de secuencias de un segmento del gen de la subunidad I de la citocromo c oxidasa (COI) en especies silvestres de *Drosophila* en el estado de Querétaro, lugar que presenta áreas climáticas definidas que varían de semicalidas a templadas, para la colecta de los ejemplares se tomaron en cuenta seis localidades dentro del perímetro que delimita al estado de Querétaro, taxonómicamente se identificaron 9 especies de *Drosophila*, también se logró amplificar la región del gen COI de la especie silvestre *Melanogaster*.

ABSTRACT

The present document exemplifies the importance of examining phylogenetic relationships through taxonomic and molecular analysis with the amplification of sequences of a segment of the cytochrome c oxidase (IOC) subunit I gene in wild *Drosophila* species in the state of Querétaro, Place that presents definite climatic zones that vary from warm to temperate. For the collection of the specimens, six locations were taken within the perimeter that delimits the state of Querétaro, taxonomically 9 species of *Drosophila* were identified, also the area was amplified Of the COI gene of the wild species *Melanogaster*.

Palabras Clave: *Drosophila*, COI, caracterización, especies,

INTRODUCCIÓN

La capacidad de percepción del ser humano ha intentado clasificar e identificar el mundo natural desde sus inicios. En una primera etapa se definió como sería una región del DNA que sería funcional para confeccionar y caracterizar cada organismo viviente como principal característica debe ser corta y lograr un porcentaje elevado de secuencias únicas. Esta región pertenece a un gen mitocondrial el cual codifica para la subunidad I de la enzima citocromo-oxidasa, COI, región alrededor de 648 pares de bases (Ratnasingham y Hebert, 2007). Que es específico para identificar organismos y asociar sus variaciones a características de interés o para estudiar su evolución (Therese, 2005). Esta técnica se ha aplicado en numerosas ocasiones para el estudio de la genética de poblaciones en animales y plantas. La evaluación de este marcador molecular natural es más compleja que la de los caracteres morfológicos que se estudian mediante la taxonomía.

En el presente estudio usamos información de la secuencia de DNA mitocondrial de un segmento de la citocromo oxidasa c subunidad I (COI) gen que sirve para investigar la diferenciación genética en poblaciones de *Drosophila* en una área geográfica específica en este caso en el estado de Querétaro (en diferentes localidades), de las especies obtenidas también se ha examinado las diferencias morfológicas entre cada una de éstas. El objetivo principal del estudio es determinar la caracterización específica de cada una de las especies silvestres encontradas en dicha región mediante la amplificación del gen antes descrito y su posterior estudio y comparación para entender mejor las variaciones genéticas, cambios migratorios, procesos evolutivos y cualquier factor que se relacione directamente con la ubicación de las especies de *Drosophila* en la región centro del país.

MÉTODOS Y MATERIALES

COLECTA DE MUESTRAS

Para la colecta de muestras se utilizaron trampas conformadas por botellas de plástico de 1 a 1.5 litros, adicionando una mezcla homogénea de puré de plátano con levadura y un poco de agua, ambientando el recipiente con ramas para que las moscas no escapen y haciendo cortes como los que se muestran en la siguiente figura

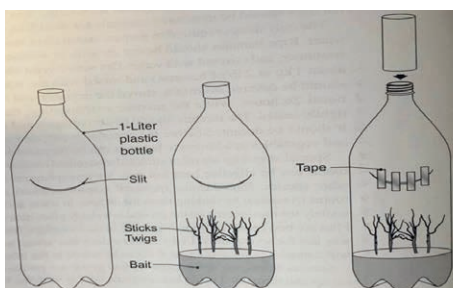


Figura 1. Trampa hecha de una botella de plástico desechada

Las trampas fueron dejadas durante 6 días en localidades específicas del estado de Querétaro:

1. Boulevard Juriquilla 3001, 76230 Santiago de Querétaro, Qro. 20.699976, -100.444321
2. Boulevard Juriquilla 3001, 76230 Santiago de Querétaro, Qro. 20.699739, -100.446701
3. Amealco de Bonfil, Carretera Estatal No. 400, Querétaro 20.315503, -100.234139
4. Amealco de Bonfil, Carretera Estatal No. 400, Querétaro 20.315433, -100.233855
5. Parque Nacional El Cimatario, Querétaro 20.534647, -100.340643
6. San Pedro Huimilpan, Querétaro 20.310079, -100.280458

Para la identificación de las moscas mediante taxonomía tradicional, se utilizó el manual de Caracterización de Especies de *Drosophila* del libro *Drosophila: A guide to species identification and use*.

EXTRACCIÓN DE DNA

La obtención del DNA total genómico se extrajo de muestras de tejido mediante dos protocolos, el primero es uno convencional y rápido Single Fly Genomic DNA Prep y el segundo más elaborado y concreto Quick Fly DNA Preparation, después se midieron los parámetros establecidos en un equipo NanoDrop™

ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS

La reacción en cadena de polimerasa (PCR) se usó para la amplificación de un segmento del gen COI, también conocido como segmento de código de barras de COI (Ratnasingham y Hebert, 2007), utilizando los pares de primers Forward: 2640 y Reverse 3041 con condiciones de ensayo específicas descritas a continuación

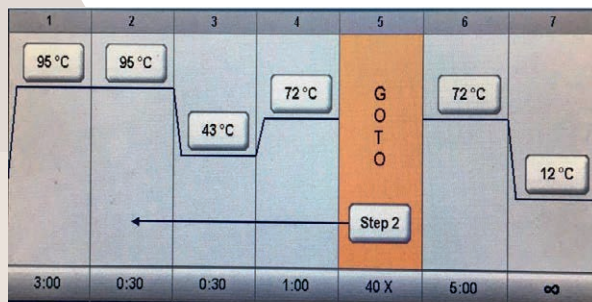


Figura 1. Condiciones específicas para la reacción en cadena de la polimerasa

PCR Mix de 20 µl	
Buffer de reacción	2 µl
MgCl	1 µl
dNTPs	0.5 µl
DNA	2 µl
Agua	12.25 µl
TaqPol	0.25 µl
Primer Reverse	1 µl
Primer Forward	1 µl

Tabla. 1. Componentes de la preparación para la reacción de pcr.

Para el análisis de la integridad del DNA los productos de la reacción de pcr fueron cargados a un gel de agarosa al 1% adicionándoles un buffer de carga para su posterior identificación, tomando como referencia el marcador de peso molecular estándar para regiones entre 100 y 1000 pb.

Una vez identificada la banda referente a la región esperada de 648 pb correspondiente al gen MIT-COI ésta se purificó con el kit Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit, después se reamplificó bajo las mismas condiciones antes mencionadas en la figura 1.

RESULTADOS

Tabla. 2. Registro de la colecta de ejemplares en las 6 locaciones específicas del estudio.

Especie	Locación						Total de ejemplares
	1	2	3	4	5	6	
<i>Drosophila Mulleri</i>				4			4
<i>Drosophila Mercatorum</i>	2	1	2	2			7
<i>Drosophila Mojavensis</i>				1	2	1	4
<i>Drosophila Victoria</i>			2	4			6
<i>Drosophila Ritae</i>			2		5		7
<i>Drosophila Busckii</i>				4			4
<i>Drosophila Zaprionus</i>		3					3
<i>Drosophila Melanogaster</i>	10	14	3	3	9	4	42
<i>Drosophila simulans</i>	4	6	10	12	5	15	42
Total por locación							
	16	24	22	30	21	20	

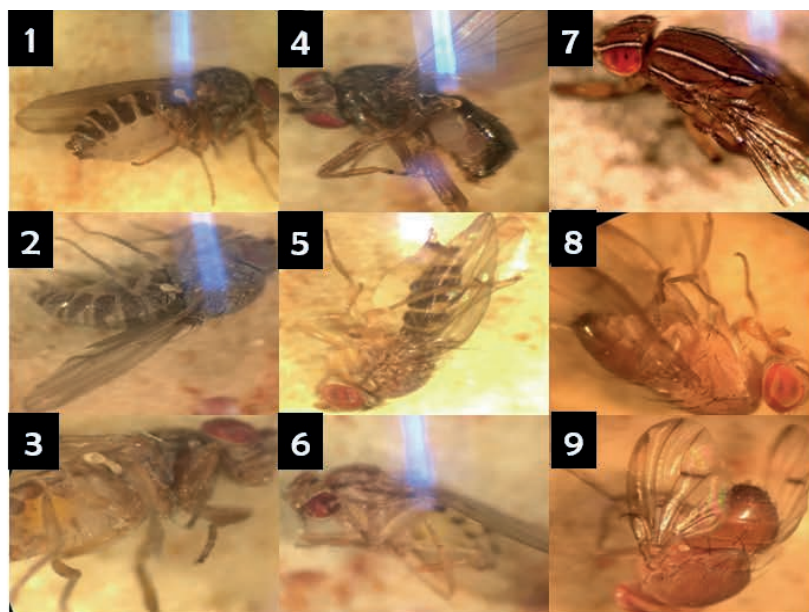


Figura 2. Especies de *Drosophila* silvestres colectadas en la región centro de la república; 1) *Drosophila Mulleri* 2) *Drosophila Mercatorum* 3) *Drosophila Mojavensis* 4) *Drosophila Victoria* 5) *Drosophila Rita* 6) *Drosophila Busckii* 7) *Drosophila Zaprionus* 8) *Drosophila Melanogaster* 9) *Drosophila Simulans*.

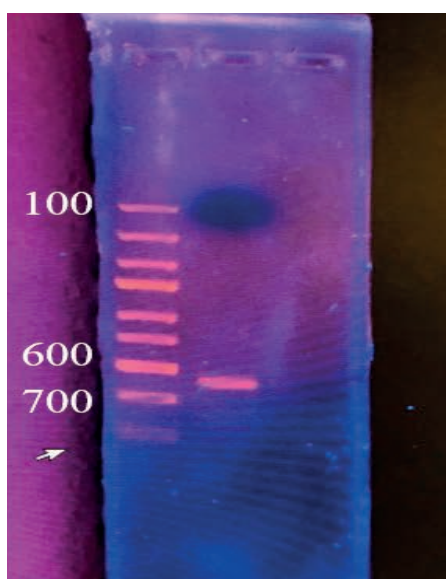


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 1% que muestra la banda del gen mitocondrial CO1 el cual codifica para la subunidad 1 de la enzima citocromo-oxidas, región alrededor de 648 pares de bases.

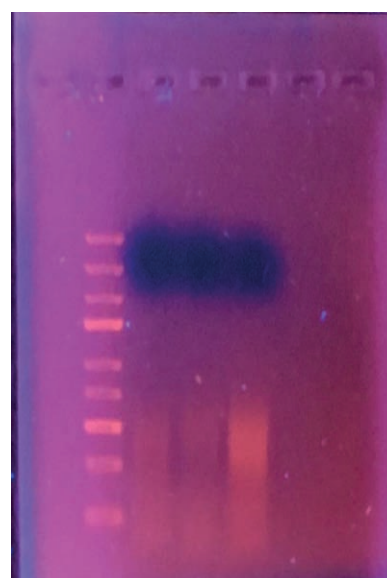


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1% con los productos reamplificados de pcr a diferentes diluciones: Carril 1; 1:10, Carril 2; 1:5, Carril 3; 1:2

En la figura 3 se muestra el gel de electroforesis del producto de la amplificación del gen MIT-COI que permite identificar la región de interés mostrada aproximadamente de 648 pares de bases, lo que conlleva al establecimiento de la caracterización deseada. La banda se puede apreciar de manera inmediata debido a la efectividad del protocolo de extracción de DNA Single Fly Genomic DNA Prep

En la figura 4 se muestran 3 carriles con las mismas condiciones de electroforesis descritas en la metodología, en este caso se utilizó el protocolo Quick Fly DNA Preparation, pero se amplificaron previamente es decir las mostradas son de las reamplificaciones con concentraciones 1:10, 1:5 y 1:2 se puede

CONCLUSIONES

La implicación biológica de la caracterización de especies nos ayuda a comprender mejor la relación que existe entre organismos de diferente locación de desarrollo, la identificación de cada patrón secuencial o filogenético establece la importancia del entendimiento del comportamiento de diferentes especies silvestres, se logró identificar la región del gen de interés y también las diferencias morfológicas que existen entre ellas, sin embargo por la duración de la estancia no se logró secuenciar dicha región en específico.



Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R. (1994). "DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates". *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 3: 294–299

Ratnasingham S, Hebert. 2007. The Barcode of Life Data System. *Molecular Ecology*. 7: 355–364.

RESTAURACIÓN ECOLÓGICA DEL BOSQUE MESÓFILO DE MONTAÑA EN XILITLA UTILIZANDO UN MÉTODO DE TRANSLOCACIÓN DE ESPECIES

Lizeth Harzbecher de la Vega¹ y Jorge A. Flores Cano²

RESUMEN

Xilitla, S.L.P. cuenta con una extensión considerable de bosque mesófilo de montaña, que como otras zonas con bosque mesófilo de montaña (BMM), se encuentra fragmentado o en un estado de degradación importante. Es en estos casos cuando se deben aplicar métodos de restauración ecológica, con el fin de revertir los distintos niveles de perturbación antrópica sobre los ecosistemas. Se realizó un trabajo de restauración por medio de la translocación de especies arbóreas en una parcela con alrededor de 5 años de recuperación, para acelerar el proceso sucesional del bosque y evitar futuros daños al ecosistema ocasionados por factores ambientales y humanos. Se realizaron mediciones periódicas durante un año para evaluar la supervivencia y crecimiento de las plantas utilizadas, las cuales continuarán por los siguientes dos años. Al realizar trabajos de este tipo, es fundamental contar con la participación de los usuarios, o de lo contrario el éxito del proyecto podría verse comprometido.

ABSTRACT

Xilitla, S.L.P., has a considerable extent of montane rain forest, which like other areas with this vegetation type, is fragmented in a state of significant degradation to reverse the different levels of anthropic disturbance on ecosystems. An ecological restoration process was carried out by means of the translocation of tree species in a plot with about 5 years of recovery, to accelerate the successional process of the forest and to avoid future damages to the ecosystem caused by the environmental and human factors. Constant measurements were performed for one year to evaluate the survival and growth of the plants were used to reforest the plot, which continued for the next few years. When carrying out works of this type, it is essential to have the participation of the commoners, or else the success of the project could be compromised.

Palabras Clave: Restauración ecológica, bosque de niebla, Sucesión ecológica, Xilitla

INTRODUCCIÓN

La problemática ambiental actual tiene un trasfondo político y cultural, que desemboca en la destrucción de los ecosistemas. La pérdida constante de la identidad cultural y el desconocimiento de los procesos ecológicos, conllevan al desmantelamiento progresivo de los ecosistemas, a la explotación de los bosques, a un consumo no sustentable de los recursos naturales. Para contrarrestar este daño a los ecosistemas se han planteado diversas maneras de abordar el problema. Entre ellas, se encuentra la 'Restauración ecológica', la cual, de acuerdo con Higgs (1997) busca recuperar la estructura y función de los ecosistemas, englobando la diversidad y riqueza de especies, así como la diversidad genética y sus interrelaciones.

La base teórica en la que se basa la restauración es la 'sucesión ecológica'. Dicha teoría dicta que los ecosistemas que han sido degradados de alguna forma naturalmente llevan a cabo un proceso de recuperación de su composición y estructura, para volver a su estado original (Martínez-Romero, 1996).

¹ Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Ciencias Naturales; Avenida de las Ciencias s/n, Juriquilla, 76230, Santiago de Querétaro, Qro. lizetharzbecher@gmail.com

² Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Recursos Forestales, Facultad de Agronomía y Veterinaria; Carretera San Luis - Matehuala Km. 14.5, Ejido Palma de la Cruz, 78321, Soledad de Graciano Sánchez, S.L.P. jfcano.uaslp@gmail.com

México se encuentra inmerso en la problemática del desarrollo con escasas muestras de sustentabilidad, es por esto por lo que se han comenzado a desarrollar proyectos de restauración en gran cantidad de ecosistemas y localidades con valor ecológico y cultural importante. Ejemplo de ello es el ecosistema de bosque mesófilo de montaña (BMM). Considerados ecosistemas relictuales, debido a que se ubican en condiciones biogeográficas muy particulares, generalmente se localizan en altitudes que van de 800 a 2,000 msnm, con climas templados muy húmedos (CONABIO, 2010). A esta formación se le confiere la biodiversidad más alta por unidad de superficie, calculando que posee alrededor de 13% de endemismo (Challenger y Soberón, 2008).

Los BMM están expuestos a un nivel de disturbio bastante alto debido a su gran atractivo para dedicarlos a actividades agrícolas, pecuarias de pastoreo extensivo y explotación forestal comercial. Estos ecosistemas suelen encontrarse en sitios con fuertes pendientes y suelos someros y pedregosos, lo que aumenta el riesgo de erosión (INEGI, 2002; Salinas-Rodríguez, 2011).

Los enfoques que respaldan la conservación de la biodiversidad se efectúan eliminando las presiones que sufren los ecosistemas naturales o ampliando las zonas naturales, por eso se consideran seis mecanismos de restauración ecológica (Gálvez, 2002): Sucesión secundaria, Reforestación, Introducción de especies, Reintroducción de especies, Translocación y Corredores biológicos.

En San Luis Potosí se encuentra la Región Prioritaria para la Conservación de Xilitla, que incluye ecosistemas de bosque templado y bosque mesófilo de montaña, que como muchos otros relictos de este tipo de vegetación, sufre los efectos de la degradación del ecosistema por la actividad humana. Debido a esta problemática, en 2016 se comenzó un proyecto de restauración ecológica del bosque en la comunidad de La Silleta. En una parcela de uso agrícola de 0.5 ha, la cual fue aprovechada desde 1967 y tiene entre 5 y 8 años de abandono, se empleó un método de reforestación por translocación de especies. Para valorar el éxito del proyecto se evaluará el crecimiento y supervivencia de las especies arbóreas utilizadas en la restauración del bosque mesófilo por medio de mediciones periódicas de dichos individuos.

METODOLOGÍA

El área de estudio se encuentra ubicada en la Comunidad de La Silleta, en el Ejido Coronel José Castillo. En este sitio se realizó un trabajo previo para conocer la biodiversidad del ecosistema e identificar la composición florística del bosque.

Se trazaron tres curvas de nivel, en las cuales se realizaron las translocaciones de las especies que se consideraron las principales del ecosistema; estas fueron: *Abies guatemalensis* Rehder, *Podocarpus reichei* J. Buchholz & N.E. Gray y *Quercus xalapensis* Bonpl.; *Quercus germana* Schltdl. & Cham. y *Magnolia schiedeana* Schltdl. se obtuvieron de producción en invernadero.

Las especies se sembraron con el acomodo mostrado en la Figura 1. Los individuos del centro se eligieron como especies pioneras en el proceso sucesional, de modo que desempeñaran un papel de nodrizas para las especies de alrededor. Las plantas se sembraron a 30 cm del árbol central; cada diseño se colocó a dos metros de separación dentro de las curvas de nivel. En total se translocaron 30 plantas, distribuidas en las tres curvas de nivel.

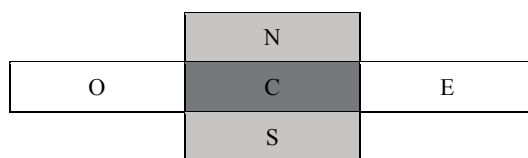


Figura 1. Acomodo espacial de las especies forestales empleadas en el estudio. Las letras corresponden a los puntos cardinales: N, norte; S, sur; E, este; O, oeste; C, centro.

Se evaluó la supervivencia y el crecimiento, midiendo la altura, cobertura del dosel (longitud y amplitud) y diámetro del tallo a 5 cm del suelo, en el caso de los árboles de menos de 1 m de altura, en los árboles más altos el diámetro se midió a los 30 cm del sustrato. Se empleó una cinta métrica de 5 m y un vernier digital. Las coordenadas geográficas se tomaron utilizando un GPS.

La cobertura del dosel se obtuvo utilizando los valores de longitud y amplitud de dosel y aplicando la fórmula para obtener el área de una elipse:

$$A = \pi \times r \times s$$

Se eligió una muestra de 6 plantas translocadas, con dos representantes de cada especie en la misma curva de nivel (franja). En la franja 1 se midieron las plantas número 3 y 6, correspondiendo a la especie *Podocarpus reichei*. En la franja 2 se midió la planta 10 y la 13 de *Quercus xalapensis*. En la curva 3, las plantas medidas correspondieron a las 23 y 29 de *Abies guatemalensis*. En cada caso, el acomodo de las especies de alrededor correspondía al que se muestra en la figura 2, alternando la posición de *M. schiedeana* y *Q. germana*, respecto a la especie central.

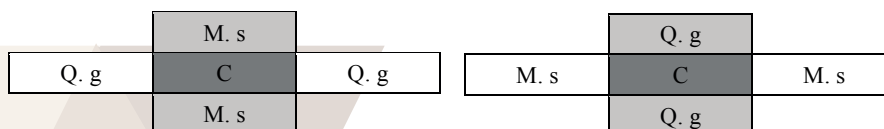


Figura 2. Los dos diferentes tipos de acomodo de las especies de la cruz externa. A la izquierda se muestra el diseño con los individuos de *Magnolia schiedeana* (M.s) en orientación norte-sur, y *Quercus germana* (Q.g) con orientación este-oeste. En el diseño de la derecha se invierte la orientación de las especies, respecto a la planta central (C), la cual pudo ser *Q. xalapensis*, *P. reichei* o *A. guatemalensis*.

RESULTADOS

La especie dominante en la vegetación de la parcela fue *Liquidambar styraciflua*, con individuos de alrededor de 15m, con gran densidad poblacional.

El porcentaje de supervivencia de especies durante el primer año se muestra en la Tabla 1. En general, el translocamiento no fue una buena opción de reforestación, ya que la mayoría de las plantas murieron si se les aplicó esta técnica. Con *Podocarpus reichei*, ambas plantas murieron al poco tiempo de ser sembradas; *A. guatemalensis* obtuvo un 50% de supervivencia y *Q. xalapensis* el 100%. El número de muestra (n) para estas especies fue de dos individuos. Las especies traídas de invernadero obtuvieron valores de 100% para *M. schiedeana* y 75% para *Q. germana* (n= 12).

Tabla 1. Valores de porcentaje de supervivencia de las especies utilizadas en la reforestación de la parcela a un año de su siembra.

Especie	% Supervivencia
Translocadas	
<i>Podocarpus reichei</i>	0
<i>Quercus xalapensis</i>	100
<i>Abies guatemalensis</i>	50
De invernadero	
<i>Quercus germana</i>	75
<i>Magnolia schiedeana</i>	100

Las plantas que murieron a lo largo del año se reemplazaron con nuevos ejemplares, para continuar con el proyecto, sin embargo, no se consideraron para la evaluación de los datos en este trabajo.

El crecimiento se evaluó por medio de las medias obtenidas con los datos de mediciones anteriores realizadas en los meses de abril, julio y octubre de 2016, y los datos actuales, obtenidos en julio de 2017 (mediciones 1, 2, 3 y 4, respectivamente). Se consideraron tres variables: altura, diámetro a la altura del pecho (DAP) y cobertura del dosel (figuras 3, 4 y 5).

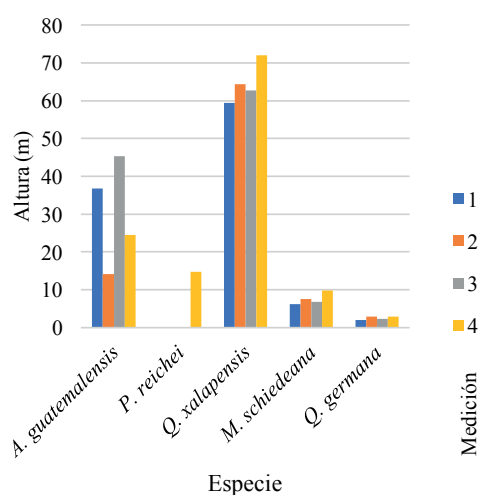


Figura 3. Datos de altura promedio de las especies utilizadas, en las cuatro mediciones realizadas en un año.

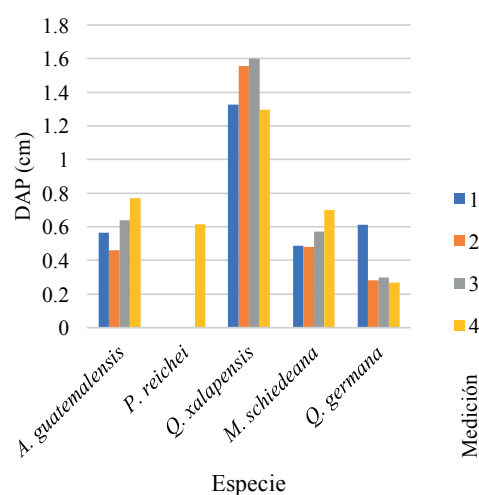


Figura 4. Promedio del diámetro del tallo de las especies utilizadas, en las cuatro mediciones realizadas en un año.

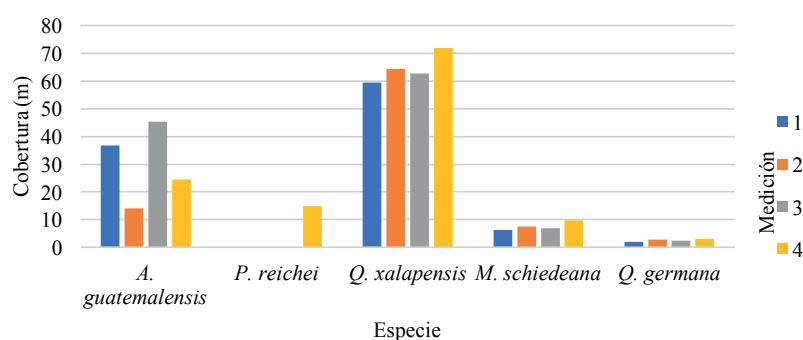


Figura 5. Datos promedio de cobertura del dosel las cinco especies utilizadas, de acuerdo con las cuatro mediciones realizadas en un año.

El tamaño de muestra para las especies translocadas fue muy reducido debido a la dificultad que suponía la medición de todos los individuos relacionados con la planta central, sin embargo, esto mismo ocasionó que los valores de supervivencia y crecimiento se vieran afectados, al sólo considerar dos individuos como el 100%.

Los valores de altura y diámetro no siguen un patrón de crecimiento debido al sesgo existente por la toma de datos al haber sido medidas por diferentes personas en las cuatro ocasiones. En el caso de la cobertura, este comportamiento

de los datos se puede atribuir a que la planta pierde las hojas por temporadas, sin embargo, este fenómeno sólo ocurrió en *A. guatemalensis*.

En general, se observó una curva de crecimiento en la mayoría de las especies, descartando a *P. reichei* y *A. guatemalensis* cuyos datos no corresponden a ciclos de crecimiento normal. La variación de los datos promedio de diámetro de tallos, podría atribuirse al sesgo en la toma de datos, más que a un evento propio de la planta

CONCLUSIONES

Establecer la metodología para un proyecto de restauración ecológica exitoso, es algo complicado. Al involucrar diversos factores, tanto bióticos como abióticos y sus interacciones, los métodos se hacen más complejos y es fácil que algo se pase por alto. Al colocar a los árboles de la cruz externa tan cerca del árbol central, se propició un ambiente de competencia entre los individuos, por lo que es casi seguro que la mayoría de ellos morirán cuando la batalla por los recursos disponibles se intensifique. Sin embargo, esta experiencia sirve como base para poder establecer nuevos diseños experimentales y asegurar el establecimiento y supervivencia de las plantas utilizadas para la reforestación.

Este tipo de proyectos es de gran importancia, sobre todo en la región donde se realizó el actual, al ser una zona tan vulnerable en cuanto al cuidado de la vegetación, ya sea por las prácticas agrícolas tradicionales realizadas en áreas con grandes inclinaciones, lo que facilita la rápida degradación de los suelos y dificulta la posterior sucesión vegetal; o bien, por el aprovechamiento forestal maderable que se les da a los ecosistemas boscosos del lugar.

La restauración ecológica es una herramienta que, bien aplicada, podría contrarrestar de manera eficaz el daño que el hombre ha hecho en los ecosistemas, sin los contras que otras prácticas antes aplicadas significaban.

BIBLIOGRAFÍA

Challenger, A., y J. Soberón. (2008). Los ecosistemas terrestres, en Capital natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. Conabio, México, pp. 87-108.

CONANP. (2014). Programa de Manejo Reserva de la Biosfera Sierra del Abra Tanchipa. México: CONANP.

Higgs, E. S. (1997). What is Good Ecological Restoration? Conservation Biology, 11(2), 338-348.

Martínez-Romero, E. (1996). La restauración ecológica. Ciencias, 43, 56-61. Retrieved from <http://www.revistaciencias.unam.mx/images/stories/Articles/43/CNS04307.pdf>

Salinas-Rodríguez, M.M. y J. Cruzado-Cortés. (2011). Nota sobre un fragmento de bosque mesófilo de montaña del municipio de Río Verde, San Luis Potosí. Boletín de la Sociedad Botánica de México 89: 126-128.

"Efecto de la administración intracerebroventricular de LPS en la producción de oligómeros de A β en ratón C57BL/6J"

Luis Felipe Delgado Sánchez¹ y Díaz Miranda Sofia Yolanda²

Resumen

β -amiloide (A β) es un péptido de una secuencia proteica primaria de 40 - 43 aminoácidos y está asociada con el desarrollo de ciertas enfermedades como la enfermedad de Alzheimer (EA). Hallazgos recientes sugieren que A β es un péptido antimicrobiano (AMP) que puede funcionar normalmente en el sistema inmune innato. Por lo tanto el presente estudio tuvo como objetivo determinar el efecto en la expresión de A β posterior a una administración intracerebroventricular de LPS y evaluar los cambios morfológicos de la microglía en hipocampo y corteza respectivamente. Se inyectaron, en ventrículo encefálico, un total de 4 ratones C57BL/6J de 12 meses (2 con LPS 2mg/mL a 2 μ L/min. Y 2 ratones con NaCl 0.9% a 2 μ L/min.). Fueron sacrificados 24 horas después de la cirugía y fueron perfundidos para recuperar el cerebro. El lóbulo izquierdo se utilizó para determinación de proteína y péptidos A β por el método de Bradford. Posteriormente se cuantificaron los niveles de expresión de A β ₄₀ y oligómeros de A β ₄₀₋₄₂ utilizando la técnica de Dotblot por fluorescencia y el software Image J. El lóbulo derecho se utilizó para el estudio morfológico de microglía mediante inmunohistoquímica de fluorescencia. Los niveles de A β ₄₀₋₄₂ del grupo suministrado con LPS resultaron ir a la baja en comparación con el grupo control tanto en corteza como en hipocampo. En cuanto a la inmunohistoquímica para detectar cambios morfológicos de microglía en hipocampo no se encontraron diferencias significativas. El efecto de la inyección intracerebroventricular de LPS en ratones de 12 meses después de 24 horas presenta una expresión disminuida de oligómeros de A β posiblemente por una acción rápida del sistema inmune innato.

ABSTRACT

β -amyloid (a β) is a peptide of a primary protein sequence of 40-43 amino acids and is associated with the development of certain diseases such as alzheimer's disease (AD). recent findings suggest that a β is an antimicrobial peptide (amp) that can function normally in the innate immune system. therefore the present study aimed to determine the effect on A β expression following an intracerebroventricular delivery of lps and to evaluate the morphological changes of microglia in hippocampus and cortex respectively. a total of 4 12-month c57bl / 6j mice (2 with lps 2mg / ml at 2 μ l / min and 2 mice with nacl 0.9% at 2 μ l / min) were injected into the brain ventricle. they were sacrificed 24 hours after surgery and were perfused to recover the brain. the left lobe was used for determination of A β protein and peptides by the bradford method. subsequently, the expression levels of A β ₄₀ and A β ₄₀₋₄₂ oligomers were quantified using the fluorescence dotblot technique and image j. the right lobe was used for the microglia morphological study by fluorescence immunohistochemistry. levels of A β ₄₀₋₄₂ from the lps-supplied group were found to be lower compared to the control group in both cortex and hippocampus. as for the immunohistochemistry to detect microglia morphological changes in the hippocampus, no significant differences were found. the effect of intracerebroventricular injection of lps in mice at 12 months after 24 hours presents a decreased expression of A β oligomers possibly by a rapid action of the innate immune system.

Palabras Clave: β -amiloide, lipopolisacárido, microglía, dotblot, inmunohistoquímica

INTRODUCCIÓN

β -amiloide (A β) es un péptido de peso molecular de 4 kDa y una secuencia proteica primaria de 40 - 43 aminoácidos. Siendo la forma A β ₄₀ la más común y la forma A β ₄₂ más fibrogénica y por lo tanto está asociada con el desarrollo de ciertas enfermedades como la enfermedad de Alzheimer (EA). Hallazgos recientes sugieren que el A β es un péptido antimicrobiano (AMP) que puede funcionar normalmente en el sistema inmune innato y que está en marcado contraste con los modelos actuales de patología mediada por A β . Activando receptores de inmunidad innata como TLR-4, TLR- 2 y (N-metil-D-aspartato) [1]. Al formar poros en las membranas bacterianas formadas por lipopolisacárido y al formar aglomeraciones alrededor de las bacterias para evitar su avance y crecimiento además de fagocitar como ayuda a la fagocitosis de estas [2].

Se ha sugerido que TLR4 en astrocitos podría desempeñar un papel importante en la inflamación y la formación de A β . El lipopolisacárido es un componente mayoritario de la membrana externa de las bacterias Gram negativas. Es un estimulante del sistema inmune innato [3]. La estimulación de TLR4 facilita la activación de una vía que involucra una fase temprana de activación de NF- κ B, la cual conduce a la producción de citoquinas inflamatorias y la formación de oligómeros de A β [4]. Recientemente se estudió de manera in vivo, en monos marmosetas la aceleración de la amiloidosis por inflamación provocada por inyecciones periódicas de LPS de manera intraperitoneal por 3 y 7 días. Encontrando que el nivel de expresión de A β depende de la edad de los ratones y el tiempo de la administración de LPS. Destacando además la formación de placas de A β , características de la EA, pero nunca desarrollaron la enfermedad [5]. La expresión de B-amiloide disminuirá por efecto de la administración intracerebroventricular de LPS a las 24 de cirugía horas en ratones de 12 meses por una rápida acción del sistema inmune innato. Por lo tanto el presente estudio tuvo como objetivo determinar el efecto en la expresión de A β posterior a una administración intracerebroventricular de LPS y evaluar los cambios morfológicos de la microglía en hipocampo y corteza respectivamente

MÉTODOS Y MATERIALES

Cirugía:

Se llevó a cabo una cirugía estereotaxica usando isoflurano como agente anestésico primeramente a 4 lb/in² para el adormecimiento del ratón y durante la cirugía se mantuvo constante a 1.5 lb/in². Se utilizaron las coordenadas para ubicar ventrículo cefalorraquídeo A-P BREGMA -0,22mm,-0,30mm M-L +/- 1mm D-V -2,5mm. Se inyectaron un total de 4 ratones, 2 con una solución de LPS 2 mg/ml y 2 con NaCl al 0.9% ambos a una velocidad de flujo de 2 ul/min. Una vez terminada la cirugía se suturó y se aplicaron 2 ul de ketorolaco. Se mantuvo a los ratones en condiciones de ciclo invertido y alimentación ad libitum durante 24 horas.

Perfusión:

Cumplidas las 24 horas posteriores a la cirugía se procedió a sacrificar los ratones y a perfundirlos con paraformaldehído. Se recuperó los cerebros y se separaron los lóbulos, el lóbulo derecho se utilizó para pruebas histológicas y se mantuvo en una solución de sacarosa al 30% mientras que el lóbulo izquierdo se utilizó para la determinación de proteína, se recuperaron el hipocampo y corteza que se conservaron mediante la técnica de flashfrozen.

Determinación de oligómeros de A β ₄₀₋₄₂ por Dotblot de fluorescencia:

Se tomó 1ul de cada una de las muestras, hipocampo y corteza, y se colocó por duplicado un punto sobre una membrana de nitrocelulosa respectivamente, Además se colocó 1ul de BSA como control negativo. Se bañó toda la membrana con 10 mL de leche para evitar uniones inespecíficas y se dejó agitando durante 30 min. . Se hicieron tres lavados con PBS 1M de 10 min. cada uno y se procedió a incubar la membrana con las muestras con el anticuerpo primario durante 1 hora. Se lavó 3 veces con PBS 1M durante 10 min. Cada una. Se hicieron 3 lavados de 10 min cada uno con PBS 1M. Se añadió el anticuerpo secundario (A11 y A β 40) y se dejó incubando 3 horas en agitación. Se agregó el reactivo A+B y se agito suavemente por 30 min. Se añadió el FITC y se agito durante 15 min. se colocó la membrana entre dos acetato y se reveló en un scanner de fluorescencia Storm a 562 nm. Se analizaron los datos con el software Image J.

Inmunohistoquímica de fluorescencia amplificada

Se cortaron las hemisferios derechos de los cerebros que permanecían en solución de sacarosa al 30% en un criostato con un tamaño de 50 micras entre cada corte en series de 6 cortes cada una y se colocaron en PBS con azida de sodio 1M. Se eligieron los cortes que mostraran la zona hipocampal de manera clara. Se procedió a realizar una inmunohistoquímica por fluorescencia. Entre cada paso se realizaron 3 lavados de cinco minutos cada uno con PBS 1M. Se dejó en buffer de citratos por 20 min. a 100 °C para exponer los epítopes. Se incubó el anticuerpo primario con los tejidos durante una hora. Se hicieron 3 lavados con PBS 1M de 5 minutos cada uno. Se incubó toda la noche con el anticuerpo primario y con buffer de bloqueo TSA. Se agregó el anticuerpo secundario (Iba-1) y se dejó incubando una hora y media. Se añadió el reactivo A+B durante 15 min. Se procedió a poner el reactivo de amplificación FITC en una concentración (1:1000) por 10 min. Una vez transcurrido el tiempo se dejaron los tejidos en solución DAPI hasta que se tornaran de una coloración café. Por último se montaron en un portaobjetos y se fijaron con glicina con PBS 50:50 para proteger los tejidos, se cubrieron con un cubreobjetos y se sellaron con esmalte. Se visualizaron en un microscopio de fluorescencia.

RESULTADOS

Para la concentración total de oligómeros A β ₄₀₋₄₂ por Dotbot se obtuvieron los promedios para cada membrana de Dotblot (hipocampo y corteza) y cada uno de los anticuerpos (A11 y A β 40) y se graficaron. Se puede observar que en el caso de A11 (que detecta oligómeros de A β ₄₀₋₄₂) fue menor el promedio para las muestras de ratones inyectados con LPS tanto en hipocampo como corteza como se muestra en la figura 1 y 2, sin embargo la diferencia no es significativa.

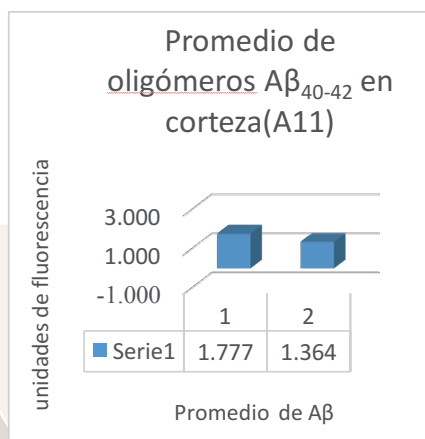


Fig. 1. Promedio de las concentraciones de oligómeros A β ₄₀₋₄₂ en corteza siendo la marcada 1 el análisis de la suministración con NaCl y 2 con LPS. Puede verse una disminución de A β en LPS

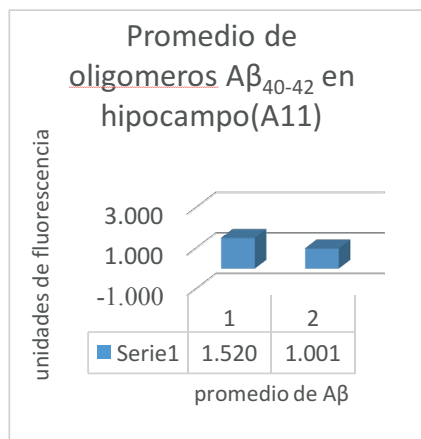


Fig. 2. Promedio de las concentraciones de oligómeros A β ₄₀₋₄₂ en hipocampo siendo la marcada 1 el análisis de la suministración con NaCl y 2 con LPS. Puede verse una disminución de A β en LPS

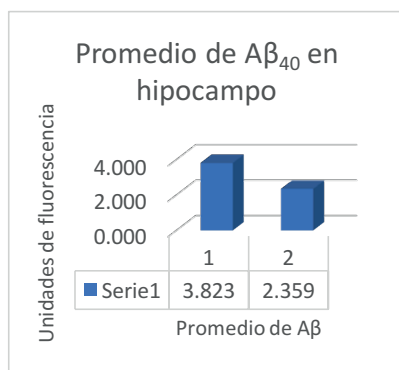


Fig. 3. Promedio de las concentraciones de oligómeros $A\beta_{40}$ en hipocampo siendo la marcada 1 el análisis de la suministración con NaCl y 2 con LPS. Puede verse una disminución de $A\beta$ en LPS

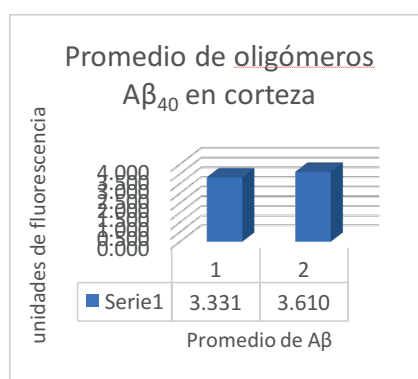


Fig. 4. Promedio de las concentraciones de oligómeros $A\beta_{40-42}$ en corteza siendo la marcada 1 el análisis de la suministración con NaCl y 2 con LPS. Puede verse una concentración mayor de $A\beta$ en LPS pero sin llegar a ser significativa la diferencia.

De igual manera para el ensayo con $A\beta_{40}$ no se encuentran diferencias significativas entre los promedios de las muestras de ratones control y con LPS como puede observarse en la figura 3 y 4. Destaca que el promedio de concentración de $A\beta_{40}$ en corteza fuera mayor por parte de las muestras de ratones inyectados con LPS, en contra parte la concentración de $A\beta_{40}$ en hipocampo se comportó igual que en el ensayo con A11 siendo mayor la de la muestra de ratones control a la de los inyectados con LPS.

En comparación por zonas es importante destacar que las concentraciones de oligómeros de $A\beta$ tanto para $A\beta_{40-42}$ y $A\beta_{40}$ se ven claramente aumentadas en hipocampo como corteza para los dos sujetos (NaCl y LPS) observando un aumento en hipocampo de 2.15 veces para los ratones control y de 1.72 veces para los ratones con LPS mientras que el aumento en corteza fue de 2.19 veces para los ratones con NaCl y de 3.60 veces para ratones inyectado con LPS.

En cuanto a las pruebas histológicas, la inmunohistoquímica realizada con iba-1 marco eficazmente las microglías de los sujetos. Como se muestran en las Figuras 5 y 6 no se es posible encontrar diferencias significativas entre ambas muestras. Por otro lado se puede visualizar que las microglías se encuentran sin daño en ambos casos. El análisis informático permitió obtener datos acerca del área de las microglías con el que al calcular su promedio se pudo hacer una comparación más acertada en la que se puede comprobar lo observado por la microscopia de fluorescencia, las microglías no sufrieron un cambio conformacional importante en ninguno de los casos de experimentación.

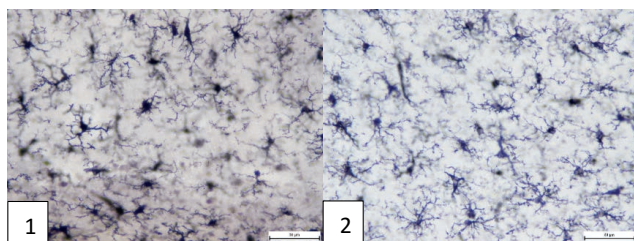


Fig. 5. Imagen de microglía en hipocampo (Cy1) marcados con Iba-1 siendo 1 corte de cerebro de ratón suministrado con NaCl y 2 con LPS se puede ver que no hay daño y que no hay una diferencia entre estas.

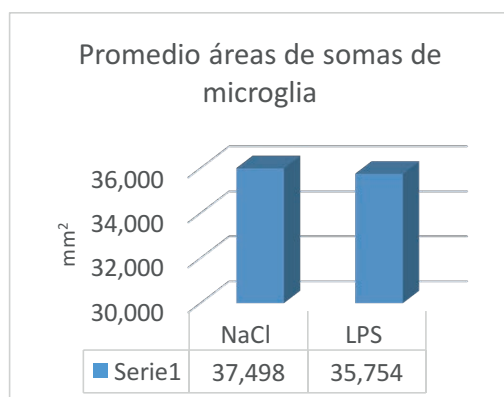


Fig. 6. Promedio de las áreas de los somas de las microglías, puede verse como no hay una variación en los somas lo que comprueba que no hay daño en ellos ni una diferencia por la suministración de LPS.

¹Universidad Autónoma Querétaro, Qro, felipe@unam.mx

²Universidad Nacional Autónoma de México, Santiago de Querétaro, Qro. yoldi@unam.mx

³Las Campanas, 76010 Santiago de Querétaro, Qro.
⁴Boulevard Juriquilla 3001, 76230 Santiago de Querétaro, Qro.

Primeramente es necesario resaltar en los resultados la presencia de A β en ambos casos ya que como se nos menciona en los artículos de cerejeira [6] y Zhu Bin [7] la inflamación del cerebro podría desencadenar una respuesta inflamatoria la cual desencadenaría en la producción de A β . De igual forma se puede decir que la respuesta inflamatoria pudo ser mediada por el TLR-4 como nos menciona Chang yin siendo el activador de una respuesta inmune innata.

No es posible decir que la concentración de A β en ratones inyectados con LPS sea menor por un bajo efecto del inmunogeno si no que se puede decir que viene en un sentido decreciente. De acuerdo a lo que nos mencionan Chang yin [8] la capacidad de respuesta inmune en los ratones va en deterioro con respecto a su edad. Es necesario la evaluación de la concentración de A β a diferentes tiempos de exposición al inmunogeno y también a una exposición secuencial durante diferentes tiempos de experimentación para poder tener un panorama más amplio de la actividad de A β en ratones correspondientes a esta edad.

Por último se demostró que en ratones de 12 meses la exposición intracerebroventricular con LPS después de 24 horas de la administración reduce la concentración de A β .

BIBLIOGRAFIA

- [1] Gong C. (2014) "The role of Toll-like receptor 4 in inflammation and A β formation in cortex astrocytes." en *Acta Physiologica*, Núm 66, Enero-Diciembre, [pp. 631-638].
- [2] Cerejeira J. (2010). "The neuroinflammatory hypothesis of delirium", en *Acta Neuropathol*, Núm. 119, [pp. 737-754]
- [3] Soscia J. (2010) "the Alzheimer's Disease-Associated Amyloid B-Protein is an antimicrobial peptide, en *Plos One*, Núm. 3, Vol 5, Marzo
- [4] ZHU BIN (2013) "Chronic lipopolysaccharide exposure induces cognitive dysfunction without affecting BDNF expression in the rat hippocampus" en *EXPERIMENTAL AND THERAPEUTIC MEDICINE*, Núm 7, [pp. 750-754]
- [5] Woong Jae (2008) "Neuro-inflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment through enhancement of beta-amyloid generation" en *Journal of Neuroinflammation* Núm. 5, Vol 37.
- [6] Kagan Bruce (2012) "Antimicrobial Properties of Amyloid Peptides" en *Molecular pharmaceutics*, Núm. 9, [pp. 708-717]
- [7] Philippens I (2017) "Acceleration of Amyloidosis by Inflammation in the Amyloid-Beta Marmoset Monkey Model of Alzheimer's Disease" en *Journal of Alzheimer's Disease*, Núm 55, [pp. 101-113]
- [8] Kumar D. (2016) "Amyloid-b peptide protects against microbial infection in mouse and worm models of Alzheimer's disease" en *Alzheimer's Disease*, Núm 340, Vol 8.

EFFECTO DE LA D-SERINA SOBRE LA PLASTICIDAD NEURONAL EN RATAS DE EDAD AVANZADA.

Miranda Tavera Luis Fernando¹ ; Alejandra Calero Vargas²; Rojas Piloni Gerardo³ y Mónica López-Hidalgo^{2 2}

² Clínica del Sistema Nervioso, Facultad de Medicina UAQ. México ³Departamento de Neurobiología del desarrollo y Neurofisiología, INB UNAM Campus Juriquilla, Querétaro, México.

RESUMEN

La plasticidad neuronal, memoria y aprendizaje están regulados por los receptores NMDAR, estos receptores median el LTP en las sinapsis neuronales. Los astrocitos tipo 2 en la glía son los que modulan este tipo de sinapsis en el cerebro, liberando D-serina al recibir un estímulo glutamatérgico. Las ratas utilizadas en este estudio fueron condicionadas primeramente a entender el sistema de recompensas, posteriormente se les enseñó la tarea a realizar. Al aprender la metodología de trabajo se les cambió de actividad para determinar la flexibilidad neuronal necesaria para realizar tareas nuevas, antes y después de la administración de D-serina. Los resultados muestran diferencia en el aprendizaje entre ratas jóvenes de 6 meses en comparación con las ratas adultas de 12 meses, a pesar de esto, los datos no son concluyentes debido a que falta una gran parte en la realización de la metodología de este experimento, pero sientan las bases para las posteriores determinaciones.

ABSTRACT

Neural plasticity, memory and learning are regulated by NMDAR receptors, these receptors mediate LTP at neuronal synapses. Type 2 astrocytes in glia are the ones that modulate this type of synapse in the brain, releasing D-serine upon receiving a glutamatergic stimulus. The rats used in this study were conditioned primarily to understand the rewards system, subsequently taught the task to be performed. Upon learning the work methodology, they were changed to determine the neuronal flexibility necessary to perform new tasks before and after D-serine administration. The results show a difference in learning among young rats of 6 months compared to adult rats of 12 months, despite this, the data are not conclusive because a large part is lacking in the realization of the methodology of this experiment, But lay the groundwork for subsequent determinations.

Palabras clave: NMDA, Condicionamiento, Sinapsis Neuronal, Vía Glutamatérgica.

INTRODUCCIÓN

Los receptores N-metil-D-Aspartato (NMDAR) constituyen la maquinaria principal celular responsable de iniciar las sinapsis plásticas en varias áreas del cerebro (Li & Tsien., *et al.*, 2009). Este receptor tetramérico está conformado por dos subunidades Glun1 y dos subunidades que pueden ser de Glun2 (A-D) o de Glun3(A-B). Estas subunidades poseen sitios de unión al agonista y al co-agonista, sitios transmembranales donde se encuentran motivos que forman la compuerta iónica como el M1, M4 y M3, el cual cuenta con una región conservada perteneciente a los canales iónicos glutamatérgicos (SYTANLAAF), y un dominio intracelular C-terminal (Vyklicky *et al.*, 2013.). Las subunidades Glun2 reconocen al agonista, que puede ser D-glutamato, L-Glutamato, NMDA, D- aspartato y L-aspartato. El D-glutamato es más afín a esta subunidad y al interaccionar se crea un cambio conformacional en el motivo M3, liberando al Mg^{2+} que se encuentra en la zona transmembranal. Las subunidades Glun1 reconocen a los co-agonistas, como la glicina, D-serina, L-serina y L-alanina, está reportado que la D-serina tiene mayor afinidad con esta subunidad (Schell *et al.*, 1995). Cuando el NMDAR reconoce dos moléculas agonistas y dos coagonistas, se abre el canal iónico permitiendo el paso de cationes, principalmente Ca^{2+} , K^{+} y Na^{+} . (Vyklicky *et al.*, 2013.)

La D-serina es biosintetizada por la serina racemasa a partir de L-serina, es un componente principal en la activación de los NMDAR neuronales, por lo que se considera una molécula importante en la sinaptogénesis (Pantatierl *et al.*, 2006). Este D-aminoácido es liberado en el cerebro por astrocitos tipo 2 al recibir una señalización glutamatérgica, induciendo así, la potenciación de larga duración (LTP, Long Term Potentiation) en las sinapsis neuronal (Yang *et al.*, 2003). Esta sinapsis de larga duración se inmiscuye en roles de aprendizaje, memoria y plasticidad neuronal en el cerebro (Dityatev & Rusakov, 2011). En este trabajo se busca determinar el efecto de la D-serina suministrada de manera oral en ratas adultas para restaurar parcial o totalmente la plasticidad neuronal, buscando también, la actividad máxima sináptica en la potenciación de larga duración con concentraciones altas de D-serina.

MÉTODOS Y MATERIALES

Animales de experimentación

Se utilizaron ratas de la cepa wistar de 6, 12, 18 y 24 meses, provenientes del Bioterio del Instituto de Neurobiología de la UNAM. Las ratas se mantuvieron en el vivero del laboratorio de Integración Sensoriomotora de la UNAM a un clima controlado de 22.5°C con un fotoperiodo luz/oscuridad de 12/12. Se mantuvieron a dieta controlada, siendo alimentados diariamente con 12g de "Laboratory Rodent Diet 5001" de LabDiet®. Las ratas se pesaron diario para

tener control de su peso, en caso de que este fuera menor del rango 350g-400g se les aumentaba la dieta a 14g diarios; en caso de superar el rango, la dieta disminuía a 10g diarios.

Acondicionamiento Fase1: Acoplamiento

El condicionamiento se llevó a cabo usando el programa "Arduino AR System" tanto para las ratas de 6, 12, 18 y 24 meses. La rata aprenderá a jalar las palancas ubicadas en los lados derecho e izquierdo (R y L, respectivamente). Sobre estas palancas se ubicaran dos focos LED que estarán prendidos durante toda la sesión. El tiempo de sesión máximo es de 1800s y el número de palanqueos correctos máximo es de 50. Esta fase se da por concluida cuando todas las ratas del grupo realicen 50 palanqueos en menos del tiempo límite.

Acondicionamiento Fase2: Tarea

El condicionamiento se llevó a cabo usando el programa "Arduino AR System" tanto para las ratas de 6, 12, 18 y 24 meses. El reforzador se dará cuando realice la tarea correctamente. La rata deberá jalar la palanca ipsilateral al foco LED que se prenderá después del tiempo de retraso. Se escogerá el lado tomando en cuenta la preferencia de palanqueo determinada en la Fase1 (R o L). El tiempo de retraso de la prueba será de 3 segundos, al pasar este tiempo se prenderá el LED sobre la palanca elegida. El tiempo máximo para realizar la tarea es de 13 segundos (incluyendo el tiempo de retraso). El tiempo máximo de sesión es de 1800 s, con un límite máximo de 120 palanqueos.

Acondicionamiento Fase3: Flexibilidad cognitiva

El condicionamiento se llevó a cabo usando el programa "Arduino AR System" tanto para las ratas de 6, 12, 18 y 24 meses. El reforzador se dará cuando la rata jale la palanca contralateral a la luz LED. El resto de condiciones se conservaron, retraso de 3s, tiempo máximo por tarea de 13s, 120 palanqueos máximos y un tiempo máximo de 1800s.

Acondicionamiento Fase 4: Atención

El condicionamiento se llevó a cabo usando el programa "Arduino AR System" tanto para las ratas de 6, 12, 18 y 24 meses. El foco LED se prenderá en uno de los lados elegido aleatoriamente por el programa, ya sea la izquierda o derecha, durante un tiempo determinado, 0.5, 1, 5 y 10s, igualmente escogido por el programa de manera aleatoria. La tarea consiste en jalar la palanca ipsilateral al foco encendido. El resto de los parámetros como el retraso, tiempo de tarea, número de palanqueos y tiempo de sesión se mantuvieron constantes.

Administración de D-serina.

Al finalizar la Fase4, las ratas de 12, 18 y 24 tendrán un periodo de descanso de seis meses. A los cuatro meses se les suministrará D-serina de manera oral por medio del agua durante dos meses, a concentraciones de 0, 30 y 300 mg/kg. Concluidos estos dos meses, los tres grupos de ratas volverán a realizar las pruebas de "Flexibilidad" y "Atención".

RESULTADOS

Flexibilidad.

Como se puede apreciar en la Figura1, la significancia en la gráfica A demuestra un cambio entre el número de palanqueos ($\alpha=0,05$), demostrando que las ratas jóvenes reducen su número, lo cual podría llevar a la inferencia de que las ratas de 6 meses aprenden más rápido que las ratas del grupo de 12 meses. La gráfica B, denota la relación acierto/error en ambos grupos; hay una significancia entre el número de refuerzos obtenidos por grupo ($\alpha=0,05$), pero el número de errores no demuestra alguna significancia entre ambos grupos ($\alpha=0.05$).

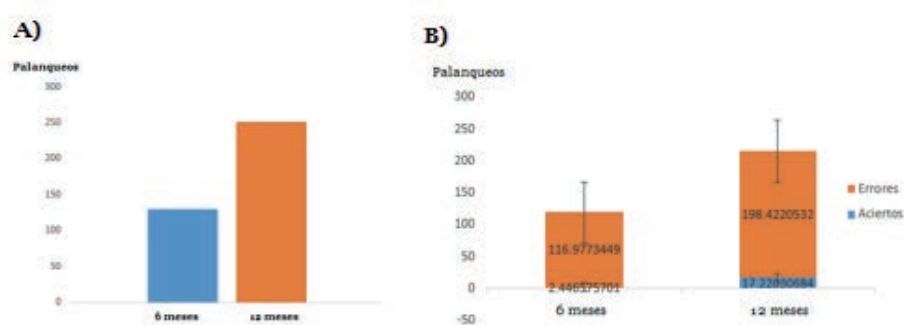


Figura1: -Resultados en las pruebas de flexibilidad cognitiva. A) número de palanqueos por grupo. B) Relación errores aciertos en ambos grupos de ratas

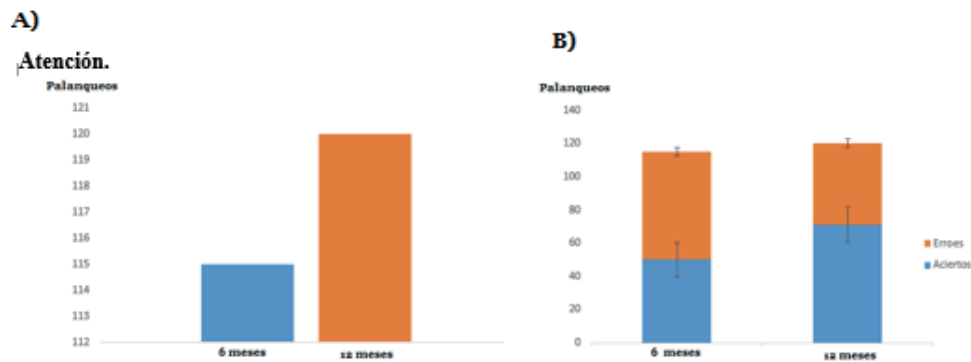


Figura2: -Resultados en las pruebas de atención en las ratas. A) número de palanqueos por grupo. B) Relación errores aciertos en ambos grupos de ratas

La diferencia entre el número de palanqueos es significativa entre ambos grupos (Figura2A, $\alpha=0.05$). La relación acierto/error entre ambos grupos no presenta alguna significancia tomando en cuenta un α del 5%. (Figura2B).

CONCLUSIONES

Para determinar una diferencia significativa entre la degradación cognitiva que sucede en ratas de adultas, es necesario realizar las pruebas en grupos de 18 y 24 meses. Para determinar un efecto significativo de la D-serina en los grupos de ratas adultas es necesario realizar las pruebas con ratas que hayan sido suministradas con este D-aminoácido; en las ratas de seis meses no es necesario demostrar el efecto de la D-serina, debido a que se ha demostrado que en las ratas jóvenes el aumento de este co-agonista a nivel sérico no causa un efecto significativo en el LTP. (Hennerberger et al, 2010)

BIBLIOGRAFÍA

- Dityatev A. & Rusakov D. (2011) Molecular signals of plasticity at the tetrapartite synapse. *Current Opinion in Neurobiology*. 353-359
- Li F. & Tsien J.. (2009, Julio). Memory and the NMDA Receptors. *National Institute of Health*, 361, 302-303
- Henneberger C. et al. (2010) Long term potentiation depends on release of D-serine from astrocyte. *Europe PMC Funder Group*. 463. 232-236
- Panatier A., et al. (2006) Glia-Derived D-Serine Controls NMDA Receptor Activity and Synaptic Memory. *Cell*. 125, 775-784
- Schell, et al. (1995). D-Serine, an endogenous synaptic modulator: Localization to astrocytes and glutamate-stimulated release. *Proc. Natl. Acad.* 92. 3948-3952
- Vyklíček V. et al. (2013). Structure, Function, and Pharmacology of NMDA Receptor Channels. *Physiological Research*. 63, 191-203
- Yang et al. (2003). Contribution of astrocytes to hippocampal long-term potentiation through release of D-serine. *National Academy of Science of the USA*. 100 15294-15299.

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE ACTINOMICETOS DE SUELOS POTOSINOS

Silva Robles Montserrat¹ y Morales Jimenez Jesús Israel²

RESUMEN

Los Actinomicetos son bacterias aeróbicas, grampositivas, filamentosas y parcialmente ácido resistentes, ampliamente distribuidas en el suelo. La importancia de identificar nuevas especies de Actinomicetos recae en la posibilidad de ser fuente de nuevas moléculas con potencial de nueva actividad. Las características de la sierra de Álvarez, ubicada en San Luis Potosí, tales como el clima y su aspecto fisiográfico le confieren la posibilidad de albergar especies no descritas de Actinomicetos. En el presente trabajo se presenta el proceso de aislamiento, identificación y descripción de características macroscópicas de 39 colonias posibles de Actinomicetos provenientes de muestras de tres distintas rizosferas extraídas de la sierra de Álvarez.

ABSTRACT

Actinomycetes are aerobic, gram-positive, filamentous and partially acid-resistant bacteria, widely distributed in the soil. The importance of identifying new species of Actinomycetes relies on the possibility of being a source of new molecules with potential for new activity. The characteristics of the Álvarez mountain range, located in San Luis Potosí, such as the climate and its physiographic aspect, give it the possibility of hosting new species of Actinomycetes. In the present work the process of isolation, identification and description of macroscopic characteristics of 39 possible colonies of actinomycetes from samples of three different rhizospheres extracted from the Álvarez mountain range is presented.

Palabras Clave: Bacterias, morfología, sierra de Álvarez.

INTRODUCCIÓN

Los Actinomicetos son bacterias aeróbicas, grampositivas, filamentosas y parcialmente ácido resistentes, ampliamente distribuidas en el suelo, siendo que el 90% de los microorganismos que lo componen pertenecen a este tipo de bacterias. Inicialmente fueron clasificadas como hongos pero, debido a los estudios de los componentes de su pared celular, se reclasificaron dentro del orden de los Actinomycetales. (Salazar y Ordoñez, 2013)(Cardona, et al, 2009)

Dentro de sus características específicas, presentan un olor típico a suelo húmedo por la producción de un metabolito llamado geosmina. Adicionalmente, presentan una actividad metabólica alta, produciendo terpenoides, pigmentos y enzimas extracelulares hidrolíticas y ligninolíticas con las que son capaces de degradar la materia orgánica de origen vegetal y animal por lo cual son miembros importantes del sistema de descomposición del suelo. (Uzcátegui, et al, 2009)

Históricamente los Actinomicetos han sido el origen de grandes números de nuevos posibles antibióticos y además de diversas moléculas con aplicación en otras áreas terapéuticas. La importancia de identificar nuevas especies de Actinomicetos recae en la posibilidad de ser fuente de nuevas moléculas con potencial de nueva actividad. Además de que muestran actividad biodegradadora al secretar un amplio rango de enzimas que les permiten metabolizar moléculas recalcitrantes. También exhiben diferentes estrategias, desde ciclos de rápida proliferación y esporulación, hasta el mantenimiento de poblaciones por prolongados periodos de tiempo. Esta versatilidad metabólica y morfológica les confiere un gran potencial para desempeñarse en procesos de biorremediación, incluyendo la remoción de metales. En este sentido se ha trabajado con diferentes fuentes tales como nichos terrestres específicos, asociaciones de plantas hospederas con características únicas y algunos ambientes marinos. (Genilloud, et al, 2011) (Cardona, et al, 2009).

La sierra de Álvarez, ubicada en San Luis Potosí con latitud N: 21° 42' 32" a 22° 23' 21" y longitud W: 100° 05' 24" a 100° 49' 30", se caracteriza por tener mayormente un clima semiárido-templado (BS1wk) y de un aspecto fisiográfico leptosol lítico (LPq), dichas cualidades le confieren la posibilidad de albergar nuevas especies de Actinomicetos. (Arriaga et al, 2000)

METODOLOGÍA

Recolección de muestras de suelo. Tres diferentes muestras de suelo fueron recolectadas en la sierra potosina (específicamente la zona geográfica de la Sierra de Álvarez) que corresponden a rizosferas de encino (RE) y de dos tipos distintos de cactáceas (RCR y RC).

Diluciones seriadas. Para llevarse a partir de un volumen inicial de 9mL de solución salina (NaCl 0.85%) a los que posteriormente se le agregó 1g de cada una de las muestras de suelo por separado generando así una concentración inicial de 1×10^{-1} . La concentración final fue de 1×10^{-7} , se realizó el procedimiento una segunda vez alcanzando una concentración final de 1×10^{-6} .

Inoculación de placas. Se utilizó medio de cultivo selectivo Glucosa Asparagina Extracto de levadura (GAE) constituido por glucosa (2%), L-asparagina (0.1%), extracto de levadura (0.05%), K_2HPO_4 (0.05%), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.05%), $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.01%) y agar bacteriológico (1.5%). (Coll et. al., 1993) Por medio del método de extensión por superficie se vaciaron 200µL de cada una de las diluciones anteriores en cajas Petri con medio GAE. Esto se realizó por duplicado utilizando los dos conjuntos de diluciones preparados, primero las diluciones 4, 5, 6 y 7 y el segundo conjunto, correspondiente a las segundas diluciones, 3, 4, 5 y 6.

Aislamiento y crio conservación de colonias. Después de ser incubadas por 96 h a 26°C se tomó de cada caja las colonias que presentaron características similares a la reportada en la bibliografía para colonias de Actinomicetos

¹Universidad Autónoma de Querétaro; Facultad de Química, Cerro de las campanas S/N, Col. Las Campanas, C.P: 76010, Querétaro, Querétaro, monsers96@gmail.com

²Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica S.A., División de Biología Molecular; Camino a la Presa de San José 2055, Col. Lomas 4a Secc., C.P:78216, San Luis Potosí, San Luis Potosí, jesus.morales@ipicyt.edu.mx.

(colonias secas, duras, polvorosas y adheridas al agar). Se realizaron resiembras de cada colonia con el fin de obtener cultivos puros utilizando el método de estriado y se incubaron en las condiciones ya descritas. Simultáneamente se llevó a cabo el conteo de colonias de cada cepa para la determinación del número de unidades formadoras de colonia por gramo de suelo (UFC/gramo de suelo). Transcurrido el tiempo de incubación se recuperó de cada cultivo material biológico suficiente y se depositó en 1mL de solución de glicerol 20% v/v para posteriormente guardarse a -70°C.

Extracción de DNA de suelo y colonias. La extracción de DNA de suelo se llevó a cabo para cada una de las muestras de suelo recolectadas conforme se indica en el protocolo del *Power Soil DNA Isolation Kit* (MoBio Laboratories, Carlsbad, CA, USA). 3uL de muestra se cargaron en un gel de agarosa 1.5% y se llevó a cabo electroforesis a 70V por 30 min. Se extrajo DNA de cada una de las cepas identificadas como posibles Actinomicetos, esta vez siguiendo el método de Fenol/cloroformo-alcohol isoamílico.

PCR en muestras de DNA de suelos. Se llevó a cabo una reacción en cadena de polimerasa (PCR) para amplificar el fragmento 16S rDNA, utilizando los oligonucleótidos 27F y 1492R. La muestra inicial de DNA se diluyó usando agua esterilizada con factor 1:50, los amplicones se corrieron en gel de agarosa 1.5% y la electroforesis se realizó con las condiciones descritas anteriormente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todas las cepas tomadas de las placas con medio GAE mostraron una presencia significativa, determinada por las ecuaciones 1), 2), y 3), en las muestras recolectadas de rizosfera como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Reporte de UFC/ gramo de suelo y descripción macroscópica de las colonias

Código de Cepa	Factor de Dilución	No. colonias en placa	UFC/g de suelo	Descripción macroscópica de colonias	Código de Cepa	Factor de Dilución	No. colonias en placa	UFC/g de suelo	Descripción macroscópica de colonias
REZ	1x10 ⁻⁵	2	1x10 ⁵	mediana, redonda, borde crema, anillo polvoso, cóncava	RCRR	1x10 ⁻⁴	1	5x10 ⁴	mediana, borde ondulado, verde claro, centro perforado, opaca
REY	1x10 ⁻⁴	5	2.5x10 ⁵	mediana, redonda, borde liso, blanca, algodonosa	RCRQ	1x10 ⁻⁴	1	5x10 ⁴	mediana, crema, superficie blanca, opaca, cóncava
REX	1x10 ⁻⁴	1	5x10 ⁴	pequeña, redonda, estrías, verde gris, opaca	RCRP	1x10 ⁻⁶	1	5x10 ⁶	pequeña, redonda, borde polvoso, gris al centro, opaca
REU	1x10 ⁻⁴	1	5x10 ⁴	pequeña, redonda, rosa con anillos polvosos, opaca	RCRJ	1x10 ⁻⁴	1	5x10 ⁴	mediana, borde rugoso, anillos gruesos blancos y grises, cóncava
REQ	1x10 ⁻⁴	2	1x10 ⁴	mediana, borde filamentosos, gris, polvosa, opaca	RCRH	1x10 ⁻⁴	4	2x10 ⁵	mediana, redonda, naranja, centro perforado, opaca
REO	1x10 ⁻⁴	1	5x10 ⁴	grande, borde ondulado, polvosa, naranja, superficie café, opaca	RCRE	1x10 ⁻⁵	1	5x10 ⁵	grande, redonda, crema, superficie polvosa, opaca
REM	1x10 ⁻⁴	2	1x10 ⁴	pequeña, borde ondulado y cremoso, centro rosado, opaca	RCRC	1x10 ⁻⁵	1	5x10 ⁵	pequeña, redonda, crema, superficie gris, centro negro, polvosa, opaca
REL	1x10 ⁻⁴	2	1x10 ⁵	mediana, redonda, anillos café y gris, centro blanco, polvosa, opaca	RCRAO	1x10 ⁻⁶	1	5x10 ⁶	mediana, redonda, gris, borde blanco, polvosa, opaca
REK	1x10 ⁻⁴	1	5x10 ⁵	pequeña, borde ondulado, amarilla, polvosa, opaca	RCRAL	1x10 ⁻⁴	5	2.5x10 ⁵	mediana, anillos grises, convexa, opaca
REJ	1x10 ⁻⁷	1	5x10 ⁷	pequeña, borde ondulado, negra, opaca	RCRAI	1x10 ⁻⁵	1	5x10 ⁵	pequeña, borde ondulado, estrías, café, opaca
REI	1x10 ⁻³	1	5x10 ³	mediana, redonda, café, estrías, opaca	RCRAG	1x10 ⁻⁵	1	5x10 ⁵	mediana, redonda, crema, rugosa, opaca
REH	1x10 ⁻⁴	1	5x10 ⁴	mediana, redonda, rosa, superficie polvosa, centro perforado, opaca	RCRAE	1x10 ⁻⁴	3	1.5x10 ⁵	mediana, redonda, blanca, algodonada, opaca
RED	1x10 ⁻³	2	1x10 ⁴	pequeña, redonda, medio morado, superficie gris polvosa, opaca	RCRAD	1x10 ⁻⁴	2	1x10 ⁵	mediana, redonda, naranja, superficie blanca, estrías, opaca
REC	1x10 ⁻³	1	5x10 ³	grande, redonda, café, borde polvoso, opaca	RCRAC	1x10 ⁻⁷	1	5x10 ⁷	pequeña, borde ondulado, blanca, exudado al centro, polvosa, opaca
REAA	1x10 ⁻⁴	1	5x10 ⁴	pequeña, redonda, crema, superficie gris polvosa, opaca	RCRA	1x10 ⁻⁵	1	5x10 ⁵	Mediana, redonda, blanca, opaca polvosa
RCRZ	1x10 ⁻³	1	5x10 ³	pequeña, redonda, café, superficie blanca algodonada, opaca	RCK	1x10 ⁻⁶	1	5x10 ⁶	mediana, borde ondulado, cóncava, centro blanco polvoso, anillo gris, opaca

RCRV	1×10^{-3}	3	1.5×10^4	Pequeña, redonda, gris con borde blanco polvoso, cóncava,	RCJ	1×10^{-5}	1	5×10^5	mediana, redonda, gris, superficie anillada, centro gris exudado, opaca
RCRU	1×10^{-4}	7	3.5×10^5	mediana, redonda, anillos crema y blanco, polvosa, opaca	RCH	1×10^{-4}	2	1×10^5	Pequeña, borde ondulado, anillos polvosos grises y blancos.
RCRT	1×10^{-3}	1	5×10^3	Mediana, redonda, borde blanco rugoso, gris al centro, opaca, polvosa	RCG	1×10^{-4}	1	5×10^4	Mediana, redonda, borde blanco polvoso, estrias blancas, anaranjada, opaca
RCRS	1×10^{-3}	2	1×10^4	mediana, redonda, azul, algodonosa, opaca	RCB	1×10^{-4}	1	5×10^4	pequeña, redonda, bordes crema, centro gris, opaca
RC-MY	1×10^{-4}	1	5×10^4	Mediana, redonda, borde blanco polvoso, rosa al centro, opaca	-	-	-	-	-

Factor Dilución (FD)= Título de la dilución inicial * Títulos diluciones sucesivas (1)

Factor Decimal de Dilución (FDD)= 1/FD (2)

UFC/gramo de suelo= nº de colonias en la placa considerada * FDD / Volumen inicial sembrado (3)

Además, de acuerdo a las características macroscópicas descritas en la literatura específicas para las colonias de Actinomicetos y en conjunto con algunas otras consideraciones visuales tales como el color, el tamaño, y la forma entre otras se encontraron un total de 39 diferentes posibles colonias de Actinomicetos. La asignación del código a cada cepa corresponde a la muestra de rizosfera a partir de la cual fueron aisladas, sin embargo esto no excluye la presencia de la misma cepa en una muestra distinta. Ya que durante el proceso, las colonias que presentaron similitudes, fueron descartadas. En la figura 1 se muestra como ejemplo una placa con la presencia de las colonias bacterianas que presentaron crecimiento en la misma a partir de la dilución de una sola de las muestras de rizosfera.

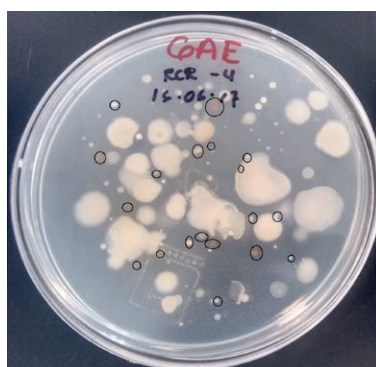


Fig. 1. Placa con medio GAE. Dentro de los círculos se observan posibles colonias de Actinomicetos provenientes de rizósfera de cactácea (RCR) con un factor de dilución 1×10^{-4}

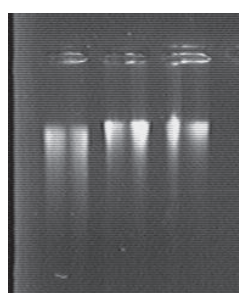


Fig. 2 Comprobación de extracción de DNA de suelos en gel de agarosa (RE, RCR y RC de izquierda a derecha)

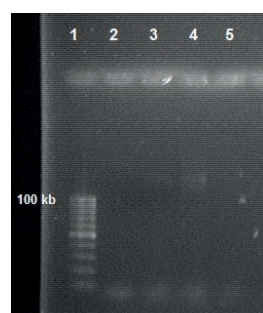


Fig. 3 Comprobación de la amplificación de 16S rDNA en gel de agarosa 1.5%. Marcador de peso molecular (1), control negativo (2), RE (3), RC (4), y RCR (5).

Por medio de la electroforesis se comprobó la correcta extracción de DNA de suelo procedente de las tres diferentes rizosferas recolectadas, las tres bandas que se observan en la figura 2 indican la presencia de material genómico. 16S rDNA fue amplificado a partir del DNA total extraído de igual manera de cada rizosfera recolectada, en la figura 3 se observan 3 bandas tenues en los carriles 3, 4 y 5. Dichas bandas son correspondientes a un peso de 1500 kilo bases que a su vez corresponde al peso que este fragmento de DNA posee. Esto confirma la presencia de DNA bacteriano en el suelo y permite la posterior secuenciación del mismo para la correcta y final determinación de las bacterias presentes y su pertenencia al orden de los Actinomicetales. (Wool, et. al., 2008)

Por último, la identificación, por medios tanto microscópicos como moleculares entre otros, de cada una de las posibles cepas de Actinomicetos se llevará a cabo en trabajos posteriores con el fin de obtener una correcta determinación de familia, género, etc.

CONCLUSIONES

El aislamiento e identificación de cepas de Actinomicetos en base a sus características morfológicas macroscópicas marca un primer intento para el posible descubrimiento de nuevas especies en suelos potosinos o bien para la posterior caracterización de nuevas moléculas que tengan diverso potencial para ser usadas en diferentes ámbitos.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) SALAZAR, A., ORDÓÑEZ, C., (2013). “Aislamiento e identificación de actinomicetos fijadores de nitrógeno en suelo del jardín botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira” en Universidad Tecnológica de Pereira. Consultada en <http://repositorio.utp.edu.co/dspace/handle/11059/3050> (fecha de consulta 15-08- 2017).
- 2) CARDONA, C., PEÑA, C., GARCÍA, M. (2009). “Comunidades de hongos actinomicetos en tres tipos de vegetación de la Amazonia colombiana: abundancia, morfotipos y el gen 16s ADN^r” en Scielo, No. 4, Vol. LVII pp. 1119-1139. Consultada en http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77442009000400017 (fecha de consulta 16-08- 2017).
- 3) UZCÁTEGUI, M., SERRANO, J., BOIRON, P., RODRIGUÉZ, V., (2009). “Clasificación e identificación de especies de actinomicetos: un estudio fenotípico comparativo” en Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, Núm. 29, [pp. 91-97].
- 4) GENILLOU, O., GONZÁLEZ, I., SALAZAR, O., MARTÍN, J., TORMO, JR., VICENTE, F. (2011). “Current approaches to exploit actinomycetes as a source of novel natural products.” en Journal of industrial microbiology and biotechnology, Núm. 3, Marzo, [pp.375–389].
- 5) ARRIAGA, L., J.M. ESPINOZA, C. AGUILAR, E. MARTÍNEZ, L. GÓMEZ Y E. LOA. (2000). “Regiones terrestres prioritarias de México” en Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad. Consultada en <http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/regionalizacion/doctos/terrestres.html> (fecha de consulta 16-08-2017)
- 6) COLL, P., FERNÁNDEZ, J., VILLANUEVA, J., SANTAMARÍA, R., (1993). “Purification and Characterization of a Phenoloxidase (Laccase) from the Lignin-Degrading Basidiomycete PM1 (CECT 2971)” en Applied And Environmental Microbiology, Núm. 8, Vol. LIX, Agosto, [pp. 2607-2613].
- 7) WOO, P., LAU, S., TENG, J., (2008). “Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories” en ELSEVIER, Núm. 10, Vol. XIV, Octubre, [pp. 908-934].

EFECTO POTENCIAL DE LAS ESPECIES ÍCTICAS INVASORAS EN RÍOS DE LA RESERVA DE LA BIOSFERA DE LA SIERRA GORDA DE QUERÉTARO

Paola Lisette Hernández Rubio¹ y Juan Pablo Ramírez Herrejón²

RESUMEN

Las especies invasoras representan una amenaza a la biodiversidad, el medio ambiente, la economía y la salud humana. Debido a su relevancia como agentes dañinos de los ecosistemas, es necesario realizar estudios científicos enfocados a esta problemática con el fin de desarrollar bases sólidas para la búsqueda de soluciones y como referencia para futuras investigaciones. Como parte del 19° Verano de la Ciencia de la Región Centro, se colaboró en un artículo científico enfocado al estudio de las especies de peces exóticos invasores que se encuentran en la Sierra Gorda de Querétaro. Gracias a esta colaboración el alumno aprendió a realizar análisis de contenido estomacal en peces exóticos invasores del género *Oreochromis*. Además se escribió el primer borrador de un artículo de divulgación científica, con el objetivo de informar a la población no especializada, sobre las especies exóticas invasoras en el Estado. Finalmente se contribuyó al mejoramiento la Colección de Peces del Centro de México de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ).

ABSTRACT

Invasive exotic species represent a menace to biodiversity, the environment, the economy and human health. Due to their relevance as harmful agents of the ecosystems it is necessary to elaborate scientific studies focused on this problem, in order to develop solid bases for the search of solutions and as a reference for future research. As part of the 19th. Verano de la Ciencia de la Región Centro, the participant collaborated in a scientific paper to study the exotic species of invasive fish that are in the Sierra Gorda of Queretaro. Because of this collaboration, student learned to perform analysis of stomach contents in invasive exotic fish of the genus *Oreochromis*. In addition, the first draft of a scientific outreach article was written, with the objective of informing the non-specialized population about invasive alien species in the State. Finally the participant contributed to the improvement of the Colección de Peces del Centro de México of the Facultad de Ciencias Naturales of the Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ).

Palabras clave: especies exóticas invasoras, análisis de contenido estomacal, divulgación científica, peces, colección científica.

INTRODUCCIÓN

Uno de los factores principales que amenazan la integridad de las zonas naturales de México, incluyendo la Reserva de la Biosfera de la Sierra Gorda, son las especies exóticas invasoras. Estas especies, fueron definidas en el Convenio de la Diversidad Biológica (CDB) como "aquellas que prosperan sin ayuda del ser humano y amenazan hábitats naturales o seminaturales, fuera de su área habitual de distribución" (CDB, 2009). De acuerdo con la CONABIO (2010), estos organismos ocasionan problemas ambientales graves, al afectar la calidad de los ecosistemas y al disminuir la biodiversidad. Además pueden afectar el desarrollo social y económico y la salud de las poblaciones humanas, por medio de la propagación de enfermedades o al afectar a especies de interés económico. Los efectos de estos organismos se pueden ver maximizados por ciertos factores, como por ejemplo la influencia antropocéntrica. Ambas problemáticas afectan de manera crítica al mantenimiento de los ecosistemas de agua dulce, mismos que de manera natural son más sensibles a los cambios ambientales que los terrestres (Aguirre *et al.*, 2009).

1. Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Ciencias Naturales; Avenida de las Ciencias S/N Juriquilla, C.P: 76230, Santiago de Querétaro, Querétaro, paolal.heru@gmail.com. 2. Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Ciencias Naturales; Carretera a Chichimequillas s/n, Ejido Bolaños, C.P: 76140, Santiago de Querétaro, Querétaro, ramirezherrejon@gmail.com.

La Reserva de la Biosfera de la Sierra Gorda se localiza en la parte noroeste del estado de Querétaro y abarca el 32.02% de su área total. Su amplia variedad de climas y ecosistemas y su heterogeneidad geográfica hacen que en esta zona se desarrolle una muy amplia y variada diversidad de especies importantes de flora y fauna, entre las que se encuentran varias especies endémicas o de distribución restringida (Carabias *et al.*, 1999). Las características de esta Reserva la convierten en un atractivo turístico importante y provee al Estado con diversos recursos ecosistémicos. A pesar de ser un área dedicada a la conservación de los ecosistemas naturales, se encuentra afectada por la presencia de especies exóticas invasoras (Contreras *et al.*, 2014). Dentro de esta reserva se encuentran 25 de los 66 ríos que atraviesan el estado de Querétaro. En ellos se pueden encontrar alrededor de 27 especies de peces, entre las cuales se encuentran varias especies exóticas invasoras. Dos de las más destacadas son la tilapia de Mozambique (*Oreochromis mossambicus*) y la mojarra (*Herichthys* sp.), ambas muy agresivas para el ecosistema. Como parte de la colaboración realizada para este artículo se analizó en contenido estomacal de organismos considerados exóticos invasores del género *Oreochromis*, con el objetivo de determinar si compiten por recursos con otras especies, incluyendo las nativas.

Aunque en todas las Reservas de la Biosfera del país podemos encontrar especies exóticas invasoras son muy pocos los estudios enfocados a esa problemática. Por lo anterior y como un intento de contribuir a la protección de los ecosistemas de agua dulce, en el laboratorio de Integridad Biótica de la Universidad Autónoma de Querétaro, se están

realizando proyectos enfocados a la evaluación del impacto de estas especies. Como parte del 19° Verano de la Ciencia de la Región Centro, se colaboró en uno de dichos proyectos, titulado “Efecto potencial de las especies ícticas invasoras en ríos de la Reserva de la Biosfera de la Sierra Gorda de Querétaro”. Además, en el entendimiento de que la sociedad forma parte importante en la resolución de este tipo de problemáticas, se comenzó un artículo de divulgación que busca informar al público en general sobre el tema de las especies exóticas invasoras en la reserva queretana, mismo que se espera publicar este año en la revista “Ciencias” de la Academia Mexicana de Ciencias (AMC). Finalmente se colaboró en el mejoramiento de la Colección de Peces del Centro de México de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ).

MARCO TEÓRICO

Para determinar que una especie exótica representa un peligro para el ecosistema, es necesario realizar ciertos procedimientos. Uno de los más utilizados en peces es el análisis de contenido estomacal. Este análisis es una herramienta clave para inferir el papel de las especies ícticas en los ecosistemas, al proporcionar información sobre su interacción con otras especies animales y vegetales y con su medio ambiente. Esta información permite estimar la ubicación de estas especies en las redes tróficas y si están compitiendo con otros organismos por los recursos, y de ser así con cuales lo hacen (Silva *et al.*, 2014). Este procedimiento consiste de dos fases, la cuantitativa y la cualitativa. En la fase cualitativa se identifican los taxa a los que pertenecen los organismos consumidos. El nivel taxonómico al que se identifique el contenido dependerá del tipo de pez analizado y de los intereses de la investigación. Por su parte, la fase cuantitativa consiste en cuantificación de los contenidos estomacales, para obtener un índice de frecuencia de ocurrencia (FO) y de abundancia relativa de las presas (Ramírez *et al.*, 2013). Existen distintos métodos para esta fase, que dependen, como en el caso de la etapa anterior, de los objetivos de la investigación. En este caso se revisó el contenido estomacal utilizando el método volumétrico indirecto modificado por Canto y Vega (2008). En este método se estima el área que ocupa un artículo alimenticio en un área conocida, generalmente una cuadrícula milimétrica.

Como parte de la participación en el Verano de la Región Centro, se comenzó la escritura de un artículo de índole divulgativo. Se realizó por que además de la investigación científica, la divulgación de la ciencia es otra de las herramientas que pueden contribuir a la resolución de problemáticas de índole ambiental. Los artículos de divulgación buscan involucrar a la población general, es decir, que no tiene una especialización científica, en temas de interés público como pueden ser las especies exóticas invasoras. Su objetivo final es concientizar e invitar a la sociedad a participar en la prevención, disminución y erradicación de este tipo de problemas e informar sobre los nuevos avances en el ámbito científico (Sánchez y Roque, 2011). De acuerdo con los mismos autores las publicaciones de divulgación científica deben realizarse con un lenguaje adecuado, dependiendo del público al que se destine la publicación, y debe ser ameno y fácil de leer.

Por otro lado se contribuyó a una colección ictiológica por medio de la adecuación de ejemplares. A lo largo de la historia las colecciones científicas han formado parte importante en el campo de la ciencia, al fungir como fuentes de información. Para tener una colección científica apropiada es necesario realizar diversos procesos, que varían dependiendo de los taxa o muestras a conservar. De acuerdo con Espinosa (2003) en el caso de las colecciones ictiológicas existen tres pasos principales para el reguardo de las muestras. El primero es la colecta, que debe realizarse bajo ciertos lineamientos metodológicos y bioéticos, en esta etapa es muy importante la toma de datos del medio, como sitio de colecta, temporalidad, características ambientales entre otros, ya que esta información servirá para la identificación de los ejemplares. Antes de continuar hacia el siguiente paso es necesario realizar un proceso de limpieza de los organismos, para disminuir el riesgo de contaminación. El segundo paso es la preservación de los ejemplares, si los peces se conservan en buen estado podrán ser utilizados para estudios morfológicos, embriológicos, anatómicos y moleculares entre otros. De acuerdo con el mismo autor la mejor manera de preservar las muestras de peces es conservándoles en alcohol etílico al 90%. El tercer paso es la documentación, en este se capturan los datos de los ejemplares, considerando los tomados en el paso uno, además de otros nuevos como el peso y talla de los organismos.

MÉTODOS Y MATERIALES

Revisión de contenido estomacal

Se midió la longitud del intestino de peces del género *Oreochromis* utilizando un vernier como aparato de medición. Posteriormente se dividió el intestino en tres partes iguales utilizando tijeras y agujas de disección. Se sacó el contenido de las zonas anterior y posterior del tracto intestinal, apoyándose con una aguja de disección. Cada uno se colocó en una caja de Petri junto con agua corriente, posteriormente se revolvió para obtener una mezcla homogénea. Se procuró que las muestras no quedaran tan saturadas y se tomó un mililitro de la mezcla, con la ayuda de una jeringa. Las muestras obtenidas se colocaron sobre un portaobjetos marcado con una cuadrícula de 10mm x 10mm, se cubrieron con un cubreobjetos y se observaron en un microscopio óptico con el objetivo 10X. Debido a las características alimenticias del género, casi todos los artículos alimenticios correspondían a algas diatomeas o a algas verdes. La cuadrícula antes mencionada se utilizó debido al tamaño de dichos artículos alimenticios, como área de referencia para calcular la frecuencia de ocurrencia y la abundancia relativa, de acuerdo al método volumétrico indirecto modificado por Canto y Vega (2008). El área ocupada por cada artículo alimenticio se determinaba por la presencia-ausencia de dichos elementos en cada cuadro. Las algas encontradas se identificaron taxonómicamente hasta nivel de género utilizando claves dicotómicas.

Redacción del artículo de divulgación

Para realizar el artículo de divulgación científica, enfocado al tema de las especies ícticas exóticas invasoras de la Reserva de la Biosfera de la Sierra Gorda, se buscó información en diversos libros y artículos científicos y de divulgación. La redacción y el estilo del artículo, así como la especificidad de su contenido, se desarrollaron en base a la guía del autor de la Revista Ciencias, de la Academia Mexicana de Ciencias (AMC) en la que se espera publicar. Se realizaron revisiones periódicas del avance del artículo para corregir errores y aumentar la calidad del mismo.

Apoyo en el mejoramiento de una colección científica de peces

Se seleccionaron ejemplares de peces de colectas realizadas por los integrantes del Laboratorio de Integridad Biótica, para ser ingresados en la Colección de Peces del Centro de México de la Facultad de Ciencias Naturales de la UAQ. La elección de los ejemplares se basó en su integridad, es decir, solo seleccionaron organismos completos y mejor preservados. Para seleccionar a los organismos se colocaron sobre una bandeja de disección y se manipularon utilizando guantes de laboratorio. A las muestras seleccionadas se les remplazó el alcohol etílico original por limpio al 90% de concentración y se depositaron en frascos de plástico transparente. Los ejemplares no aptos para ingresar en la colección de depositaron en contenedores separados de plástico para su futuro desecho.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se revisó el contenido estomacal de 14 individuos del género *Oreochromis* utilizando el método volumétrico indirecto modificado por Canto y Vega (2008), e identificando las algas encontradas hasta nivel de género. Se encontraron 17 géneros de algas, además de restos de macroinvertebrados y restos vegetales que no pudieron ser identificados por el grado de digestión. Debido a que el número de muestras estomacales para este proyecto es mucho mayor a las revisadas en este Verano (alrededor de 1,500), no fue necesario realizar ningún análisis estadístico. Se observó que los géneros de algas más frecuentes en las muestras analizadas fueron *Navicula*, *Cocconeis* y *Cymbella*, todos ellos diatomeas (Bacillariophyceae), sin embargo debido a la N analizada, no pueden considerarse como resultados concluyentes.

Se considera que el método utilizado para cuantificar el contenido estomacal fue el adecuado para los organismos analizados. Lo anterior debido a que ha sido descrito como el más propicio para analizar el contenido estomacal de peces que suelen alimentarse de presas muy pequeñas, como las algas. En el método volumétrico indirecto original se debe estimar el volumen que ocupa una determinada presa o artículo alimenticio, de acuerdo a su forma, para posteriormente compararlo con un volumen conocido (Silva *et al.*, 2014). Dicho volumen de referencia se obtiene de calcular el volumen total del tracto digestivo o estómago analizado. Esta metodología puede utilizarse para estudiar los cambios alimenticios a través del tiempo de las especies estudiadas. Las muestras colectadas para este artículo científico se tomaron en más de una temporalidad, pero las revisadas en este Verano solo correspondían a una temporada. Sin embargo, con este método sin modificaciones existe el riesgo de caer en la subjetividad, ya que es una técnica visual. Por lo tanto se decidió utilizar la metodología modificada de Canto y Vega (2008), por lo que se sustituyó la cuantificación del volumen por la del área, utilizando la cuadrícula de 10mm x 10mm como área de referencia.

Se elaboró el primer borrador completo del artículo de divulgación. Actualmente continúa en edición y se espera que sea enviado a la Revista Ciencias, de la Academia Mexicana de Ciencias (AMC) a mediados del mes de Septiembre de 2017. Como parte del proceso de edición, el borrador ha sido enviado a investigadores con experiencia en divulgación científica.

Después de analizar las muestras de peces almacenadas en el Laboratorio de Integridad Biótica de la UAQ, se seleccionaron los individuos más adecuados para ser ingresados en la Colección de Peces del Centro de México. Se lograron adecuar alrededor de 40 muestras, que se espera sean ingresadas a la colección en los próximos meses. De acuerdo con Espinosa (2003) al conservar los ejemplares en alcohol al 90% se obtiene un grado de conservación del tejido adecuado para posibles análisis genéticos, por lo que se espera que las muestras preparadas puedan servir para diversas investigaciones futuras.

CONCLUSIÓN

Se colaboró en el proyecto “Efecto potencial de las especies ícticas invasoras en ríos de la Reserva de la Biosfera de la Sierra Gorda de Querétaro” por medio del análisis de contenido estomacal de peces del género *Oreochromis*. Se aprendió a realizar correctamente dicho análisis, además de que se desarrollaron habilidades como la identificación de algas por medio de claves dicotómicas y el manejo del microscopio óptico.

También se inició la escritura de un artículo de divulgación sobre el mismo tema, mismo que se pretende utilizar como opción de titulación de la Licenciatura en Biología de la UAQ. Para la elaboración de este artículo se mejoraron habilidades como búsqueda de información relevante y redacción.

Finalmente se contribuyó a aumentar la Colección de Peces del Centro de México de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro y se aprendió a preservar ejemplares ictiológicos.

AGRADECIMIENTOS

Al comité organizador y a las instituciones que formaron parte del 19° Verano de la Ciencia de la Región Centro por la oportunidad brindada y por el apoyo económico. También se agradece a la Universidad Autónoma de Querétaro por los recursos proporcionados para la realización de las actividades del Verano.

Finalmente un profundo agradecimiento al Dr. Juan Pablo Ramírez Herrejón y la Maestra Pamela Bermúdez y demás integrantes del Laboratorio de Integridad Biótica de la Facultad de Ciencias Naturales, por el apoyo y asesoría ofrecidos en este verano.

BIBLIOGRAFÍA

AGUIRRE, R. y MENDOZA, A.(2009). *Especies exóticas invasoras: impactos sobre las poblaciones de flora y fauna, los procesos ecológicos y la economía*, en Capital natural de México, vol. II: Estado de conservación y tendencias de cambio. Conabio, México, pp. 277-318.

CANTO, W. y VEGA, E. (2008). "Hábitos alimenticios del pez *Lagodon rhomboides* (Perciformes: Sparidae) en la laguna costera de Chelem, Yucatán, México" en *Revista de Biología Tropical*, Num56, Vol IV [pp. 1837-1846]. 1837-1846.

CARABIAS, J., PROVENCIO, E., MAZA, J. y RUÍZ, M. (1999). *Programa de Manejo de la Reserva de la Biosfera Sierra Gorda*. México: Instituto Nacional de Ecología.

CDB. (2009). *Conferencia de las Partes COP 6: Decisión VI/23: Especies exóticas que amenazan a los ecosistemas, los hábitats o las especies*. Convenio sobre la Diversidad Biológica.

Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. (2010). *Estrategia nacional sobre especies invasoras en México, prevención, control y erradicación*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad; Comisión Nacional de Áreas Protegidas, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. México.

CONTRERAS, T., GASPAR, M., HUIDOBRO, L. y MEJÍA, H. (2014). *Peces invasores en el centro de México*, en R. Mendoza y P. Koleff (coords.), *Especies acuáticas invasoras en México*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México, [pp. 413-424].

ESPINOSA, E. (2003). "La colección nacional de peces, metodos y usos" en *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, Núm 6, Vol. I, [pp. 30-36]. Silva, M., Hernández, R. y Medina, M. (2014). "Métodos clásicos para el análisis del contenido estomacal en peces" en *Biológicas*, Núm 16, Vol II, Diciembre [pp. 13-16].

RAMÍREZ, J., CASTAÑEDA, S., MONCAYO, R., CARAVEO, J. y BALART, F. (2013). "Trophic ecology of the exotic Lerma livebearer *Poeciliopsis infans* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae) in the Lago de Pátzcuaro, Central Mexico" en *Revista de Biología Tropical*, Num 61, Vol III, [pp. 1289-1300].

SÁNCHEZ, Y. y ROQUE, Y. (2011). La divulgación científica: una herramienta eficaz en centros de investigación. Año 7, No. 7, pp. 91-94. Consultado en: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/5704469.pdf>

REMOCIÓN DE FLUORUROS Y BROMUROS DE SOLUCIONES ACUOSAS SOBRE HIDROGELES DE QUITOSANO RETICULADO CON FORMALDEHÍDO

Alejandra Castro Gámez¹ y Nahúm Andrés Medellín Castillo²

RESUMEN

Los fluoruros y bromatos pueden ser nocivos para la salud humana cuando son ingeridos a través del agua. Las características del proceso de adsorción de F^- y Br^- sobre hidrogeles de quitosano reticulado con formaldehído han sido investigadas en este estudio. Algunas variables como las concentraciones del agente entrecruzante, polímero e iniciador tuvieron efectos en la capacidad de remoción de F^- y Br^- de los hidrogeles sintetizados. Los hidrogeles reticulados con una baja concentración de formaldehído y con una alta concentración de quitosano resultaron ser más eficientes en el proceso de remoción de estos aniones en soluciones acuosas.

ABSTRACT

Fluorides and bromates can be harmful for human health when they are ingested through water. The characteristics of the F^- and Br^- adsorption process on chitosan hydrogels crosslinked with formaldehyde have been investigated. Some variables such as the concentrations of the crosslinking agent, polymer and initiator had effects on the F^- and Br^- removal capacity of the synthesized hydrogels. The crosslinked hydrogels with a low concentration of formaldehyde and with a high concentration of chitosan turned out to be more efficient in the removal process of these anions in aqueous solutions.

Palabras clave: hidrogel, bromuros, fluoruros, quitosano, formaldehído.

INTRODUCCIÓN

El ion bromato es un compuesto químico tóxico que se forma a partir de los bromuros durante la desinfección de agua mediante procesos de ozonización. En determinadas ocasiones, puede formarse bromato en soluciones concentradas de hipoclorito que se utiliza para desinfectar el agua de consumo. Una de las rutas más efectiva y viable para la remoción del ion bromato es la eliminación del bromuro en el proceso de purificación del agua antes de pasar a la ozonización (Gong et al., 2013). En 1990, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer clasificó al ion bromato (BrO_3^-) como carcinogénico, mutanogénico y teratogénico (Cui et al., 2017).

Existen diversos métodos para la remoción de los bromuros de soluciones acuosas. Por ejemplo, se ha empleado resinas poliméricas como la resina MIEX la cual puede ser usada como un adsorbente efectivo; sin embargo, el proceso de adsorción es afectado por los iones cloruros, sulfatos y por la alcalinidad del agua (Ding et al., 2012). Las esferas de carbón impregnadas con plata en los poros (SLPCSs) resultan ser buenos adsorbentes para los bromuros, pero cuando son regeneradas no cumplen las expectativas de adsorción debido a que se presentan cambios internos en la estructura (Gong et al., 2013). El carbón activado es otro material adsorbente práctico en el tratamiento de aguas. Sin embargo, el carbón activado natural es propenso a favorecer el crecimiento de los microorganismos en el agua (Zhang et al., 2017).

En algunas regiones del mundo, el ion fluoruro está presente en aguas subterráneas, así como en superficiales. Algunos efectos de la ingesta constante de aguas con altas concentraciones de fluoruro son la fluorosis dental y esquelética, las caries dentales y diversas lesiones en glándulas endócrinas (Zhang et al., 2017). Debido a la importancia de mantener los niveles de fluoruros por debajo del límite, diversos métodos han sido aplicados para la desfluorización del agua. El uso de carbonizado de hueso de animales es una opción favorable para la remoción de fluoruros en el agua ya que es un material de bajo costo y su capacidad de adsorción no es afectada por la presencia de otros aniones a excepción del carbonato (Medellín-Castillo et al., 2007). Los hidrogeles han generado el interés de la comunidad científica debido a su habilidad para remover iones de soluciones acuosas. Los hidrogeles son redes tridimensionales entrecruzadas de polímeros con propiedades hidrofílicas debido a la presencia de grupos $-OH$, $-COOH$, $-CONH_2$ y NH_2 en su estructura. Estos materiales, son capaces de absorber grandes cantidades de líquidos. Para su preparación se necesita de un monómero, un iniciador y un agente entrecruzante (Ahmed, 2015). Los hidrogeles en estado deshidratado son cristalinos. El presente estudio tiene como objetivos: (1) establecer una metodología de síntesis de un hidrogel a base de quitosano reticulado con formaldehído; (2) definir los efectos de las variables de síntesis como la concentración del quitosano y del ácido acético sobre la remoción de fluoruros y bromuros; (3) analizar la eficiencia del hidrogel para la eliminación de fluoruros y bromuros de soluciones acuosas.

MARCO TEORICO

La eliminación de sustancias nocivas para la salud en soluciones acuosas es posible gracias al fenómeno superficial conocido como adsorción, el cual consiste en la retención de una sustancia sobre la superficie de un sólido generalmente poroso. Se le llama adsorbato a la sustancia que es adsorbida y puede ser una molécula o un ion. En contraste, se le conoce como adsorbente a la superficie sobre la cual es retenido el adsorbato. En este estudio, el hidrogel actúa como adsorbente ya que sobre su superficie se da la acumulación preferencial de los iones F^- y Br^- . Actualmente, los hidrogeles pueden ser utilizados en diversas aplicaciones como materiales absorbentes y/o adsorbentes, microcápsulas, recubrimientos, ligantes de productos farmacéuticos, etc. Los hidrogeles están compuestos de monómeros, los cuales son moléculas de bajo peso molecular que forman macromoléculas llamadas polímeros. Entre los polímeros biodegradables se encuentra el quitosano, el cual es un polisacárido lineal que proviene de la quitina, la cual conforma los exoesqueletos de los crustáceos. Existen diferentes tipos de síntesis de un hidrogel como la polimerización en bulto, polimerización en solución con agente entrecruzante, polimerización en suspensión, polimerización mediante irradiación y mediante injertos sobre una superficie, (Ahmed, 2015). Los hidrogeles se pueden clasificar en dos categorías basadas en el tipo de entrecruzamiento entre sus redes:

entrecruzamiento químico y entrecruzamiento físico. La primera categoría se caracteriza porque sus redes se unen permanentemente y las redes de la segunda categoría son temporales, las cuales surgen de entrelazamientos de las cadenas de polímeros o interacciones como las interacciones iónicas, enlaces de hidrógeno, o interacciones hidrofóbicas (Ahmed, 2015). El método de entrecruzamiento químico parece ser mejor debido a la fuerza entre las redes poliméricas del hidrogel en presencia de una solución acuosa. El entrecruzamiento químico se realizó con formaldehído y el ácido acético actuó como iniciador.

MÉTODOS Y MATERIALES

En este estudio se utilizó quitosano con grado de desacetilación del 99.9 % proporcionado por la empresa Sigma Aldrich, el ácido acético grado analítico fue suministrado por la empresa GOLDEN BELL y el formaldehído al 37% de pureza por la empresa CTR SCIENTIFIC. La síntesis del hidrogel se realizó basándose en la metodología reportada por Sadeghi et al. (2016) mediante el entrecruzamiento del quitosano usando como agente entrecruzante el formaldehído. Se sintetizaron 27 muestras de hidrogeles variando la concentración de ácido acético CH_3COOH (1, 5 y 10 % v/v), quitosano (1, 2 y 3% p/v) y formaldehído (1, 3 y 10% v/v). Los hidrogeles se sintetizaron de acuerdo a lo siguiente: una determinada cantidad de quitosano fue pesado y agregada a la respectiva solución de ácido acético. Después, las mezclas se agitaron manualmente hasta que el quitosano se disolvió completamente. Diferentes cantidades de formaldehído (1, 3 y 5 mL) fueron agregadas a la solución de quitosano y ácido acético. Enseguida, las muestras se agitaron manualmente por 10 minutos. Posteriormente, los hidrogeles se colocaron en una estufa con aire circundante a 25°C por 24 horas y después a 60 °C por 24 horas para finalmente ser enjuagados con agua desionizada y así remover las impurezas producidas durante el proceso de preparación alcanzando un rango de pH entre 5 y 6.

Las pruebas del equilibrio de adsorción en lote para determinar la eficiencia de cada uno de los 27 hidrogeles sintetizados en la remoción de fluoruros y bromuros en solución acuosa se realizaron mediante el procedimiento siguiente. En viales de centrifuga con capacidades de 50 mL se transfirieron 30 mL de una solución de Br^- de 100 mg/L y a cada vial se le agregó 0.05 gramos de hidrogel en estado cristalino. Para el caso de la remoción de fluoruros, se transfirió el mismo volumen en los viales pero la solución de fluoruros era de 10 mg/L a cada uno de los viales y se les agregó 0.05 gramos de hidrogel de cada hidrogel. Los viales con las soluciones se transfirieron a un baño termostático que se mantuvo a 25°C. Las soluciones y los adsorbentes se dejaron en contacto hasta alcanzar el equilibrio. Los experimentos se dejaron 5 días para alcanzar el equilibrio. Los experimentos se realizaron a un pH constante de 5, se midió periódicamente el pH utilizando un pHmetro *Thermo SCIENTIFIC, modelo Orion 3 STAR* y se ajustó adicionando soluciones 0.01 y 0.1 N de HCl ó NaOH. La capacidad de adsorción de fluoruros o bromuros de los hidrogeles se calculó por medio de un balance de masa que se representa matemáticamente como:

$$q = \frac{(C_0 - C_f)V}{m} \quad (1)$$

Donde q es la masa de fluoruro o bromuro adsorbido por unidad de masa de adsorbente (mg/g), C_0 es la concentración inicial de bromuro o fluoruro (mg/L), C_f la concentración final de bromuro o fluoruro (mg/L), V es el volumen total de las soluciones de bromuros o fluoruros (L) y m la masa del material adsorbente (g).

Las concentraciones finales de fluoruro y bromuro en solución acuosa se determinaron por un método potenciométrico directo que se basa en la comparación del potencial producido por el electrodo ion selectivo al ion F^- o Br^- en una solución problema con el potencial que se obtiene cuando se sumerge el mismo electrodo en una solución patrón. La concentración de los iones se determinó mediante una curva de calibración la cual se preparó con 6 soluciones estándares de concentraciones de 1, 3, 5, 8, 10 y 12 mg/. Por otro lado, para la cuantificación de bromuros en solución acuosa se prepararon 8 soluciones estándares 5, 10, 20, 50, 80, 100 y 150 mg/L para generar la curva de calibración. Los datos de las curvas de calibración se ajustaron por medio de la siguiente ecuación:

$$\log C = a(mV_{\text{rel}}) + b \quad (2)$$

Donde a y b son las constantes de ajuste, C es la concentración de los iones (mg/L) y mV_{rel} es el potencial medido. Para la identificación de los grupos funcionales de los hidrogeles se utilizó la técnica de espectroscopía de infrarrojo. Los espectros infrarrojo IR de los hidrogeles en estado deshidratado se obtuvieron utilizando un espectrofotómetro de infrarrojo *Thermo SCIENTIFIC, modelo NICOLET iS10* que cuenta con la técnica de reflectancia total atenuada (ATR). Las muestras se molieron hasta un tamaño muy fino y se montaron como una película delgada sobre el portamuestras del equipo. El análisis se efectuó en un rango de longitud de onda de 4000 a 500 cm^{-1} y con una resolución de 4 cm^{-1} y 32 escaneos. El espectro del quitosano se comparó con el espectro del hidrogel más eficiente sin adsorbato y con los dos tipos de adsorbato.

RESULTADOS

En la Figura 1 se puede observar una fotografía de 9 hidrogeles sintetizados con ácido acético 1%, quitosano 1, 2 y 3% p/v (de izquierda a derecha aumenta la concentración de quitosano) y formaldehído 1, 3 y 10% v/v (de arriba a abajo aumenta la concentración de formaldehído). Los 9 hidrogeles se muestran en estado cristalino después de haber sido secados a 60°C por 24 horas. Se apreció que los hidrogeles con menor concentración de formaldehído tienen un aspecto transparente y forman películas finas; mientras que los que tienen una mayor concentración de formaldehído son de forma granular de color dorado. La concentración del quitosano solo afectó el color del hidrogel y la concentración de ácido acético no afectó el aspecto de los hidrogeles y por ende la apariencia de los hidrogeles con 5% y 10% de ácido fue similar.

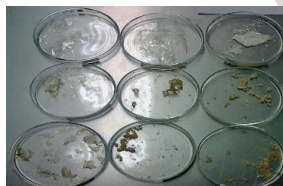


Figura 1. Hidrogeles en estado cristalino

Los resultados de las pruebas de capacidad de remoción de fluoruros o bromuros revelaron que el mejor hidrogel para la retención de mayor cantidad de F^- o Br^- en su superficie fue con una concentración 10% ácido acético, 3% quitosano y 1% formaldehído. En las Figuras 2 y 3 se puede observar que a mayor concentración de quitosano, se

incrementa la capacidad de remoción de fluoruros y bromuros y con respecto al agente entrecruzante a una concentración más baja se logró una mejor remoción. En general, la concentración del ácido acético no afectó la retención de los iones sobre la superficie del hidrogel.

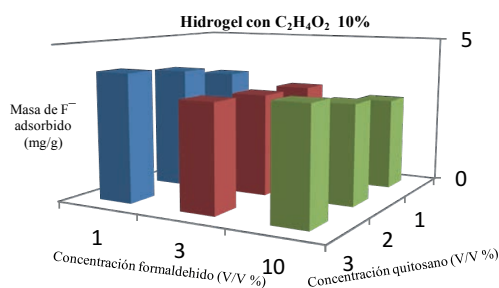


Figura 2. Hidrogel con C₂H₄O₂ 10% usados en la remoción de F⁻.

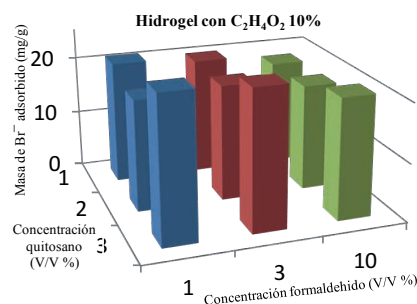


Figura 3. Hidrogel con C₂H₄O₂ 10% usados en la remoción de Br⁻.

El análisis por espectroscopía infrarroja permitió obtener información sobre los grupos funcionales que están presentes en los hidrogeles o en los cuales se presentaron modificaciones debido a la remoción de F⁻ y Br⁻ sobre los hidrogeles. En la Figura 4 se muestran los picos característicos del quitosano, los cuales están localizados aproximadamente a 3356.57 cm⁻¹ que está relacionado con el grupo hidroxilo, a 1375.25 cm⁻¹ se detecta la presencia del grupo amino. A 1649.90 cm⁻¹ se observa una banda característica relacionada con la vibración que produce el estiramiento del grupo carbonilo de igual forma a 1026.49 cm⁻¹ se apreció un alargamiento C-O. En la Figura 5 se muestran los picos característicos del hidrogel con una concentración 10% ácido acético, 3% quitosano y 1% formaldehído. La mayoría de los picos son similares al espectro infrarrojo del quitosano, con excepción de un pico a 1557.37 cm⁻¹ que se produce por los enlaces imino formados por el proceso de entrecruzamiento entre los grupos amino del quitosano y el grupo aldehído del formaldehído.

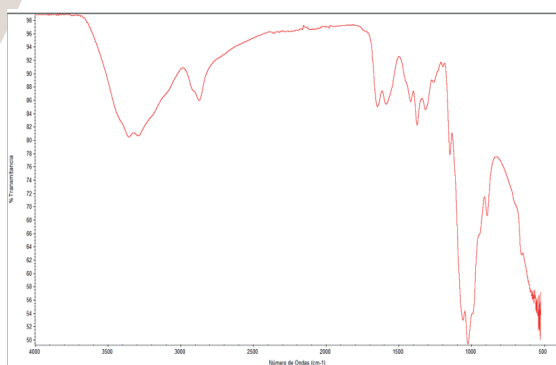


Figura 4. Espectro infrarrojo del quitosano

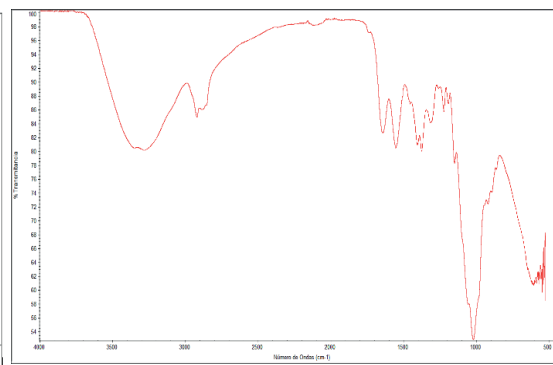


Figura 5. Espectro infrarrojo del hidrogel 10%, 3%, 1%

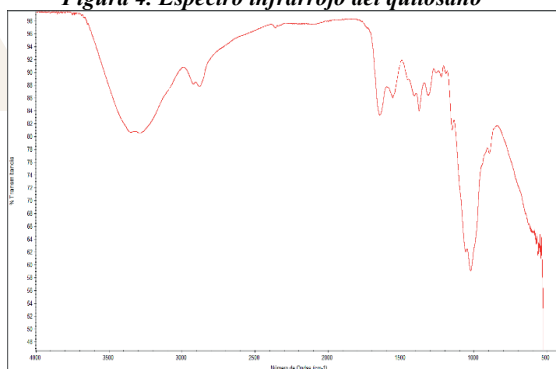


Figura 6. Espectro infrarrojo del hidrogel con Br-

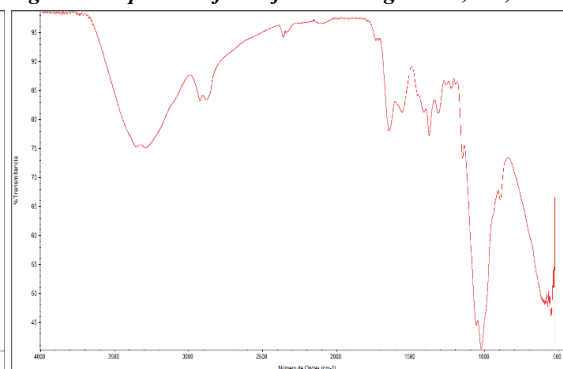


Figura 7. Espectro infrarrojo del hidrogel con F-

En la Figura 6 y Figura 7 se muestran los espectros del hidrogel saturados con bromuros y fluoruros, respectivamente, en ellos se puede observar que son similares al espectro de la Figura 5 a excepción de un pico largo a 1550 cm⁻¹ en donde se aprecian cambios debido a la interacción de estos aniones con los grupos imino de los hidrogeles.

CONCLUSIONES

Los hidrogeles de quitosano reticulados con formaldehído fueron sintetizados en este estudio mediante la polimerización en solución con agente entrecruzante (formaldehído) variando la concentración del formaldehído, del mismo polímero (quitosano) y del ácido acético. El hidrogel sintetizado con una concentración de 10 % de ácido acético, 3% quitosano y 1% formaldehído fue el que presentó la mayor capacidad de adsorción de fluoruros y bromuros en solución acuosa. Los hidrogeles fueron más efectivos al aumentar la concentración del quitosano y al disminuir la del formaldehído. El ácido acético no tuvo efecto sobre la capacidad de remoción de estos materiales.

BIBLIOGRAFIA

Artículos en línea

- AHMED, E. M. (2015). "Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review" en *Journal of Advanced Research*, Vol. 6, pp. 105–121. Consultada en <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2090123213000969> (fecha de consulta 07-06-2017).
- CUI, M., CHOI, J., LEE, Y., MA, J., KIM, D., CHOI, J., ... KHIM, J. (2017). "Significant enhancement of bromate removal in drinking water: Implications for the mechanism of sonocatalytic reduction" en *Chemical Engineering Journal*, Vol. 317, pp. 404–412. Consultada en <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1385894717302103> (fecha de consulta 15-06-2017).
- DING, L., DENG, H., WU, C., & HAN, X. (2012). "Affecting factors, equilibrium, kinetics and thermodynamics of bromide removal from aqueous solutions by MIEEX resin" en *Chemical Engineering Journal*, Vol. 181–182, pp. 360–370. Consultada en <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1385894711014987> (fecha de consulta 20-06-2017).
- GONG, C., ZHANG, Z., QIAN, Q., LIU, D., CHENG, Y., & YUAN, G. (2013). "Removal of bromide from water by adsorption on silver-loaded porous carbon spheres to prevent bromate formation" en *Chemical Engineering Journal*, Vol. 218, pp. 333–340. Consultada en <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1385894712017093> (fecha de consulta 05-06-17).
- MEDELLIN-CASTILLO, N. A., LEYVA-RAMOS, R., OCAMPO-PEREZ, R., DE LA CRUZ, R. F. G., ARAGON-PIÑA, A., MARTINEZ-ROSALES, J. M., ... FUENTES-RUBIO, L. (2007). "Adsorption of fluoride from water solution on bone char" en *Industrial and Engineering Chemistry Research*, Vol. 46(26), pp. 9205–9212. Consultada en https://www.researchgate.net/profile/Antonio_Aragon-Pina/publication/224922136_Adsorption_of_Fluoride_from_Water_Solution_on_Bone_Char/links/00b7d5363d18daa1c5000000.pdf (fecha de consulta 5-07-2017).
- SADEGHI, M., HANIFPOUR, F., TAHERI, R., JAVADIAN, H., & GHASEMI, M. (2016). "Comparison of using formaldehyde and carboxy methyl chitosan in preparation of Fe₃O₄ superparamagnetic nanoparticles-chitosan hydrogel network: Sorption behavior toward bovine serum albumin". en *Process Safety and Environmental Protection*, Vol. 102, pp. 119–128. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0957582016000550> (fecha de consulta 05-07-2017).
- ZHANG, J., CHEN, N., SU, P., LI, M., & FENG, C. (2017). "Fluoride removal from aqueous solution by Zirconium-Chitosan/Graphene Oxide Membrane" en *Reactive and Functional Polymers*, Vol. 114, pp. 127–135. Consultada en <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1381514817300494> (fecha de consulta 24-06-2017).

DINÁMICA DE MEZCLAS AZEOTRÓPICAS CUATERNARIAS CON MAPAS DE RESIDUO

Bernardo Valadéz Hernández¹ y Raúl González-García²

RESUMEN

Es de suma importancia entender el comportamiento de mezclas multicomponente antes de comenzar con el modelado de procesos de separación. En este trabajo, se hace uso de la dinámica de sistemas para determinar puntos azeotrópicos y analizar el comportamiento de la mezcla cuaternaria Metanol-Benceno-Acetona-Cloroformo cuando la presión de operación cambia. Además, se obtienen las *manifolds* que definen las regiones de destilación y las trayectorias de las curvas de residuo dentro de diagramas cuaternarios. Las propiedades termodinámicas necesarias son obtenidas utilizando el modelo NRTL para calcular los coeficientes de actividad en fase líquida y la ecuación de Antoine para la presión de vapor. Los cálculos se hacen utilizando rutinas programadas en el software MATLAB® y adaptadas al toolbox Matcont®. Se presenta el estudio del sistema en gráficas de la composición de cada componente en función del parámetro de operación, la presión. Se encuentran seis colapsos (bifurcaciones) a diferentes presiones, cinco a presiones por debajo de 6 atm y una por encima de 11 atm.

ABSTRACT

It is very important to understand the behavior of multicomponent mixtures before starting modeling separation processes. In this work system dynamics are used to determine azeotropic points and to analyze the behavior of the Methanol-Benzene-Acetone-Chloroform mixture when the operating pressure changes. Besides, the manifolds that define the distillation regions and the trajectories of the residue curves within quaternary diagrams are obtained. Necessary thermodynamic properties are obtained using the NRTL model and the Antoine equations for the vapor pressure. Calculations are made using routines programmed in MATLAB® and adapted to the Matcont® toolbox. The study of the system is presented in graphs of the composition of each component as a function of the operation parameter, the pressure. Are found six collapses (bifurcations) at different pressures, five at pressures below 6 atm and one at over 11 atm.

Palabras clave: Puntos fijos, Equilibrio vapor-líquido, Azeótropos, Curvas de residuo, Análisis de bifurcaciones.

INTRODUCCIÓN

La destilación de mezclas homogéneas es el proceso de separación más utilizado en la industria química [3], ya que en ello se tiene mayor experiencia, es el más estudiado y tiene un gran desarrollo tecnológico. La destilación, en la mayoría de veces, involucra mezclas de más de dos componentes, lo que hace que el análisis del sistema sea un tanto complejo, especialmente cuando se tratan mezclas no-ideales. El diseño conceptual de los equipos de destilación requiere conocer con exactitud las características del equilibrio líquido – vapor (ELV) del sistema en cuestión. Especialmente, se debe tomar en cuenta la existencia de puntos azeotrópicos y las regiones de destilación [4]. En general, un estado azeotrópico es aquel en que la transferencia de masa ocurre entre las fases LV y las composiciones y muchas otras propiedades son idénticas entre las dos fases [2]. La presencia de azeótropos en una mezcla hace difícil lograr ciertas separaciones porque aparecen fronteras de destilación que limitan el proceso. Los azeótropos se conectan por las fronteras de destilación (*manifolds*) que dividen el espacio-fase de composiciones en regiones bien definidas. Dentro de estas regiones, las curvas de residuo (trayectorias) que inicien dentro de ellas permanecerán dentro de la región sin cruzar las fronteras de destilación [1, 3].

Las curvas de residuo representan la composición de la fase líquida residual. Cada curva siempre comienza y termina en un vértice de componente puro o un azeótropo [5]. Una manera de entender el comportamiento de las mezclas azeotrópicas es de forma gráfica, construyendo mapas de curvas de residuo [3] ya que estos permiten vislumbrar el tipo de comportamiento que tendrían tanto las especies puras, así como los puntos azeotrópicos. Los mapas de residuo proveen de una herramienta gráfica para predecir cualitativamente las separaciones factibles de mezclas azeotrópicas multicomponente, antes de realizar una simulación detallada o un estudio experimental de destilación [2].

Por todo lo anterior, el siguiente trabajo presenta el análisis del comportamiento de la mezcla cuaternaria compuesta de Metanol-Benceno-Acetona-Cloroformo. Se determinan los puntos azeotrópicos, las regiones de destilación y las curvas de residuo.

La cantidad de puntos azeotrópicos en una mezcla determina la dificultad de la separación; como es de esperar, mientras que la mezcla tenga más puntos azeotrópicos, habrá un mayor número de fronteras de destilación y su separación se tornará más difícil. En mezclas en las que existen varios puntos azeotrópicos, éstos pueden colapsar y desaparecer si se cambia la presión de operación del equipo de separación, tornando más fácil su separación; es por ello que también se presenta un análisis de bifurcaciones de los puntos azeotrópicos para la mezcla cuaternaria Metanol-Benceno-Acetona-Cloroformo cuando la presión de operación cambia.

METODOLOGÍA

El concepto de destilación simple es importante en el estudio de azeótropos ya que a partir de su análisis dinámico se pueden determinar los puntos azeotrópicos de la mezcla y las fronteras de destilación, así como muchas otras propiedades que de manera experimental serían muy difíciles de obtener. El producto por destilar se carga en un

recipiente (Figura 1), donde se calienta a presión y flujo de calor constantes, formando dos fases, vapor y líquido, en equilibrio. El sistema de interés es el contenido de líquido dentro del recipiente en cualquier instante.

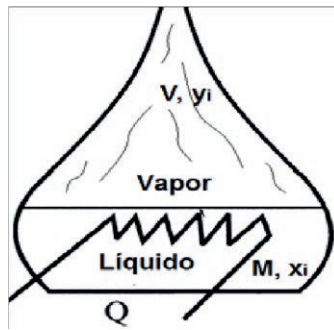


Figura 1. Destilación simple

Aplicando los balances de masa a los c componentes y sabiendo que las fracciones másicas suman la unidad, se obtiene el siguiente modelo dinámico del sistema:

$$\frac{dx_i}{d\tau} = (1 - K_i)x_i \quad \text{para } i = 1, 2, \dots, c - 1 \quad (1)$$

$$\frac{dM}{d\tau} = -M \quad (2)$$

A presión constante, K_i solo dependerá de la composición, M es la cantidad de líquido retenida en el recipiente en cada instante y τ es un tiempo adimensional. El equilibrio de las fases líquido - vapor es alcanzado cuando se igualan los potenciales en ambas fases. En este trabajo se consideran ciertas simplificaciones en ambas fases, por lo que se trabaja con la ecuación de Raoult modificada:

$$K_i \equiv \frac{y_i}{x_i} = \frac{y_i^L P_i^{vap}}{P} \quad (3)$$

Donde y_i^L se obtiene por NRTL (Non-Random-Two-Liquid) y la P_i^{vap} por la ecuación de Antoine.

Es suficiente estudiar solamente el Sistema de Ecuaciones Diferenciales Ordinarias (SEDO) de la Ecuación 1 ya que la Ecuación 2 queda desacoplada. La definición de los *puntos azeotrópicos* concuerda exactamente con la definición de los *puntos fijos* de la Ecuación 1, los cuales son obtenidos al resolverla en el estado estacionario:

$$(1 - K(x^*))_i x_i^* = 0 \quad \text{para } i = 1, 2, \dots, c - 1 \quad (4)$$

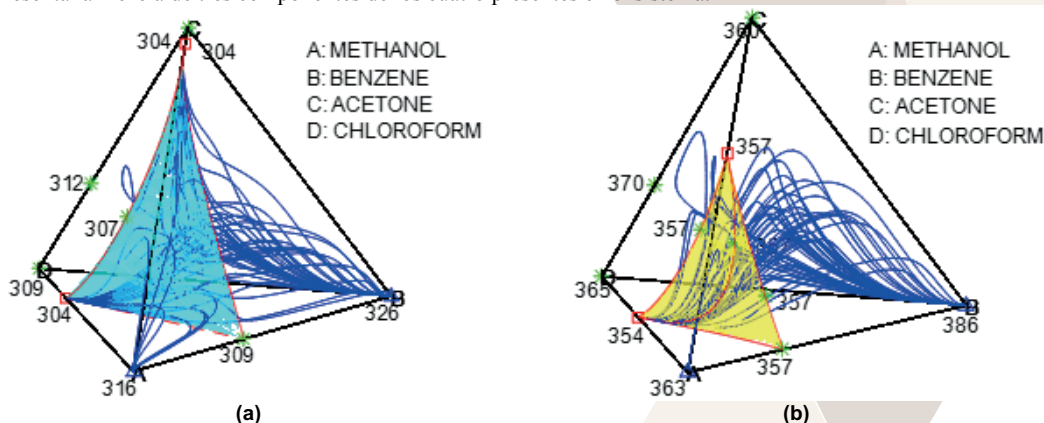
El tipo de punto fijo (estable, inestable o ensilladura) se obtiene de los *valores característicos* de la matriz *Jacobiana* obtenida de la Ecuación 4. El punto fijo es *estable* si todos los *valores característicos* tienen parte real negativa; es *inestable* si todos los valores característicos tienen parte real positiva, y es tipo *ensilladura* si tiene parte real tanto positiva como negativa.

Las curvas de residuo representan la evolución de las composiciones x_i respecto del tiempo al integrar la Ecuación 1. Las *fronteras de destilación* son trayectorias que parten de los puntos fijos de tipo *ensilladura* en la misma dirección que marcan los vectores característicos de la matriz Jacobiana de la Ecuación 4, y terminan en otro punto fijo.

El modelo dinámico de la Ecuación 1 junto con la Ecuación 3 es programado en Matlab® y se acopla al toolbox de continuación Matcont® para llevar a cabo el estudio de bifurcaciones cuando la presión cambia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 2 se muestran los diagramas cuaternarios de la mezcla Metanol-Benceno-Acetona-Cloroformo a diferentes presiones y se presenta toda la información dinámica no lineal. En cada diagrama las líneas de color rojo representan los contornos de las superficies separatrices y las líneas de color azul representan las curvas de residuo. Los puntos cuadrados de color rojo representan puntos fijos inestables; los puntos triangulares de color azul representan los puntos fijos estables; los puntos asterisco de color verde representan puntos fijos de tipo ensilladura; cerca de cada punto se encuentra la temperatura del punto azeotrópico en K. Cada una de las caras del diagrama cuaternario representa la mezcla de tres componentes de los cuatro presentes en el sistema.



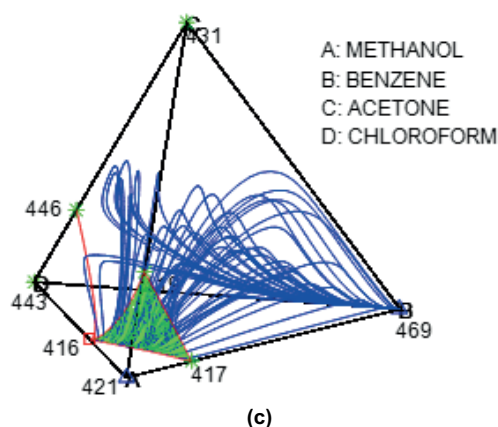


Figura 2. Diagramas cuaternarios en que se muestra el comportamiento dinámico a diferentes presiones: (a) $P=0.4$ atm, (b) $P=2.5$ atm y (c) $P=13.0$ atm.

Como se observa en los diagramas de la Figura 2, cada uno se encuentra separado por una superficie que lo divide en dos regiones de destilación. Las curvas de residuo se dirigen al punto estable dentro de la región en la que se encuentren y no cruzan la superficie que las separa. Las trayectorias presentes en las dos regiones permiten determinar que los productos más factibles de obtener son el benceno y el metanol, según la región en la que se opere.

Se puede observar que la estructura del sistema cambia con la presión, las dos regiones de destilación cambian en tamaño y la superficie que las separa es más pequeña en el diagrama a mayor presión.

El total de puntos fijos también cambio con la presión, la cantidad de puntos aumenta de 9 puntos a 0.4 atm hasta 11 puntos a 2.5 atm y vuelve a disminuir a 8 puntos en 11 atm, los puntos presentes deben de bifurcarse a una presión menor de 2.5 atm y volver a colapsar a una presión mayor. Debido a esto se tiene la certeza de que el sistema debe tener varios puntos de bifurcación entre los valores de presión expuestos.

Para determinar los puntos de bifurcación presentes se lleva a cabo un análisis de bifurcaciones haciendo uso del toolbox Matcont®. En la Tabla 1 se presenta un resumen de los resultados del análisis. En la Figura 4 se observan las trayectorias de los puntos fijos cuando se varía la presión en la que los puntos asterisco de color rojo indican la ubicación de los puntos de bifurcación dentro del diagrama cuaternario. En la Figura 5 se muestra el cambio en las composiciones de los puntos fijos respecto a la presión, las líneas verticales punteada de color azul corresponden a las bifurcaciones presentes. Para la Figura 4 y la 5 las líneas continuas corresponden a los puntos azeotrópicos estables, las líneas discontinuas a los puntos de tipo ensilladura y las líneas punteadas a puntos inestables.

Tabla. 1. Bifurcaciones

BIFURCACIÓN	1		2		3	
PRESIÓN (ATM)	0.306		0.510		1.414	
EIGENVALORES	ANTES	DESPUÉS	ANTES	DESPUÉS	ANTES	DESPUÉS
	0.0048	-0.0101	-0.2834	-0.2803	-0.4785	-0.4737
	0.4177	0.4130	0.001	-0.0014	-0.0021	0.001
	0.6137	0.6107	0.5763	0.5735	0.7487	0.7469
	1	1	1	1	1	1
BIFURCACIÓN	4		5		6	
PRESIÓN (ATM)	3.709		5.127		11.363	
EIGENVALORES	ANTES	DESPUÉS	ANTES	DESPUÉS	ANTES	DESPUÉS
	-0.0312	-0.0309	0.0004	-0.0002	-0.1287	-0.1290
	-0.0014	0.0008	0.1283	0.1277	0.0002	-3.7E-05
	0.4114	0.4091	0.2567	0.2566	0.2106	0.2105
	1	1	1	1	1	1

Como se puede observar existen seis bifurcaciones en el sistema. La primera de ellas ocurre a 0.3062 atm. El punto inestable en (0 0 1 0) se divide en dos puntos: uno inestable que se moverá sobre la arista de la mezcla Metanol-Acetona y otro de tipo ensilladura que se mantiene en (0 0 1 0). Los eigenvalores para el punto en el vértice cambian de tener todos los valores positivos a tener un valor negativo en la primera posición.

En la segunda bifurcación a 0.510 atm, el punto azeotrópico de tipo ensilladura que se encuentra en la cara de la mezcla Metanol-Acetona-Cloroformo se bifurca en dos puntos de tipo ensilladura. Uno se sigue moviendo sobre la cara y el otro se vuelve un azeótropo cuaternario que se mueve dentro del diagrama cuaternario. En este punto de bifurcación los eigenvalores para el punto fijo en la cara Metanol-Acetona-Cloroformo cambian de tener un valor negativo en la primera posición a tenerlo también en la segunda.

Para la tercera bifurcación a 1.414 atm, el punto azeotrópico que se encuentra en la arista de los componentes Metanol-Benceno se bifurca en dos puntos de tipo ensilladura, uno se mueve a lo largo de la arista y el otro a través de la cara Metanol-Benceno-Acetona. Los eigenvalores para el punto fijo cambian de tener el valor negativo en las primeras dos posiciones a tenerlo solo en la primera.

En la cuarta bifurcación a 3.709 atm, el punto fijo de tipo ensilladura que se encuentra en la cara Metanol-Benceno-Acetona y el punto fijo cuaternario de tipo ensilladura dentro del diagrama colapsan en uno solo, y continúa

moviéndose a través de la cara Metanol-Benceno-Acetona. Los eigenvalores para este punto cambian de tener el valor negativo en la primera posición a tenerlo también en las dos primeras posiciones, por lo que el punto fijo continúa siendo de tipo ensilladura.

En la quinta bifurcación a 5.127 atm, el punto fijo que surgió del cuarto punto de bifurcación colapsa con el punto fijo inestable que se mueve a través de la arista de la mezcla Metanol-Acetona formándose un punto del tipo ensilladura que sigue moviéndose a través de esta arista. En este punto de bifurcación los eigenvalores para el punto en la arista cambian de tener todos los valores positivos a tener un valor negativo en la primera posición.

En el sexto punto de bifurcación a 11.363 atm, el último, el punto fijo que surgió del quinto punto de bifurcación colapsa con el punto fijo que se movía en la cara Metanol-Acetona-Cloroformo formando un punto fijo del tipo ensilladura que continúa moviéndose sobre la arista de la mezcla binaria Metanol-Acetona. Los eigenvalores cambian su valor negativo de la primera posición a las primeras dos.

En la Figura 3 se observa el cambio de la superficie que divide el diagrama cuaternario, el tamaño de esta superficie disminuye conforme se aumenta la presión, la superficie de mayor y menor tamaño corresponden a la presión de .4 y 13.0 atm respectivamente.

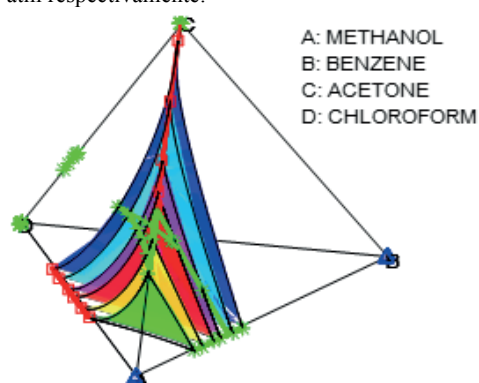


Figura 3. Diagrama cuaternario de superficies a diferentes presiones

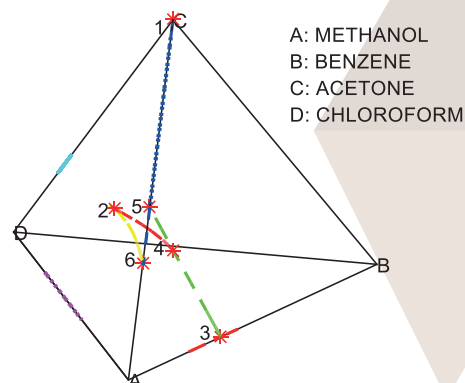


Figura 4. Movimiento de los puntos fijos y sus bifurcaciones

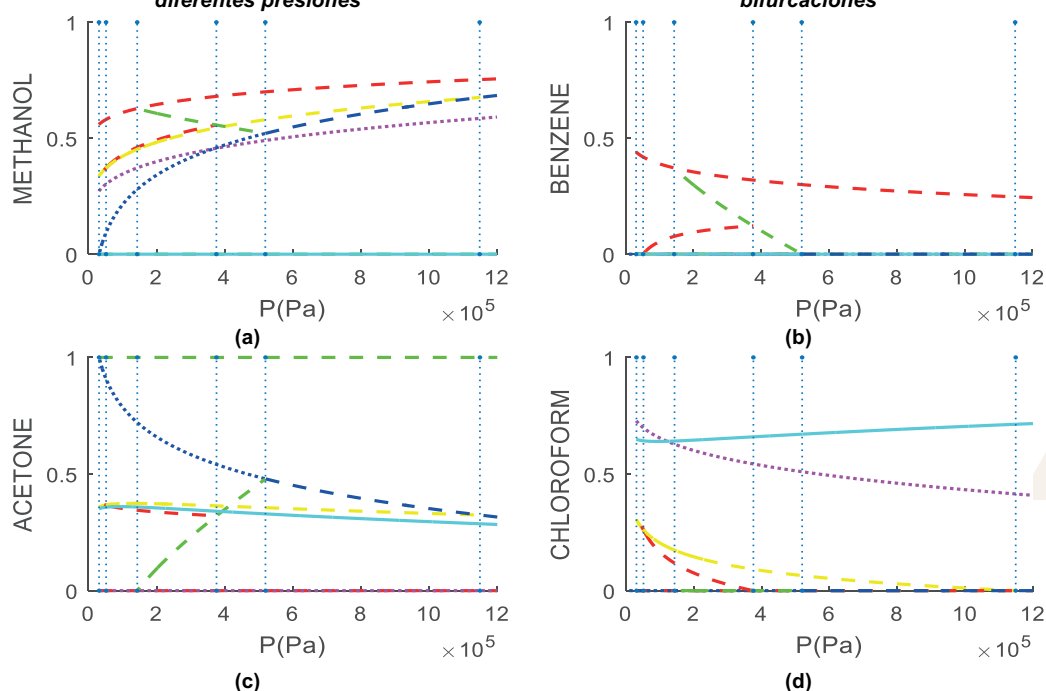


Figura 5. Cambio de las composiciones con respecto a la presión

CONCLUSIONES

Se ha realizado el estudio de bifurcaciones para la mezcla metanol-benceno-acetona-cloroformo. Por debajo de 6 atm se encuentra la mayoría de las bifurcaciones, se observa un aumento en la cantidad de puntos azeotrópicos después de 0.3 atm y una disminución después de 3.7 atm (cuarta bifurcación). Este tipo de análisis permite predecir la factibilidad de separar componentes de una mezcla, y conocer el comportamiento que tiene cuando se varía un parámetro de operación. En este sistema la separación del benceno es más factible a presiones relativamente altas, a presiones bajas o de vacío la separación del metanol tiene menos restricciones ya que la región de destilación en la que se encuentra tiene mayor tamaño, su separación tiene menos restricciones por lo que su factibilidad aumenta, pero aun así es menor que la separación del benceno. A presiones altas por encima de 45 atm la superficie que divide el diagrama desaparece por lo tanto las restricciones que impiden la separación se reducen. La presión a la que se debe trabajar está en función del componente que se quiera separar.

BIBLIOGRAFIA

Libros

1. DOHERTY, M. F.; MALONE, M. F. (2001). Conceptual Design of Distillation Systems. McGraw Hill.

Artículos de revista

- 
2. HILMEN, E. K.; KIVA, V. N.; SKOGESTAD S. (2002). "Topology of Ternary VLE Diagrams: Elementary Cells" en *American Institute of Chemicals Engineers*. 48, [pp. 752-759].
 3. KIVA, V. N.; HILMEN, E. K.; SKOGESTAD S. (2003). "Azeotropic Phase Equilibrium Diagrams: A Survey" en *Chemical Engineering Science*. 58, [pp. 1903-1953].
 4. PÖPKEN, T.; GMEJLING, J. (2004). "Simple Method for Determining the Location of Distillation Region Boundaries in Quaternary Systems" en *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 43, [pp. 777-783].
 5. DAVID B. VAN DONGEN; F. DOHERTY. (1985). "Design and synthesis of homogeneous azeotropic distillations. 1. Problem formulation for a single column" en *Industrial & Engineering Chemistry Fundamentals* 24 (4), [pp. 454-463].

SÍNTESIS DE AZIDAS AROMÁTICAS UTILIZANDO NUEVAS METODOLOGÍAS.

Francisca Johana Aguilar Costilla¹, Elisa Leyva Ramos¹ y Silvia Elena Loredó Carrillo¹.

RESUMEN

Las azidas orgánicas tienen un papel importante en la química, biología, medicina y ciencia de materiales. Se descomponen liberando nitrógeno molecular y generando intermediarios de tipo nitreno. Los nitrenos pueden llevar a cabo reacciones con importantes aplicaciones biológicas e industriales. Debido a la importancia de las azidas, es necesario desarrollar nuevas metodologías para su síntesis. En este trabajo se sintetizó *p*-nitrofenil azida, a partir de azida de sodio y diferentes nitrobenzenos sustituidos por un halógeno en posición *para*. Se utilizó un catalizador de transferencia de fase y como solvente una mezcla de DMF/agua. La reacción se llevó a cabo bajo diferentes condiciones. Se obtuvo el mejor rendimiento cuando se utilizó el 1-fluoro-4-nitrobenzeno como materia prima.

ABSTRACT

Organic azides have an important role in chemistry, biology, medicine and materials science. They decompose by releasing molecular nitrogen and generating intermediates of nitrene type. Nitrenes can carry out reactions with important biological and industrial applications. Due to the importance of azides, it is necessary to develop new methodologies for their synthesis. In this work *p*-nitrophenyl azide was synthesized from sodium azide and different nitrobenzenes substituted with a halogen in the *para* position. This reaction required a phase transfer catalyst and mixture of DMF/water as solvent. The reaction was carried out under different conditions. The best performance was obtained when 1-fluoro-4-nitrobenzene was used as a feedstock.

Palabras clave: azidas aromáticas, *p*-nitrofenil azida, catalizador de transferencia de fase, sustitución nucleofílica aromática.

INTRODUCCIÓN

Las azidas orgánicas fueron descubiertas hace más de 140 años por Peter Grieb [1]. Estos compuestos han demostrado tener un papel muy importante en la química, biología, medicina y ciencia de materiales. Tienen aplicaciones de gran importancia en química de péptidos, combinatoria y síntesis de heterociclos. Las azidas orgánicas han adquirido interés industrial debido a su uso en la síntesis de compuestos heterocíclicos y tetrazoles, los cuales son utilizados como fármacos. Las azidas presentan efectos de resonancia (figura 1) que generan diferentes moléculas dipolares, por lo que pueden actuar como nucleófilos y electrófilos, es por ello que pueden reaccionar de manera diferente según las condiciones de reacción [1].

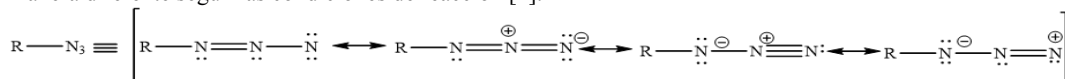


Figura 1. Estructuras en resonancia de las azidas orgánicas.

Las azidas aromáticas pueden descomponerse liberando nitrógeno molecular y dando lugar a intermediarios de tipo nitreno. Un nitreno contiene un átomo de nitrógeno neutro monovalente, con hibridación *sp*, además es muy reactivo, debido a que los compuestos más estables de nitrógeno presentan valencia tres [1]. Los nitrenos pueden llevar a cabo reacciones con importantes aplicaciones biológicas e industriales [2].

Por otro lado, las azidas aromáticas pueden llevar a cabo cicloadiciones al reaccionar con sustituyentes insaturados en posición *orto* a la azida, al descomponerse fotoquímica o térmicamente forman el heterociclo correspondiente con pérdida de nitrógeno gas. Los benzofuroxanos son formados a partir de esta reacción, donde se lleva a cabo un proceso electrocíclico [1], estos compuestos están formados por un anillo de benceno que se encuentra fusionado a un anillo furoxano. Los benzofuroxanos actúan como agentes antibacteriales y antifúngicos [1].

Las azidas alifáticas se pueden obtener mediante la sustitución nucleofílica de un haluro de alquilo con azida de sodio (NaN_3) en solventes como dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO) o agua [3]. Otra forma de obtención es mediante una adición 1,4 tipo Michael con cetonas α , β insaturadas y utilizando como fuente del grupo azida el trimetilsilil azida (Me_3SiN_3) en ácido acético (CH_3COOH) [3]. Estas azidas se descomponen violentamente liberando nitrógeno (N_2), sin embargo al aumentar su peso molecular se hacen más estables.

Las azidas aromáticas se pueden obtener por varias metodologías. La más utilizada, consiste en la preparación de sales de diazonio a partir de anilinas con nitrito de sodio ($NaNO_2$) en medio ácido y su posterior reacción con NaN_3 . Sin embargo, en esta metodología se utilizan ácidos muy fuertes por lo que su aplicación es limitada. Otro método de obtención menos utilizado es mediante una sustitución nucleofílica aromática de un halógeno por el grupo azida que es el proceso que se estudia en este trabajo. [3-5].

Las azidas aromáticas tienen un amplio rango de aplicaciones, por lo que es de gran importancia desarrollar nuevos métodos de síntesis, más rápidos, eficientes y amables con el medio ambiente. El objetivo central de esta investigación es desarrollar una nueva metodología para la síntesis de azidas aromáticas, haciendo uso de tetrafluoroborato de tetraetilamonio como catalizador de transferencia de fase y determinar las condiciones adecuadas para llevar a cabo la reacción, de manera que se obtengan buenos rendimientos.

Se sintetizó *p*-nitrofenil azida a partir de azida de sodio y nitrobenenos *p*-halogenados. Un átomo de halógeno presenta una elevada electronegatividad y por lo tanto el carbono unido a este tiene un comportamiento electrofílico, de esta manera se puede llevar a cabo la sustitución del halógeno por el grupo azida, la cual actúa como un nucleófilo. Por otra parte, la presencia del grupo nitro, el cual es un electrotractor, favorece la reacción. Los grupos nitro son los mejores sustituyentes en la sustitución nucleofílica aromática [1].

La presencia del catalizador de transferencia de fase favorece que la reacción se lleve a cabo, disminuyendo la energía de activación de la misma. La azida de sodio al solubilizarse en agua genera los iones N_3^- y Na^+ , sin embargo la materia prima (*p*-halógeno nitrobeneno) es soluble en solventes orgánicos e insoluble en agua, lo que desfavorece la reacción. El tetrafluoroborato de tetraetilamonio, el cual es soluble en agua, genera el catión tetraetilamonio que a su vez es soluble en solventes orgánicos, al tener una carga positiva se genera atracción entre este ión y la azida (N_3^-) que actúa como nucleófilo. De esta manera, es posible que la azida pase a la fase orgánica donde se encuentra la materia prima, favoreciendo la reacción y llevándose a cabo una sustitución nucleofílica aromática del halógeno por la azida, produciendo *p*-nitrofenil azida. El halógeno, al tener una carga negativa, se une al ión Na^+ , dando lugar a una sal, la cual es soluble en agua.

METODOLOGÍA

Los reactivos utilizados fueron marca sigma-aldrich con una pureza superior al 98% y los solventes fueron grado reactivo de la marca Fermont. Para la obtención de *p*-nitrofenil azida (figura 2) se llevaron a cabo varias reacciones con azida de sodio y los siguientes nitrobenenos: 1-fluoro-4-nitrobeneno, 1-cloro-4-nitrobeneno y 1-bromo-4-nitrobeneno (1A-1C), además se hizo uso de tetrafluoroborato de tetraetilamonio como catalizador de transferencia de fase. Como solvente, primero se utilizó una mezcla de acetona/agua y posteriormente DMF/agua. La reacción se calentó en baño de agua y se monitoreó por cromatografía en capa fina (CCF) empleando como fase móvil una mezcla hexano/acetato de etilo (9:1).

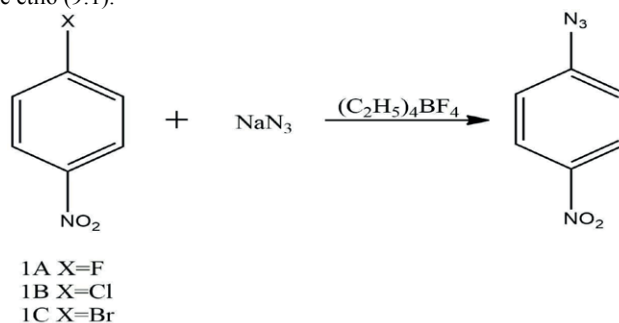


Figura 2. Síntesis de *p*-nitrofenil azida.

Primero se determinaron las condiciones óptimas de la reacción como el solvente y la temperatura. En un matraz balón de 100 mL se colocaron 4 mL de acetona y 1 mL de agua destilada, posteriormente se agregaron 0.1 mmol (0.022 g) de tetrafluoroborato de tetraetilamonio. La mezcla se agitó durante 10 minutos, enseguida se agregaron 1 mmol (0.15 mL) de 1-fluoro-4-nitrobeneno (1A) y 1.2 mmol (0.078 g) de azida de sodio. El matraz balón se colocó en baño de agua a diferentes temperaturas y con agitación constante. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 6 días, a 40°C y a 60°C por 8 horas. Fue monitoreada por CCF y se empleó como referencia una muestra de *p*-nitrofenil azida previamente sintetizada. En ningún caso se observó la formación del producto deseado.

Posteriormente, se utilizó una mezcla de DMF/agua como solvente y como materia prima se emplearon diferentes nitrobenenos *p*-halogenados (1A-1C). En un matraz balón se colocaron 4 mL de DMF y 1 mL de agua destilada, enseguida se agregaron 0.1 mmol (0.022 g) de tetrafluoroborato de tetraetilamonio (catalizador de transferencia de fase) y la mezcla se colocó sobre una placa de agitación durante 10 minutos. Después se agregó 1 mmol de nitrobeneno (1A-1C) y 1.2 mmol (0.078 g) de azida de sodio. Estas reacciones se llevaron a cabo bajo diferentes condiciones (tabla 1) y se monitorearon por CCF. Para precipitar el producto, se agregaron 30 mL de agua destilada fría, con el fin de reducir la temperatura de la mezcla de reacción y disminuir la solubilidad del producto. El matraz balón se colocó en refrigeración por 24 horas para inducir la precipitación de la *p*-nitrofenil azida, posteriormente el sólido cristalino se filtró haciendo uso de vacío y se colocó en un desecador por 24 horas.

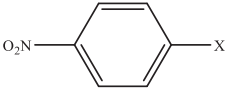
El producto fue purificado por medio de cromatografía en columna, empleando como fase estacionaria silica y como fase móvil una mezcla de hexano/acetato de etilo (9:1)

Se obtuvo el punto de fusión del producto, el cual fue medido con el aparato Fisher Jones. También fue caracterizado por IR, UV-VIS y RMN ^1H . Los espectros IR se registraron en el espectrofotómetro FTIR Nicolet 15-10 Thermo Scientific. Los espectros UV-VIS fueron obtenidos en un espectrofotómetro Shimadzu UV-2401 PC. Los espectros RMN ^1H (Resonancia magnética nuclear) fueron obtenidos en un espectrómetro Mercury 400 MHz.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se utilizaron como solventes acetona y DMF, ya que ambos son polares. Sin embargo al utilizar la mezcla de acetona/agua como solvente y al llevar a cabo la reacción a diferentes temperaturas (Temperatura ambiente durante 6 días; 40°C y 60°C por 8 horas) no se observó la formación del producto deseado. En cambio, al emplear la mezcla DMF/agua y llevando a cabo la reacción bajo condiciones suaves, se observó la formación de *p*-nitrofenil azida, obteniendo un buen rendimiento. Las condiciones de reacción y los resultados obtenidos en cada caso se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Condiciones de reacción y resultados obtenidos en la síntesis de *p*-nitro fenilazida, utilizando el catalizador de transferencia de fase y como solvente la mezcla DMF/agua.

Reactivo 	Temperatura (°C)	Tiempo	Rendimiento (%)
X=F, 1A	T. Ambiente	6 días	60
X=F, 1A	60	5 horas	87
X=Cl, 1B	70	14 horas	40
X=Cl, 1B	75	15 horas	62
X=Br, 1C	70	14 horas	35
X=Br, 1C	80	10 horas	45

Cuando se lleva a cabo la reacción a temperatura ambiente y con 1-fluoro-4-nitrobenzo como materia prima se obtienen rendimientos moderados (60%). Sin embargo, se obtienen mejores rendimientos (87%) cuando se lleva a cabo la reacción a 60°C. Por lo tanto, este incremento de temperatura reduce considerablemente los tiempos de reacción y aumenta el rendimiento. Cuando se utiliza un nitrobenzo que contiene un cloro como sustituyente, los rendimientos son moderados (40-62 %). Estos rendimientos son todavía más bajos cuando se utiliza un compuesto con bromo (35-45%).

La reacción procede a través de un mecanismo de adición-eliminación (Figura 3). Cuando el nucleófilo (N_3^-) ataca al carbono que tiene al halógeno, se forma un complejo sigma con carga negativa que esta deslocalizada sobre los diferentes carbonos aromáticos y el grupo nitro que es atractor de densidad electrónica.

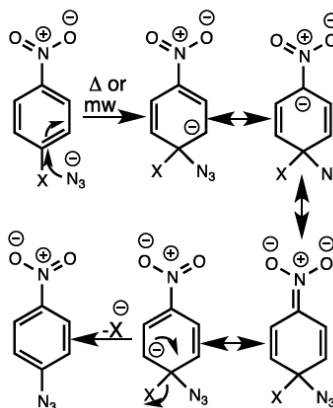


Figura 3. Mecanismo de reacción. Sustitución nucleofílica aromática.

Para esta reacción, el flúor es mejor grupo saliente que el cloro y bromo, debido a efectos inductivos y estéricos [6]. El flúor es el halógeno más electronegativo, por lo tanto aumenta la carga parcial positiva del carbono al que se encuentra enlazado convirtiéndolo en un centro electrofílico, de esta manera, el grupo azida que es un nucleófilo, se une fácilmente a este carbono. Por otro lado, el radio atómico del flúor es menor al de cloro y bromo, por lo que hay menor impedimento estérico y es más fácil que se lleve a cabo la adición del grupo azida al carbono al que se encuentra enlazado el halógeno. La ruptura del enlace carbono-halógeno no es la etapa determinante en la velocidad de reacción por lo que aunque la fuerza de enlace carbono-fluor es grande, no desfavorece la reacción.

Utilizando como materia prima 1-cloro-4-nitrobenzo y 1-bromo-4-nitrobenzo, llevando a cabo las reacciones bajo las mismas condiciones (70°C durante 14 horas), se obtiene menor rendimiento al emplear 1-bromo-4-nitrobenzo. Esto se debe a que el átomo de bromo es de mayor tamaño, lo que hace que se dificulte la adición del grupo azida. Teniendo como grupo saliente un halógeno, la reacción se ve favorecida en el siguiente orden $\text{F} > \text{Cl} > \text{Br}$, y está relacionado con el tamaño y electronegatividad del átomo de halógeno.

Al llevar a cabo la reacción, utilizando como materia prima 1-bromo-4-nitrobenzo (1C) a 80°C, durante 8 horas, se observó la formación de dos productos uno color amarillo (correspondiente a la *p*-nitrofenil azida) y otro color café. Esto se debe a que la temperatura a la que se llevó a cabo la reacción fue muy elevada y la *p*-nitrofenil azida se descompuso liberando nitrógeno molecular y generando un producto del nitreno.

Sin la presencia del catalizador de transferencia de fase, la energía de activación sería mayor, debido a que la azida de sodio es soluble en agua e insoluble en solventes orgánicos y los nitrobenzos empleados como materia prima (1A-1C) son solubles en DMF. Por esta razón, se requeriría mayor tiempo de reacción y mayor temperatura, pero como se mencionó anteriormente, las azidas se descomponen a elevadas temperaturas. Hacer uso de un catalizador de transferencia de fase, reduce la energía de activación de la reacción y permite llevar a cabo la reacción bajo condiciones más suaves.

El compuesto *p*-nitrofenil azida, es un sólido de color amarillo pálido. El punto de fusión obtenido fue de 66-68 °C el cual concuerda con la literatura [1]. En el espectro IR en KBr se observaron las siguientes señales de frecuencia cm^{-1} : 2122, 2084 correspondiente al alargamiento del doble enlace $\text{N}=\text{N}$ de la azida; 1604, 1489 correspondientes al

alargamiento del doble enlace C=C del anillo aromático; 1511 y 1389 que corresponden al estiramiento asimétrico y simétrico del grupo NO₂, respectivamente.

Los espectros UV-VIS se obtuvieron usando como solvente metanol, se observó un máximo en 223 nm, esta longitud de onda correspondiente a la transición $\eta \rightarrow \pi^*$ correspondiente al enlace N=O y otro máximo en 309 nm la cual corresponde a la transición $\pi \rightarrow \pi^*$, del enlace C=C del anillo aromático y al enlace N=N de la azida.

El espectro RMN ¹H se obtuvo con cloroformo deuterado, mostrando las siguientes señales: para los hidrógenos que se encuentran en posición meta con respecto al grupo nitro, se observó un doblete en 7.14 ppm, con una constante de acoplamiento (*J*) de 9.15 Hz y para los hidrógenos que se encuentran en posición orto se observó un doblete a 8.24 ppm, con una constante de acoplamiento (*J*) de 9.15 Hz.

CONCLUSIONES

Las azidas aromáticas son compuestos de gran interés, ya que han mostrado tener una gran número de aplicaciones, es por ello que es importante desarrollar nuevas metodologías que sean convenientes para su síntesis.

En el presente trabajo, se desarrolló una nueva metodología para la síntesis de *p*-nitrofenil azida, a partir de azida de sodio y nitrobenzenos *p*-halogenados haciendo uso de un catalizador de transferencia de fase (tetrafluoroborato de tetraetilamonio) el cual disminuye la energía de activación de la reacción. Se obtuvieron rendimientos satisfactorios utilizando como materia prima 1-fluoro-4-nitrobenceno y llevando a cabo la reacción bajo condiciones suaves.

BIBLIOGRAFÍA

[1] GONZÁLES BALDERAS, R.M. (Abril 2013). “Síntesis caracterización y fotoquímica de azidas aromáticas fluoradas y nitradas”. Tesis de maestría, Facultad de Ciencias Químicas, UASLP, San Luis Potosí, México.

[2] DE LOERA CARRERA, D.A., LEYVA RAMOS, E., JIMENEZ CATAÑO, R. (2009). “Fotoquímica de azidas aromáticas: intermediarios, reacciones y su aplicación biológica”. *Boletín de la Sociedad Química de México*, 3(2), 93-106.

[3] BRÄSE, S., GIL, C., KNEPPER, K., ZIMMERMANN, V. (2005), “Organic azides: An exploding diversity of a unique class of compounds”. *Angewandte Chemie - International Edition*.

[4] DÍAZ, D. D., FINN, M. G., SHARPLESS, K. B., FOKIN, V., HAWKER, J. (2008) “Cicloadición 1,3-dipolar de azidas y alquinos”. I: Principales aspectos sintéticos. *An Quím Real Sociedad Española de Química*, 104, 173–180.

[5] EVANS, R. A., WONG, M. W., WENTRUP, C. (1996) “2-Pyridylnitrene–1,3-Diazacyclohepta-1,2,4,6-tetraene Rearrangements in the Trifluoromethyl-2-pyridyl Azide Series 1 a”. *Journal of the American Chemical Society*, 118, 4009–4017.

[6] WADE, L.G. (2011). *Química Orgánica* (Volumen 2), México: Pearson Educación.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Elisa Leyva Ramos por su apoyo, enseñanzas y por darme la oportunidad de trabajar en este proyecto.

A la Dra. Silvia Elena Loredo Carrillo, por su apoyo y participación en este proyecto.

A mi padres y hermanas, por motivarme y por su apoyo incondicional en todo momento.

EFFECTOS DE LOS FRUCTOOLIGOSACARIDOS DE DIFERENTE ÍNDICE DE POLIMERIZACIÓN DEL *Agave tequilana* EN EL CRECIMIENTO DE BACTERIAS PROBIÓTICAS

Castro Flores Francisco¹ y Martínez Gutiérrez Fidel²

RESUMEN

Los fructooligosacaridos (FOS) provenientes de diferentes especies del genero *Agave*, tales como *Agave salmiana*, se han caracterizado como prebióticos. Sin embargo, en este contexto existe poca información sobre la especie *Agave tequilana*. Se evaluó el efecto prebiótico de los FOS de diferente índice de polimerización del *Agave tequilana* sobre *Lactobacillus casei* y *Bifidobacterium lactis*. La evaluación del crecimiento se efectuó utilizando un reactor anóxico. Estas bacterias se inocularon en medio MRS reducido con determinadas concentraciones de prebióticos: *A. tequilana* de alto índice de polimerización (AGAI), *A. tequilana* de bajo índice de polimerización (AGBI), Inulina (OGR), como principal estándar prebiótico y glucosa. Se recolectaron muestras a las 18, 22, 26, 42 y 48 horas, a las cuales se les midió la absorbancia a 600 nm y pH. Los resultados indican que AGBI favorece a un mayor crecimiento de ambas bacterias y una mayor disminución de pH, características deseadas de un prebiótico.

ABSTRACT

Several studies evaluate the prebiotic effect of the fructo-oligosaccharides (FOS) that come from different *Agave* species such as *Agave salmiana*. However, there is few information regarding the potential effects that the FOS of *Agave tequilana* could have as a prebiotic. This study focused on the prebiotic effect of FOS from *Agave tequilana* which have different degree of polymerization to stimulate the growth of probiotic bacteria: *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium lactis*. These bacteria were inoculated into reduced MRS medium with certain amount of prebiotic: High degree of polymerization *Agave tequilana* (AGAI), Low degree of polymerization *Agave tequilana* (AGBI), Inulin (OGR) and glucose. Samples were collected after 18, 22, 26, 42 and 48 hours, then the Optical Density at 600 nm and pH was measured. The results show that both bacteria have the most favorable growth with AGBI and the pH in their medium is the lowest as well.

Palabras clave: Prebiótico, *Agave tequilana*, Probiótico, Sinbiótico

INTRODUCCIÓN

El *Agave* es una planta conocida por su uso en la elaboración de una de las bebidas más populares a nivel mundial, el tequila. La principal especie de la que se obtiene el tequila es el *Agave tequilana* variedad Weber o *Agave azul*. En este caso, se hidrolizan los carbohidratos complejos provenientes de la piña del *Agave* tales como la inulina a través de la cocción de las piñas. Posteriormente los productos de la hidrólisis, como fructosa y glucosa, son sometidos a un proceso de fermentación con levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* y finalmente el fermentado es destilado para la obtención del tequila (Bautista, García, Barboza, & Parra, 2001).

En la actualidad se han identificado otras cualidades potencialmente benéficas a las diferentes especies de *Agave*, ya que estas plantas suelen contener abundantes cantidades de FOS, los cuales se ha demostrado que tienen diversas propiedades nutricionales e inmunológicas. Desde la utilización de FOS para la producción de esteres de ácidos grasos que puedan ser usados en la industria como emulsificantes hasta el uso de FOS como posibles alimentos para combatir la hiperglicemia y esteatosis (Márquez, Camacho, Gutiérrez, Padilla, González, Gálvez, Díaz, & Ortuño, 2016). Actualmente se ha postulado la posibilidad de que dichos FOS presenten características de prebióticos, los prebióticos son fracciones no-digestibles de la dieta que promueven el crecimiento de ciertas bacterias del tracto gastrointestinal. (Wilson, & Whelan, 2017)

La importancia de los prebióticos radica en su capacidad de favorecer selectivamente el crecimiento de bacterias potencialmente benéficas para la salud de un huésped, también conocidas como probióticos (Roberfroid, 2007).

Por tanto, este trabajo tiene como objetivos: evaluar la capacidad de dos bacterias probióticas ampliamente reportadas en la literatura, *Bifidobacterium lactis* y *Lactobacillus casei*, para crecer en presencia de los FOS con diferente índice de polimerización provenientes de *Agave tequilana*, comparando con la Inulina Orafit GR, así como la capacidad de estas bacterias para modular el pH del medio.

METODOLOGÍA

Cepas probióticas

Las bacterias probióticas empleadas fueron cepas de referencia ATCC 334, las cuales fueron reactivadas 48 horas antes de la preparación de los experimentos, se identificaron de acuerdo a su morfología y fueron estimuladas a tener un crecimiento exponencial. Las cepas *L. casei* y *B. lactis* fueron sembradas en cajas con agar Difco Lactobacilli MRS, se colocaron en jarra de GasPak System junto con un sistema de producción de CO₂ y se incubaron a 37°C. A partir de colonias aisladas se prepararon suspensiones microbianas con solución salina al 0.85% equivalentes al 0.5 de la escala de McFarland, con una absorbancia de 0.08 – 0.1, dicha absorbancia contiene un aproximado de 1.5 X10⁸ Unidades Formadoras de Colonia/ mL.

Condiciones de crecimiento microbiano

Para ello se preparó el medio MRS reducido pesando 5g de Peptona de Caseína, 10g de Extracto de Carne, 3.5g de Extracto de Levadura, 2g de Fosfato de Potasio Dibásico, 5g de Acetato de Sodio, 2g de Citrato de Amonio, 0.2g de Sulfato de Magnesio, 0.05g de Sulfato de Manganeso y 1 mL de Tween 80 para posteriormente diluirlos en 1L de agua destilada dentro de un biorreactor anóxico, con agitación constante. El biorreactor con el medio se sometió a un proceso de esterilización en autoclave a 15 psi, 121 °C, por 20 minutos. Posteriormente se ensambló el sistema en un baño de agua con agitación, se adicionaron 6mL de una solución de cisteína al 8.75% con una jeringa y un filtro de 0.22 µm Millex GS estéril para jeringas, posteriormente se incorporó nitrógeno gaseoso dentro del biorreactor con la finalidad de desplazar el oxígeno del medio. Después se llenaron frascos color ámbar estériles de 50 mL con el medio MRS reducido.

Soluciones prebióticas

¹Universidad 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, francisco_castrof@hotmail.com

²Universidad 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, fidelmicro@gmail.com

Simultáneamente a la elaboración del medio, se prepararon soluciones madre al 20% de los prebióticos: AGAI, OGR. Para esto se pesaron 4g de cada prebiótico y se diluyeron en 20 mL de agua destilada, posteriormente se filtraron las soluciones con una gasea y un papel filtro Whatman No. 5. En el caso de la glucosa, se preparó una solución madre al 0.9% disolviendo 0.225g de glucosa en 25 mL de agua destilada.

Evaluación del crecimiento microbiano

En primera instancia se llevó a cabo un estudio preliminar para evaluar el crecimiento de las bacterias: *Lactobacillus casei* y *Bifidobacterium lactis* así como su capacidad de modular el pH en presencia de diferentes prebióticos: *Agave tequilana* de alto índice de polimerización (AGAI) e Inulina Orafit GR (OGR) con una concentración de 0.8%, así como glucosa (GA) 2mM. Se prepararon seis frascos: tres de ellos con *L. casei* y los otros tres con *B. lactis*, cada uno adicionado con un prebiótico diferente AGAI, OGR y GA. A cada frasco de 50 mL se le extrajeron 3mL de medio, se le añadieron 2 mL de la solución madre al 20% del prebiótico correspondiente con jeringa acoplada a un filtro Millex GS y finalmente se inocularon con 1 mL de la suspensión bacteriana a la concentración definida. A continuación se incubaron los frascos a 37°C. Las lecturas se realizaron a las 18, 22, 26, 42 y 48 horas de incubación, para lo cual se extrajeron de cada frasco 2mL de muestra y se colocaron desplazadores de vidrio estériles en los frascos para compensar el volumen extraído. A cada muestra se le midió absorbancia en un espectrofotómetro Sequoia-Turner a 600 nm, utilizando como blanco el medio MRS reducido y también se midió el pH a cada muestra con un potenciómetro Bante 210 previamente calibrado.

En el segundo experimento, se decidió trabajar con *B. lactis* por mostrar un mejor crecimiento a las 48 horas. Se trabajó con diferentes concentraciones de prebiótico para identificar en la respectiva curva de crecimiento, la concentración de prebiótico a la cual se detectaba el mejor crecimiento del probiótico. Se trabajó de la misma manera que en el primer experimento, con la excepción de que se utilizaron 13 frascos: 6 con AGAI y 6 con OGR, cuyas concentraciones fueron de 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2 y 2.4%. Además se tenía un frasco al cual no se le adicionó ningún prebiótico. A cada frasco de 50 mL se le extrajo determinado volumen y se le adicionaron volúmenes de 1, 2, 3, 4, 5 y 6 mL de las respectivas soluciones madres al 20% de cada prebiótico para obtener las concentraciones mencionadas, todos los frascos fueron inoculando con la misma concentración de microorganismo cada frasco con 1 mL de la suspensión de *B. Lactis* a la concentración mencionada.

Finalmente se realizó un tercer experimento por cuadruplicado, evaluando en este caso el crecimiento y el pH con 16 frascos: 8 utilizando *L. casei* como probiótico y otros 8 con *B. lactis*. Para cada grupo se preparó el medio con las siguientes concentraciones de prebiótico: 0.8% AGAI, 2.4% AGAI, 0.8% AGBI, 2.4% AGBI, 0.8% OGR, 2.4% OGR, Glucosa 2 mM y un frasco sin prebiótico. La preparación fue la misma que la descrita en los experimentos anteriores.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En trabajos previos (Márquez, Camacho, Gutiérrez, Padilla, González, Gálvez, Díaz, & Ortuño, 2016) se estableció que el crecimiento de *B. lactis* era estimulado con los polímeros de alto índice de polimerización, por lo cual se inició la evaluación del efecto prebiótico del *Agave tequiliana* con los FOS con dicho índice de polimerización utilizando el sistema de biorreactor con desplazamiento de oxígeno. En el primer experimento *B. lactis* tuvo un mejor crecimiento inicial con OGR 0.8% como prebiótico a las 18 horas después de la inoculación. En contraste con *L. casei*, que tuvo un mejor crecimiento con AGAI 0.8% a las 18 horas. Tras concluir el primer experimento, a las 48 horas, la cepa que mantuvo el crecimiento más alto fue *B. lactis* con AGAI 0.8%. En lo que respecta a la evaluación del pH, los resultados indican una disminución del pH, dado que el pH inicial fue de 6.56 en cada uno de los medios con prebiótico y probiótico, el mayor decremento de pH ocurre cuando se utilizó el OGR 0.8% como prebiótico teniendo que con *L. casei* el pH fue de 5.15 mientras que para *B. lactis* el pH fue de 5.73. En este contexto de resultados se decidió realizar un segundo experimento con diferentes concentraciones de prebiótico y *B. lactis* como probiótico.

En el segundo experimento, se observó un comportamiento dosis-respuesta, ya que en ambos grupos de *B. lactis* el crecimiento bacteriano muestra una relación directa con la concentración del prebiótico y el crecimiento microbiano. En las figuras 1 y 2, se puede observar que el crecimiento más bajo se obtiene con los grupos que no poseen algún prebiótico (SIN CHO), seguido por los grupos con la concentración más baja de prebiótico (al 0.4%) hasta llegar a los grupos de mayor concentración (al 2.4%) los cuales mantuvieron el crecimiento más alto durante las 48 horas del experimento. También cabe destacar que *B. lactis* mostró tener mayor afinidad al OGR para crecer.

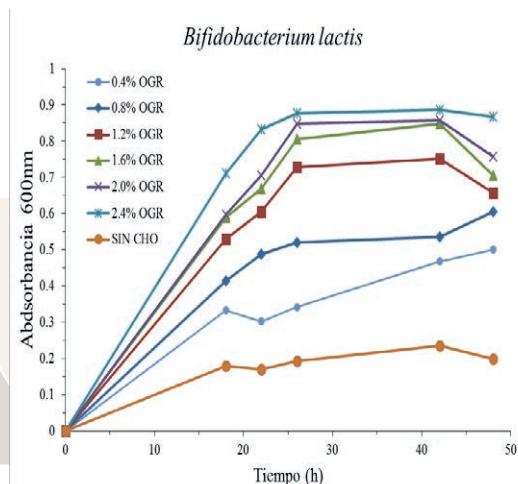


Figura 1. Actividad prebiótica de OGR a diferentes concentraciones en el crecimiento de *B. lactis*.

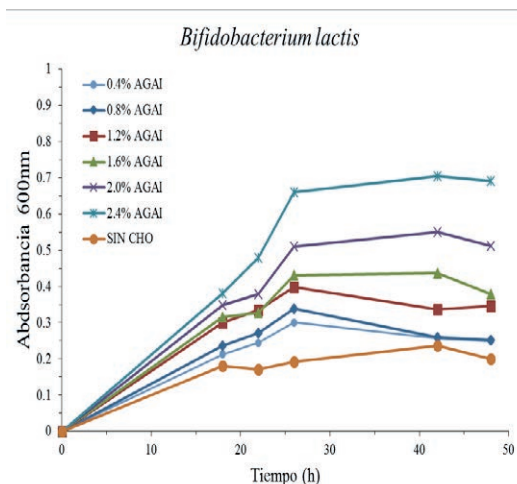


Figura 2. Actividad prebiótica de AGAI a diferentes concentraciones en el crecimiento de *B. lactis*.

De manera similar al crecimiento, la disminución del pH presenta una relación directa con la concentración de prebiótico. Tal como se muestra en las figuras 3 y 4, con un pH inicial de 6.31, *B. lactis* posee una mayor capacidad de

de disminuir el pH del medio, entre mayor sea la concentración del prebiótico. No obstante, después de la primera lectura a las 18 horas, se observaron, principalmente en los grupos que tienen AGAI como prebiótico, ligeros aumentos en el pH.

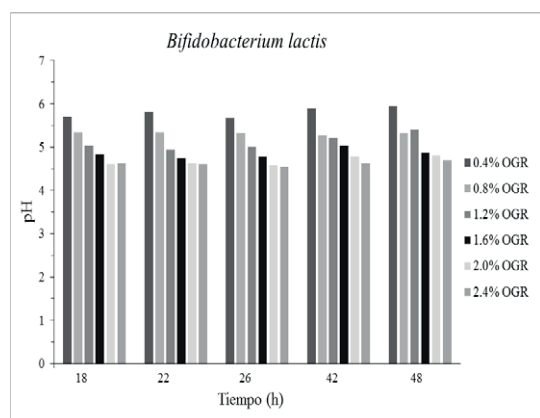


Figura 3. Disminución del pH en función del tiempo cuando se utiliza OGR como prebiótico. (*B. lactis*).

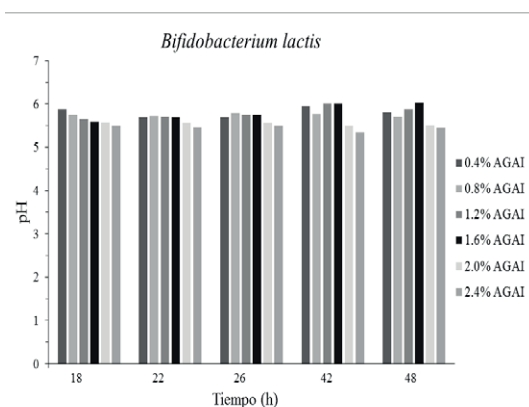


Figura 4. Disminución del pH en función del tiempo cuando se utiliza AGAI como prebiótico. (*B. lactis*).

El tercer experimento, se decidió trabajar con ambas bacterias *B. lactis* y *L. casei*, así como con los FOS de *Agave tequiliana* con ambos índices de polimerización utilizando el sistema de biorreactor con desplazamiento de oxígeno. En las figuras 5 y 6 se grafica la media de cada muestra con su respectiva desviación estándar. En dichas figuras se observa como para ambas bacterias el mayor crecimiento se obtuvo con AGBI al 2.4%, seguido por OGR al 2.4% y después AGBI al 0.8%. Tras concluir el experimento, se observó un mejor crecimiento con *L. casei* independientemente del prebiótico utilizado. Estos resultados difieren a lo anteriormente se había reportado con respecto a la capacidad de estimulación de las bacterias probióticas con prebióticos de *Agave tequiliana* de alto índice de polimerización (Márquez, Camacho, Gutiérrez, Padilla, González, Gálvez, Díaz, & Ortuño, 2016). Interesantemente se demuestra como los FOS de *Agave tequiliana* presentan mejor estimulación que el estándar OGR.

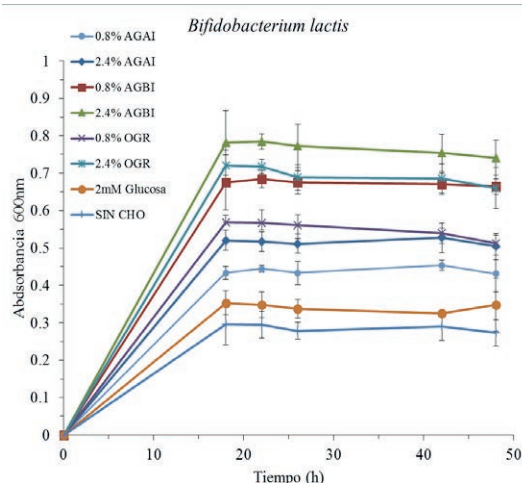


Figura 5. Crecimiento de *B. lactis* con AGAI, AGBI y OGR al 0.8 y 2.4%; así como glucosa 2mM y sin prebiótico.

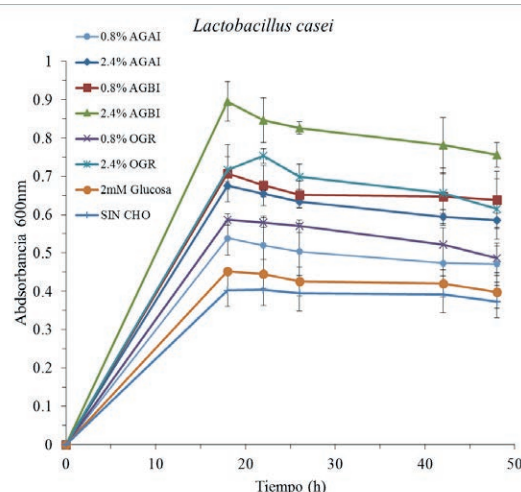


Figura 6. Crecimiento de *L. casei* con AGAI, AGBI y OGR al 0.8 y 2.4%; así como glucosa 2mM y sin prebiótico.

En las figuras 7 y 8 se grafica la disminución de pH con respecto del tiempo, cuando se adicionan los prebióticos ya mencionados en el experimento 3. Los mayores decrementos de pH se obtuvieron con AGBI, seguido por OGR, AGAI y finalmente los grupos con glucosa 2mM y sin prebiótico adicionado.

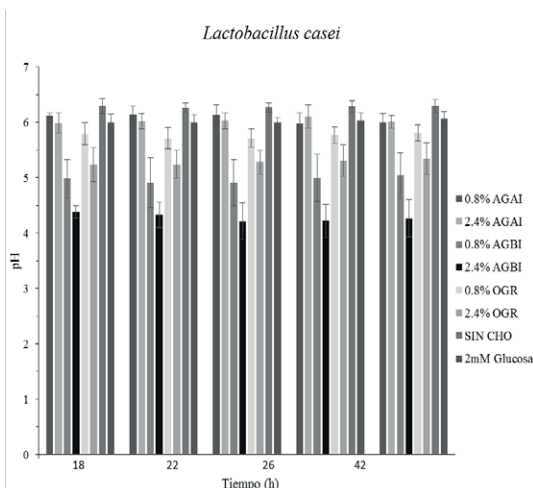
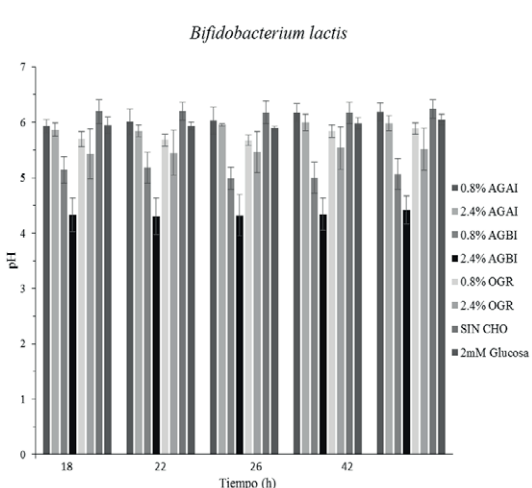


Figura 7. Disminución de pH en medios con *B. lactis* más AGAI, AGBI y OGR al 0.8 y 2.4%; así como glucosa 2mM y sin prebiótico.

Figura 8. Disminución de pH en medios con *L. casei* más AGAI, AGBI y OGR al 0.8 y 2.4%; así como glucosa 2mM y sin prebiótico.

Considerando que los grupos de bacterias que tienen AGBI como sustrato tienen mejor crecimiento y disminuyen más el pH que aquellos grupos adicionados con AGAI, entonces se comprobó que la capacidad de crecimiento y modulación de pH de los probióticos depende del índice de polimerización de los FOS del *Agave*. Esto se puede asociar al hecho de que los FOS de bajo índice de polimerización son fermentados rápidamente mientras que aquellos con índice de polimerización alto son fermentados paulatinamente obteniendo como productos diferentes ácidos grasos de cadena corta. (Zamora, Loarca, Vazquez., Ortiz, Tovar, & Sayago, 2015).

CONCLUSIONES

Los FOS de *Agave tequilana* pueden ser una alternativa como potenciales prebióticos ya que, comparando con la inulina, se observaron resultados favorables en el crecimiento de los dos grupos de bacterias así como en la disminución de pH del medio. Sin embargo, aún es necesario realizar más experimentos para conocer si los FOS de *Agave tequilana* pueden tener una efectividad igual o mayor que aquellos prebióticos obtenidos de otras especies de agave, como *Agave salmiana*. De tal manera que se recomienda: realizar la cuantificación de los metabolitos producidos por los probióticos durante la fase de crecimiento, evaluar los resultados con más bacterias probióticas como *L. acidophilus*, *B. longum*, *B. vulgatus*, etc., así como comparar el crecimiento de tales bacterias cuando tienen FOS de *Agave tequilana* o cuando tienen FOS de otra especie de *Agave*.

BIBLIOGRAFÍA

- BAUTISTA JUSTO, M., GARCÍA OROPEZA, L., BARBOZA-CORONA, J. E., & PARRA NEGRETE, L. A. (2001). El agave tequilana Weber y la producción de tequila. *Acta Universitaria*, 11, 26-34.
- ROBERFROID, M. (2007). Probiotics: the concept revisited. *The Journal of Nutrition*, 137, 830-937.
- WILSON, B., & WHELAN, K. (2017). Prebiotic inulin-type fructans and galacto-oligosaccharides: definition, specificity, function, and application in gastrointestinal disorders. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 32, 64-68.
- MARTINEZ GUTIERREZ, F., RATERING, S., JUAREZ FLORES, B., GODINEZ HERNANDEZ, C., GEISSLER PLAUM, R., PRELL, F., ZORN, H., CZERMAK, P. & SCHNELL, S. (2017). Potential use of *Agave salmiana* as prebiotic that stimulates the growth of probiotic bacteria. *Lebensmittel Wissenschaft and Technologie*, 84, 151-159.
- MARQUEZ-AGUIRRE, A. L., CAMACHO-RUIZ, R. M., GUTIÉRREZ-MERCADO, Y. K., PADILLA-CAMBEROS, E., GONZÁLEZ-ÁVILA, M., GÁLVEZ-GASTÉLUM, F. J., DÍAZ-MARTÍNEZ, N. E., & ORTUÑO-SAHAGÚN, D. (2016). Fructans from *Agave tequilana* with a lower degree of polymerization prevent weight gain, hyperglycemia and liver steatosis in high-fat diet-induced obese mice. *Plant Foods Hum Nutr* 71, 416-421.
- ARRIZON, J., MOREL, J., GSCHAEGLER, A., & MONSAN, P. (2010). Comparison of the water-soluble carbohydrate composition and fructan structures of *Agave tequilana* plants of different ages. *Food Chemistry*, 122, 123-130.
- ZAMORA-GASGA, V. M., LOARCA-PINA, G., VAZQUEZ-LANDAUVERDE, P. A., ORTIZ-BASURTO, R. I., TOVAR, J., & SAYAGO-AYERDI, S. (2015). In vitro colonic fermentation of food ingredients isolated from *Agave tequilana* Weber var. azul applied on granola bars. *Lebensmittel Wissenschaft and Technologie*, 60, 766-772.

ESTUDIO CINÉTICO DE LA EXTRACCIÓN DE RODIO (III) EN MEDIO CLORUROS EMPLEANDO CYPHOS® IL 104 COMO EXTRACTANTE

Jessica Guadalupe Meléndez Marmolejo¹ y Mario Ávila Rodríguez²

RESUMEN

Actualmente en el proceso de extracción líquido-líquido para la recuperación de metales se emplean solventes orgánicos volátiles, los cuales son altamente contaminantes. Para minimizar las emisiones contaminantes a la atmósfera se propone el uso de novedosos compuestos, cuya propiedad principal es la de contar con una presión de vapor casi nula, como lo es el caso de los llamados líquidos iónicos. Por lo que, en este trabajo se estudió la cinética de extracción de Rh(III) proveniente de un medio de ácido clorhídrico empleando como extractante el líquido iónico: trihexil(tetradecil) fosfonio bis-2,4,4-(trimetilpentil) fosfinato, (Cyphos® IL 104), a una concentración de 0.3 M, diluido en queroseno / decanol al 10%. El porcentaje de desextracción de Rh(III), usando una relación 2:1 (FA:FO), disminuye con el aumento de la concentración de ácido clorhídrico en la solución de despojo, teniendo a una concentración de HCl 1M el mayor porcentaje de recuperación de Rh(III). También se cuantificó la concentración de cloruros en la fase orgánica, donde se obtuvo que al aumentar la concentración de HCl, en el proceso de desextracción, la concentración de cloruros aumenta. El equilibrio de extracción de Rh(III) a partir de HCl acuoso 0,1 M, usando Cyphos® IL 104 0.3 M como extractante, se consigue a los 6 minutos. Al aumentar el tiempo de contacto entre las dos fases, el porcentaje de extracción de Rh(III) aumenta, siendo a un tiempo de contacto de 8 horas el porcentaje más alto (49.41 %). La extracción de rodio(III) con Cyphos®IL 104 se lleva a cabo en la interfase de acuerdo con el mecanismo de intercambio aniónico.

ABSTRACT

Currently in the liquid-liquid extraction process for the recovery of metals volatile organic solvents are used, which are highly polluting. In order to minimize pollutant emissions to the atmosphere, it is proposed to use novel compounds whose main property is to have almost zero vapor pressure, as is the case of so-called ionic liquids. Therefore, in this work the kinetics of extraction of Rh(III) from acidic chloride medium using as extractant the ionic liquid: trihexyl(tetradecyl)phosphonium bis-(2,4,4-trimethylpentyl)phosphinate (Cyphos® IL 104), at a concentration of 0.3 M, diluted in kerosene / decanol 10% has been studied. The percentage of stripping of Rh(III), using a ratio of 2:1 (FA: FO), decreases with the increase of hydrochloric acid concentration in the stripping solution, having a concentration of 1M HCl the highest recovery percentage rhodium(III). The chloride concentration was also quantified in the organic phase, where it was obtained that when the concentration of HCl increases, in the stripping process, the chloride concentration increases. The equilibrium of the rhodium(III) extraction from 0.1 M aqueous HCl, using Cyphos® IL 104 0.3 M as an extractant, is achieved after 6 minutes. As the contact time between the two phases increases, the percentage of Rh(III) extraction increases, with a contact time of 8 hours being the highest extraction rate (49.41%). The extraction of rhodium(III) with Cyphos®IL 104 is carried out at the interface according to the anion exchange mechanism.

Palabras Clave: rodio (III), extracción líquido-líquido, líquidos iónicos, Cyphos®IL 104.

INTRODUCCIÓN

Con la creciente demanda y limitadas fuentes de metales nobles, el reciclado de estos metales de las soluciones de desechos ha asumido gran importancia. Los metales del grupo del platino, donde se encuentra el rodio(III), tienen especial interés debido a sus diversas aplicaciones industriales.

¹Universidad 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. pete3b@gmail.com

²División de Ciencias Naturales y Exactas, Sede Pueblito de Rocha, Universidad de Guanajuato; cerro de la Venada s/n, Pueblito de Rocha, C.P: 36040, Guanajuato, Guanajuato. avilam@ugtomx.onmicrosoft.com

Los procesos de separación y purificación de Rh(III) son difíciles y complicados debido a sus propiedades químicas y la formación de diversas especies químicas en medios de cloruro. Por esta razón, es muy importante encontrar el método más eficiente para la recuperación de este metal. La extracción líquido-líquido es una de las alternativas utilizadas para la recuperación de metales, esta técnica de separación es un proceso de transferencia de una o más sustancias desde una fase líquida o acuosa (FA) a otra también líquida inmiscible con la primera llamada fase orgánica (FO). Para lograr la separación de un ión metálico a partir de una solución acuosa debe llevarse a cabo la formación de una especie que sea soluble en la fase de extracción. El extractante es un soluto orgánico que es la parte activa de la fase orgánica. Es común utilizar disolventes orgánicos como extractantes en la extracción líquido-líquido, lo cual es una gran desventaja debido a la contaminación atmosférica que generan.

Recientemente se ha desarrollado la extracción de varios iones metálicos a partir de varios medios acuosos usando una nueva clase de extractantes llamados líquidos iónicos (LI), los cuales son sustancias compuestas enteramente por aniones y cationes en estado líquido. La ventaja más importante de este tipo de extractantes es su baja o nula capacidad de evaporarse (presión de vapor). Especialmente, los LI derivados de fosfonio (Cyphos IL) han sido empleados para atacar algunas de las problemáticas presentadas a nivel industrial obteniendo resultados que muestran la factibilidad de su utilización en estos sistemas de extracción (Cholico et al, 2013).

Se ha encontrado que la sal de fosfonio cuaternaria Cyphos®IL 104 (Figura 1), que tiene como fórmula abreviada $R_3R'P^+A^-$, es un extractante eficiente y rápido para metales del grupo del platino a partir de soluciones de ácido clorhídrico (Cieszyńska et al, 2011).

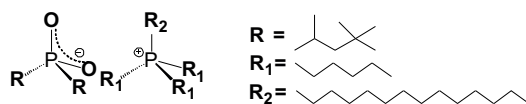


Figura 1. Estructura de trihexil(tetradecil) fosfonio bis-2,4,4-(trimetilpentil) fosfinato (Cyphos®IL 104)

Los líquidos iónicos son muy viscosos, es por esto que al utilizarlos como extractantes en la fase orgánica, es necesario el uso de un diluyente (comúnmente queroseno) y un modificador (por lo general un alcohol). El modificador es capaz de interactuar con las especies de interés y evitar la formación de una tercera fase.

Otra ventaja de usar líquidos iónicos en sistemas de extracción líquido-líquido es que al extraer el ion metálico, de la fase acuosa a la fase orgánica, se puede llevar a cabo un proceso de desextracción o despojo, que consiste en transferir el ion metálico de la fase orgánica cargada a la fase acuosa (distinta a la utilizada en el proceso de extracción), esto hace posible reutilizar la fase orgánica.

El presente trabajo tiene como objetivo estudiar la cinética de extracción de Rh(III) a partir de un medio cloruro usando Cyphos®IL 104 como extractante, mediante la técnica de extracción líquido-líquido.

METODOLOGÍA

Se llevó a cabo un primer experimento para analizar la influencia de la concentración de HCl en la desextracción o despojo de Rh(III). Para la extracción se preparó la fase acuosa con una solución de Rh(III) 20 ppm en un medio de HCl 0.1 M. Para la fase orgánica se pesó la cantidad necesaria para preparar una solución de Cyphos®IL 104 0.3 M aforando con queroseno / decanol al 10%. Se mezclaron volúmenes iguales de fase acuosa y de fase orgánica en un frasco, este se llevó a agitación por 30 minutos a 100 rpm, posteriormente, haciendo uso de un embudo de separación se separaron las fases, donde se obtuvo la fase orgánica cargada con el ion metálico en estudio.

Para la desextracción se prepararon 7 soluciones de HCl de concentraciones 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 M. En un frasco se agregaron 2 ml de solución cargada más 4 ml de HCl a las diferentes concentraciones y se llevó a agitación por 2 horas a 101 rpm. Se separó la fase orgánica y acuosa de cada frasco con un embudo de separación, de la fase acuosa se hizo una dilución 1/10 con HCl 2M. Así mismo se hizo una dilución 1/10 de la fase acuosa de la extracción y de la solución madre de Rh(III), cada dilución se aforó con HCl 2M. Para la cuantificación de Rh(III) se utilizó el espectrómetro de absorción atómica PerkinElmer AAnalyst 200 (para eliminar interferencias se le agregó 1 gota de Na_2SO_4 al 0.1% a cada muestra a analizar) a una longitud de onda de 343.5 nm y un rango lineal de 15 mg/L.

Posteriormente se realizó un segundo experimento donde se estudió la cinética de extracción de Rh(III), para lo cual se preparó la fase acuosa de Rh(III) 20 ppm en un medio de HCl 0.1 M. La fase orgánica fue Cyphos IL 104 0.3 M en un medio de queroseno/decanol al 10%. Se mezclaron volúmenes iguales de las dos fases y se llevaron a agitación a 100 rpm por diferentes periodos de tiempo. Después de separar las dos fases, se hicieron diluciones 1/10 con HCl 0.1 M de cada fase acuosa obtenida y de la solución madre de Rh(III). Por último se analizó cada muestra anterior en Absorción Atómica, con las mismas condiciones estándar para rodio.

También se determinó la concentración de cloruros en la fase orgánica de la desextracción del primer experimento, mediante el método de Mohr, para lo cual se valoró 0.5 ml de la fase orgánica diluida en 5 ml de etanol/agua 3:1.

Para determinar el porcentaje de desextracción se utilizó la ecuación 1) donde $[\text{Rh}^{3+}]_{ac\ des}$ y $[\text{Rh}^{3+}]_{org\ ext}$ representan la concentración de rodio (en ppm) de la fase acuosa en la desextracción y de la fase orgánica en la extracción, respectivamente. Cada concentración se multiplicó por el volumen utilizado en la desextracción, 4 ml (FA) y 2 ml (FO).

$$\%Des = \frac{[\text{Rh}^{3+}]_{ac\ des} \cdot 0.004}{[\text{Rh}^{3+}]_{org\ ext} \cdot 0.002} \cdot 100 \quad (1)$$

$$D = \frac{[\text{Rh}^{3+}]_{org}}{[\text{Rh}^{3+}]_{ac}} \quad (2)$$

$$\%E = \frac{D}{D+1} \cdot 100 \quad (3)$$

El coeficiente de distribución (D) y el porcentaje de extracción (%E) se determinaron con las ecuaciones 2) y 3), donde $[\text{Rh}^{3+}]_{org}$ y $[\text{Rh}^{3+}]_{ac}$ representan la concentración de rodio en la fase orgánica y acuosa después de la extracción, respectivamente. (Pospiech, 2015).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 2 se puede observar que conforme aumenta la concentración de HCl, utilizada en el proceso de despojo de Rh(III), el porcentaje de desextracción (%Des) disminuye, teniendo un %Des de 62.24% y 7.387% con una concentración de HCl 1M y 7 M, respectivamente. En base a estos resultados, el estudio cinético de extracción se realizó con una concentra menor a 1M de HCl, para la misma concentración de fase orgánica.

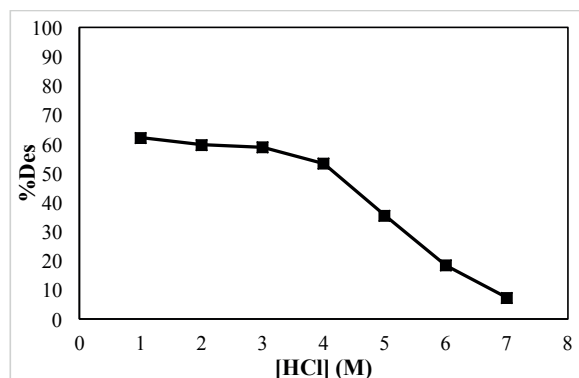


Figura 2. Efecto de la concentración de HCl en la desextracción de Rh(III) FO/FA=0.5. Extracción: 0.3 mol/L Cyphos IL 104 y 20 ppm Rh(III) en HCl 0.1 M, FO/FA=1.

Al hacer la cuantificación de cloruros en la fase orgánica después de la desextracción de Rh(III) del primero experimento, se obtuvo que al aumentar la concentración de HCl, en la fase acuosa de despojo, la concentración de cloruros aumenta (figura 3). Cabe mencionar que al aumentar la concentración de ácido clorhídrico en la solución de despojo el valor del coeficiente de distribución también aumenta.

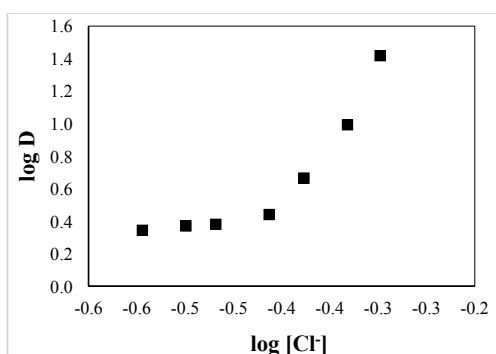


Figura 3. Gráfica de log D contra log [Cl⁻] de la desextracción de Rh(III) a diferentes concentraciones de HCl FO/FA=0.5. Extracción: 0.3 mol/L Cyphos IL 104 y 20 ppm Rh (III), 0.1 M HCl, FO/FA=1.

Con el estudio cinético de extracción de Rh(III) del segundo experimento, se puede observar que el equilibrio se alcanza a los 6 minutos de contacto entre las dos fases (Figura 4). Así también, se observa que conforme el tiempo de agitación aumenta después del tiempo de equilibrio, el porcentaje de extracción (%E) no tiene un aumento considerable, se puede observar que el %E después de los 6 minutos de contacto es cercano al 50% (Tabla 1).

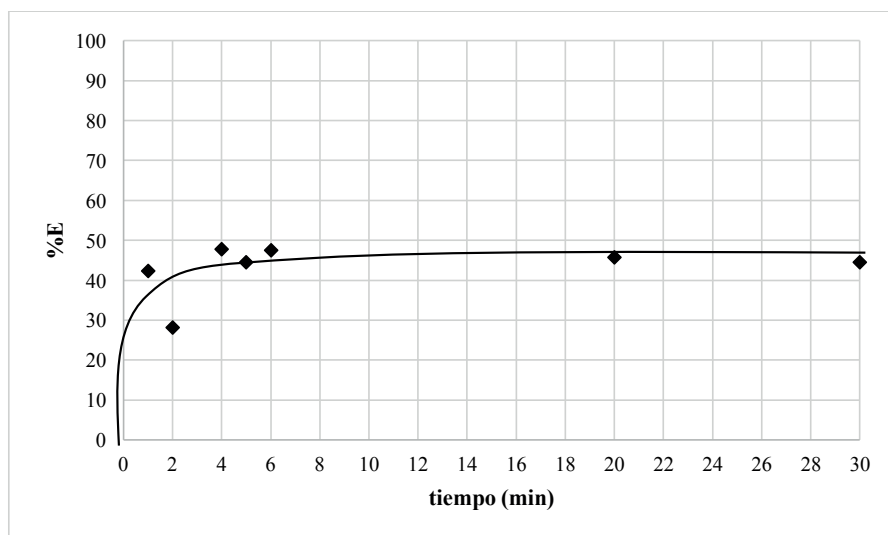
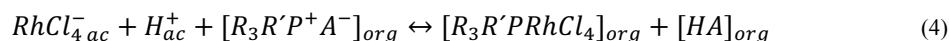


Figura 4. Efecto del tiempo de equilibrio en la extracción de Rh(III). FO: 0.3 mol/L Cyphos IL 104, FA: 20 ppm Rh (III), 0.1 M HCl, FO/FA=1.

Tabla. 1. Porcentaje de extracción de Rh(III) después del tiempo de equilibrio.

Tiempo (h)	%E
1	44.31
2	49.38
4	49.32
8	49.41

Se ha propuesto el mecanismo de extracción para la extracción de Ga (III) con Cyphos®IL 104 (Nayak et al, 2017) y debido a que las condiciones de experimentación son similares, se propone el siguiente mecanismo de intercambio aniónico para la extracción de Rh(III):



De acuerdo a la ecuación 4) el rodio(III) forma un complejo con los cloruros, debido al medio, para después llevarse a cabo el intercambio aniónico con el ion fosfinato (A⁻).

CONCLUSIÓN

El máximo porcentaje de desextracción Rh(III), el cual fue de 62.24%, se obtuvo utilizando Cyphos®IL 104 a una concentración de 0.3 M en un medio de ácido clorhídrico 1 M. Al aumentar la concentración de HCl en la fase acuosa de despojo disminuye el porcentaje de desextracción, ya que a concentración 7 M de HCl se obtuvo el menor %Des (7.387 %). Por otra parte, al evaluar el tiempo de contacto entre las dos fases, el porcentaje de extracción de Rh(III) aumenta, teniendo a un tiempo de contacto de 8 horas el porcentaje de extracción más alto (49.41 %). La cinética de extracción de Rh(III) fue rápida, el equilibrio de extracción de Rh(III) en medio cloruro, usando el líquido iónico Cyphos®IL 104, se alcanza en un tiempo de 6 minutos de contacto entre las dos fases.

BIBLIOGRAFÍA

CHOLICO, D., GONZALEZ, M. P., NAVARRO, R., SAUCEDO, T. I., ÁVILA-RODRÍGUEZ, M. (2013). “Líquidos iónicos: Hacia el desarrollo de sistemas sustentables de separación” en *EntreTextos*, Núm. 14, Agosto, [pp. 24-31].

CIESZYNSKA, A., WIŚNIEWSKI, M. (2011). “Extractive recovery of palladium(II) from hydrochloric acid solutions with Cyphos®IL 104” en *Hydrometallurgy*. Núm. 113, Diciembre, [pp. 79-85].

NAYAK, S., DEVI, N. (2017). “Studies on extraction of gallium(III) from chloride solution using Cyphos IL 104 and its removal from photodiodes and red mud” en *Hydrometallurgy*, Núm. 171, Abril, [pp. 191-197].

POSPIECH, B. (2015). “Studies on extraction and permeation of cadmium(II) using Cyphos IL 104 as selective extractant and ion carrier” en *Hydrometallurgy*, Vol. 154, Abril [pp. 88-94].

AGRADECIMIENTOS

Quiero Agradecer al Dr. Mario Ávila Rodríguez por brindarme la oportunidad de trabajar con él y por todo el apoyo que me dio durante mi estancia, también a la Dra. Liliana Hernández Perales por ayudarme en todo lo que necesitaba. Así también le agradezco a Ruth Acosta, Ivonne Martínez, Indra Oliva y Jusvy García por ser las mejores compañeras de trabajo y más que eso la mejor familia que pude tener en Guanajuato.

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE BIOCHAR A PARTIR DE CÁSCARA DE NUEZ MODIFICADA POR IMPREGNACIÓN DE Na_2CO_3

Hernández Ramírez, J. J.; Ocampo Pérez, R.; Coronado Oyarvide, P.; Medellín-Castillo N. A.

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; josejesushdzr@gmail.com; raul.ocampo@uaslp.mx; pedro.coronadoyarvide@gmail.com; nahumanca@hotmail.com

RESUMEN

La cáscara de nuez natural es considerada un material no poroso con área superficial muy pequeña y, por lo tanto, es un mal adsorbente de compuestos orgánicos. Se impregnó cáscara de nuez natural con Na_2CO_3 en proporciones 1:0.5, 1:1 y 1:2, y se utilizó para sintetizar biochar. Como resultado de esto, la porosidad y el volumen de poros aumentó, así como el área superficial de los materiales, que se incrementó hasta 400 veces. El análisis MEB corroboró que la estructura de los materiales modificados cambió significativamente, con canales más estrechos y profundos. El PCC de todos los materiales aumentó, siendo considerablemente mayor en los biochar modificados, por lo que la superficie se cargó más positivamente. Se realizaron experimentos de adsorción con azul de metileno, donde se observó que los materiales impregnados con Na_2CO_3 obtuvieron mayor capacidad de adsorción del compuesto.

ABSTRACT

Walnut shell is considered a non-porous material with small superficial areas and, as a result, it is a poor organic compounds adsorbent. Walnut shell was impregnated with Na_2CO_3 in 1:0.5, 1:1 and 1:2 ratios, and it was used to synthesize biochar. Consequently, the number and volume of pores increased, as well as the superficial area of the materials, which grew up to 400 times. The MEB analysis confirmed that the structure of modified materials changed significantly, with narrower and deeper channels. The PCC of all materials increased and it was considerably bigger in modified biochar, thus charging the surface more positively. Adsorption experiments were carried out with methylene blue, where Na_2CO_3 impregnated materials demonstrated a better adsorption capacity.

Palabras clave: cáscara de nuez, biochar, adsorción.

INTRODUCCIÓN

La remoción de contaminantes orgánicos nocivos presentes en el agua se ha convertido en uno de los principales problemas durante los últimos años. Es por esta razón que actualmente se busca sintetizar materiales novedosos que posean una gran capacidad de adsorción de dichos compuestos a partir de materia prima poco costosa y amigable con el medio ambiente. Un ejemplo es la cáscara de nuez natural, un producto residual biodegradable, cuya cantidad de desecho ha ido en aumento debido al incremento en la producción de nuez. Sin embargo, existen pocas referencias bibliográficas sobre métodos de producción de biochar a partir de cáscara de nuez debido a que ésta es considerada un material no poroso y, por lo tanto, su capacidad de adsorción es baja comparada con la de otros residuos orgánicos. Así, el principal objetivo de este trabajo es modificar la cáscara de nuez natural con el fin de sintetizar biochar con una mayor porosidad y con ello obtener una mayor área superficial del material para así mejorar la capacidad de adsorción de compuestos orgánicos como el azul de metileno.

METODOLOGÍA

Pretratamiento de la cáscara de nuez natural

La cáscara de nuez fue lavada con agua desionizada y se dejó secar en un horno a 100°C por varios días para finalmente ser molida a un diámetro de partícula de 0.595 mm. Es este material al que desde ahora se referirá como cáscara de nuez natural.

Modificación de la cáscara de nuez natural con Na_2CO_3

La cáscara de nuez natural fue impregnada con Na_2CO_3 de la siguiente manera:

Se prepararon suspensiones en proporción 1:0.5, 1:1 y 1:2 en peso de cáscara de nuez: Na_2CO_3 , para lo cual se pesaron 7.5, 15 y 30 g de Na_2CO_3 y se disolvieron en agua desionizada. Cada solución se agregó lentamente a 15 g de cáscara de nuez natural y, con ayuda de una lámpara de tungsteno de 250 W, se evaporó el agua con el fin de impregnar la sal. Finalmente, los materiales se lavaron en repetidas ocasiones con agua desionizada hasta que el pH se mantuvo constante y se secaron en una estufa a 110°C por 24 horas.

Síntesis de biochar

Tanto la cáscara de nuez natural como la cáscara de nuez modificada fueron calcinadas en un horno Carbolite GHC 1200. Se utilizó una rampa de calentamiento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$ en una atmósfera inerte con un flujo de N_2 igual a 100 mL/min. Se pesaron 15 g de la cáscara de nuez natural y se calcinaron a 400, 600 y 700°C , manteniéndose en dicha temperatura durante 2 horas, para posteriormente dejar enfriar cada muestra a temperatura ambiente. Estos materiales se denominaron WS-400, WS-600 y WS-700. De igual manera, se pesaron 15 g de cada material de cáscara de nuez modificada y se calcinaron a 700°C a las condiciones antes descritas. Se les asignó el nombre de WSM0.5, WSM1 y WSM2.

Análisis termogravimétrico

Durante la síntesis de biochar tienen lugar un gran número de reacciones de descomposición del material lignocelulósico, de ahí que es necesario realizar un análisis termogravimétrico para observar el comportamiento de la cáscara de nuez natural a diferentes temperaturas. Se realizó este estudio en un equipo TA Q50 con una rampa de

calentamiento de 10°C/min hasta alcanzar una temperatura de 800°C y en una atmósfera de N₂. Se registraron los datos en una curva de porcentaje de descomposición de la muestra en función de la temperatura, a partir de la cual se calculó la velocidad de pérdida de peso y con ello se obtuvieron los máximos de descomposición con su respectiva temperatura para, según datos reportados en la literatura, identificar el compuesto que se descompone a dicha temperatura.

Microscopio Electrónico de Barrido (MEB)

Las propiedades superficiales y estructurales de los materiales se observaron con un microscopio electrónico de barrido marca FEI Quanta 200. Este equipo genera un haz de electrones por medio de un filamento de tungsteno, el cual golpea la superficie de la muestra y como consecuencia se dispersa. Los electrones son detectados y utilizados para formar una imagen. Las imágenes fueron obtenidas empleando el detector de electrones secundarios.

Análisis por fisisorción de nitrógeno

Con el fin de cuantificar el área superficial de los materiales, así como determinar el tamaño promedio y volumen de los poros, se utilizó el método de fisisorción de nitrógeno en un equipo Micromeritics ASAP 2020. Su fundamento se basa en la medición del volumen de nitrógeno adsorbido, que se encuentra a temperatura cercana al punto de ebullición (77 K), a diferentes presiones en el equilibrio y se utilizó el método de Brunauer, Emmett y Teller (BET) para calcular el área superficial, así como el tamaño y volumen de los poros.

Determinación de la concentración de sitios activos

Para determinar la concentración de sitios activos en la superficie de los materiales se utilizó el método de titulación ácido-base de Boehm, el cual tiene como principio que los ácidos y bases fuertes reaccionarán con todas las bases y ácidos, respectivamente, mientras que los ácidos débiles neutralizarán únicamente a las bases de mayor pK_a (Fidel, 2013). De esta manera, se utilizaron las siguientes soluciones: 0.01N NaOH para neutralizar los ácidos carboxílicos, lactónicos y fenólicos; 0.01N HCl para neutralizar todos los sitios básicos; 0.01N Na₂CO₃ para los sitios carboxílicos y fenólicos; y 0.01N NaHCO₃ para los sitios carboxílicos. Los sitios fenólicos y lactónicos se calcularon por diferencia.

Se pesaron 0.05 g de cada material a los que se les agregaron 40 mL de cada una de las soluciones antes mencionadas en tubos de centrífuga de 50 mL. Los tubos se mantuvieron en agitación por 7 días y después se tomó una alícuota de 20 mL de cada tubo, la cual fue titulada con soluciones de NaOH y HCl valoradas.

La concentración final de la solución, que ya ha neutralizado los sitios activos de la cáscara de nuez, se obtuvo con la ecuación (1), donde C_f es la concentración final de la solución neutralizante (meq/L), C_T es la concentración de la solución titulante (meq/L), V_T es el volumen utilizado de la solución titulante (L) y V_m es el volumen de la muestra (L). Por otro lado, para calcular la cantidad de sitios activos neutralizados, se obtuvo la ecuación (2) por medio de un balance de masa, donde m es la masa del adsorbente (g), C_{sa} es la concentración de los sitios activos (meq/g), V es el volumen agregado de la solución neutralizante (L), C_i es la concentración inicial de la solución neutralizante (meq/L) y C_f es la concentración final de la solución neutralizante (meq/L).

$$C_f = \frac{C_T V_T}{V_m} \quad (1)$$

$$C_{sa} = \frac{m}{V} (C_i - C_f) \quad (2)$$

Punto de carga cero (PCC) y distribución de la carga superficial

El punto de carga cero se determinó experimentalmente preparando 23 soluciones con valores de pH de entre 2 y 10. Lo anterior se logró agregando volúmenes de soluciones valoradas 0.1M de HCl o NaOH que van desde 0.4 hasta 16 mL, y aforando con una solución de NaCl 0.1M en matraces de 100 mL. Se tomaron 20 mL de cada solución y se agregaron a 0.05g de cada material de cáscara de nuez. Los tubos se agitaron por 5 días y se midió el valor del pH final de cada uno de ellos. Se midió también el pH inicial de cada solución preparada para graficar las curvas de pH inicial y pH final en un diagrama de pH contra volumen de HCl/NaOH agregado. El PCC es la intersección entre ambas curvas y, a pHs menores que éste, la carga neta del material es negativa, mientras que a pHs mayores la carga superficial se encuentra cargada positivamente.

El valor de la carga superficial se calculó con la fórmula (3), donde C_s es la carga superficial total neta del material a un cierto valor de pH (C/g), C_N es la concentración de la solución neutralizante (mol/L), V_B es el volumen de solución de HCl/NaOH valorados utilizado para neutralizar la solución blanco (L), V_s es el volumen de solución de HCl/NaOH valorados utilizado para neutralizar la solución con el material (L), m es la masa del material (g) y F es la constante de Faraday (96,485 C/mol).

$$C_s = \frac{C_N (V_B - V_s)}{m} * F \quad (3)$$

Experimentos con azul de metileno

Para determinar la capacidad de adsorción de los materiales se realizaron pruebas con azul de metileno. Se prepararon soluciones pH 7 de concentraciones 10, 20, 50, 100, 150 y 200 ppm a partir de una solución madre de 1000 ppm de azul de metileno, y se agregaron 20 mL de cada solución a 0.05 g del material en tubos de centrífuga. Los tubos se mantuvieron en constante agitación por 5 días y, transcurrido dicho periodo, se tomó una muestra de cada tubo que fue analizada en un espectrofotómetro UV-visible marca Dynamica Halo XB-10 a una longitud de onda de 664.5 nm para determinar la concentración final de la solución.

La cantidad de soluto adsorbido en la superficie del material se obtuvo con la fórmula (4), donde q es la cantidad de azul de metileno adsorbido (mg/g), V es el volumen de solución de azul de metileno agregado (L), m es la masa del

material (g), C_i es la concentración inicial de la solución de azul de metileno (mg/L) y C_f es la concentración final de la solución de azul de metileno (mg/L)

$$\square = \frac{\square}{\square} (\square_{\square} - \square_{\square}) \quad (4)$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis termogravimétrico

En la curva termogravimétrica de la cáscara de nuez natural que aparece en la Figura 1 pueden identificarse tres zonas principales que corresponden a la pérdida de agua, la volatilización de componentes con estructura similar a la hemicelulosa, y la descomposición de la celulosa y la lignina (Kar, 2011). En la curva de velocidad de pérdida de peso se observa un pico a 68°C que corresponde a la deshidratación de la muestra, otro pico a 283°C que representa la descomposición de los ácidos carboxílicos, y un último pico a 351°C, temperatura a la cual los sitios lactónicos se desorben de la superficie (Figueiredo et. al., 1999). Por lo anterior, se espera que tanto los sitios carboxílicos como los sitios fenólicos presentes en la cáscara de nuez natural se descompongan durante la síntesis de biochar, y su concentración sea cercana a cero en los experimentos de titulación ácido-base de Boehm.

Microscopio Electrónico de Barrido (MEB)

Como se observa en la Figura 2, la cáscara de nuez natural (a) y la cáscara de nuez calcinada a 700°C (b) poseen una estructura similar en cuanto a porosidad, forma y tamaño de poros se refiere. Se presentó el mismo caso con la cáscara de nuez calcinada a 400°C y 600°C, demostrando que la temperatura de calcinación no tiene gran influencia en la morfología del material durante la síntesis de biochar. Por otro lado, en las fotomicrografías de biochar modificado en relación 1:1 (c) y 1:2 (d) se observó un cambio estructural importante con respecto a la cáscara de nuez natural. Se notó una mayor porosidad, así como una mayor profundidad y menor diámetro de los mismos. Esto puede deberse a que el Na_2CO_3 comienza a descomponerse durante la síntesis del biochar y, como consecuencia, forma CO_2 que logra aumentar la porosidad presente en el material. Así pues, se espera que estos materiales posean una mayor área superficial y una mayor capacidad de adsorción comparados con el biochar sin modificar, información que será demostrada gracias al método de fisisorción de nitrógeno y los experimentos de adsorción de azul de metileno.

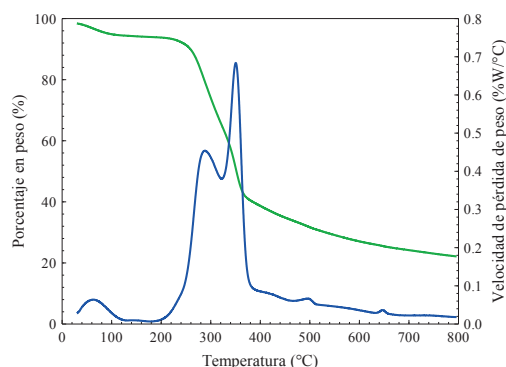


Figura 1. Análisis termogravimétrico de la cáscara de nuez natural.

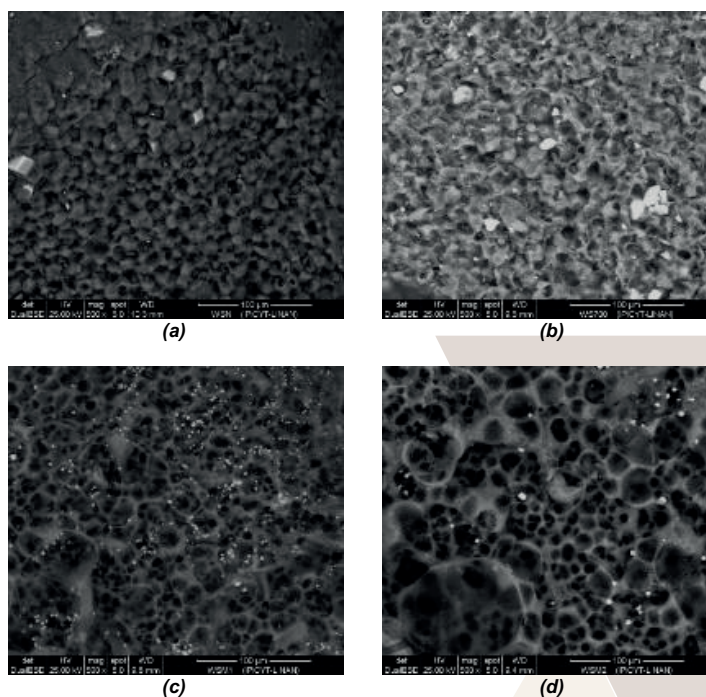


Figura 2. Fotomicrografía de (a) WS, (b) WS-700, (c) WSM1 y (d) WSM2.

Análisis por fisisorción de nitrógeno

Las propiedades de textura de los materiales aparecen en la Tabla 1, donde se observa que la síntesis de biochar a partir de cáscara de nuez natural no alteró significativamente las propiedades de los materiales. Sin embargo, los materiales que fueron modificados aumentaron su área superficial hasta 400 veces más que la cáscara de nuez natural. De igual manera, el volumen de poros aumentó también considerablemente en más de 70 veces. No obstante, el diámetro promedio de los poros sufrió una disminución, resultando en canales más estrechos y finos, como ya se había observado en las fotomicrografías del MEB. Debido a la mayor área superficial y volumen de poros, es posible inferir que la capacidad de adsorción del biochar modificado será notablemente mayor que la del biochar sin modificar.

Tabla 1. Propiedades de textura de los materiales.

Material	S_{BET} (m ² /g)	V_p (cm ³ /g)	D_p (Å)
WS	0.2033	0.001301	256.1
WS-400	0.1354	0.001506	444.9
WS-600	0.1220	0.001114	365.1
WS-700	0.1623	0.003505	864.1
WSM0.5	88.16	0.09449	42.87
WSM1	80.20	0.09191	45.03
WSM2	59.18	0.1077	73.09

Determinación de la concentración de sitios activos y punto de carga cero

En la Tabla 2 se presentan los resultados obtenidos del método de titulación de Boehm. Tanto la cantidad de sitios carboxílicos como la de sitios lactónicos disminuye conforme se incrementa la temperatura de calcinación de la cáscara de nuez, lo cual es congruente según el análisis termogravimétrico realizado, donde se observa que la temperatura de descomposición de ambos grupos funcionales es menor a 400°C. Por otro lado, se notó que la modificación con Na₂CO₃ ocasionó un aumento de hasta 13 veces en el número de sitios básicos totales, así como la eliminación de los sitios ácidos que se encuentran en la superficie de la cáscara de nuez natural.

En la Tabla 2 se presentan también los resultados del PCC de los materiales. Éste aumentó casi 5 unidades de pH para los materiales impregnados con Na₂CO₃ comparado con el de la cáscara de nuez natural como resultado del aumento en la concentración de sitios básicos. El biochar producido a partir de cáscara de nuez modificada es un adsorbente de carácter básico, por lo que la superficie del material se encuentra cargada positivamente en su mayoría, lo cual favorece la adsorción por atracciones electrostáticas de compuestos cargados negativamente, como el azul de metileno. El PCC del biochar sin modificar aumentó de manera menos importante puesto que se mantuvo en un valor similar a las tres diferentes temperaturas de calcinación, y se considera un adsorbente de carácter neutro.

Tabla 2. Concentración de sitios activos y punto de carga cero de los materiales.

Material	Concentración de sitios activos (meq/L)					Punto de carga cero
	Carboxílicos	Lactónicos	Fenólicos	Ácidos totales	Básicos totales	
WS	0.11	0.29	1.00	1.40	0.13	5.91
WS-400	0.02	0.04	0.04	0.10	0.18	7.11
WS-600	0	0	0.12	0.12	0.32	7.06
WS-700	0	0	0.11	0.11	0.35	7.36
WSM0.5	0	0	0	0	1.64	10.59
WSM1	0	0	0	0	1.67	10.66
WSM2	0	0	0	0	1.69	10.73

Experimentos con azul de metileno

Como se mencionó anteriormente, se esperaba que la capacidad de adsorción de compuestos orgánicos como el azul de metileno sea mayor en el biochar preparado a partir de cáscara de nuez modificada debido a la mayor área superficial del material y a que su superficie se encuentra cargada positivamente. Los experimentos con azul de metileno comprobaron lo anterior ya que se observó un aumento de más de 8 veces en la cantidad máxima de azul de metileno que los materiales fueron capaces de adsorber. En la figura 3 se constata que el biochar WSM2 posee la mayor capacidad de adsorción de todos los materiales, llegando a una capacidad de hasta 0.175 mmol/g, comparado con las de biochar sin modificar que fueron menores a 0.015 mmol/g.

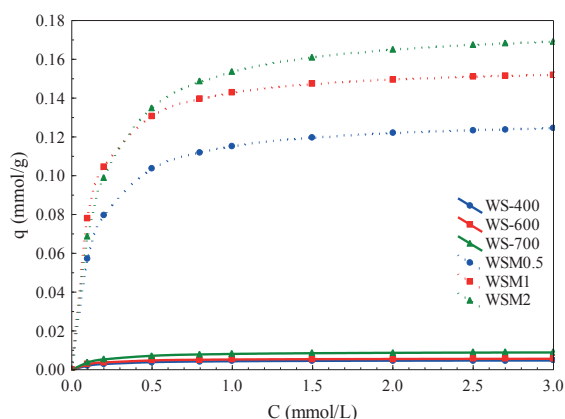


Figura 3. Adsorción de azul de metileno de los materiales.

CONCLUSIONES

Las imágenes del MEB revelaron el cambio en la morfología de los materiales al ser impregnados con Na_2CO_3 . Se observó que los materiales WSM0.5, WSM1 y WSM2 poseen una compleja estructura de canales profundos y estrechos que resultan en una mayor área superficial, como se constató en los experimentos de fisisorción de nitrógeno, con una mayor porosidad y volumen de poros. Se concluyó también que la temperatura de calcinación no tiene gran influencia en la morfología y estructura final del biochar sin modificar ya que éstas fueron similares a las de la cáscara de nuez natural.

El PCC de WS-400, WS-600 y WS-700 aumentó poco más de una unidad de pH con respecto al de WS, por lo que la superficie de estos materiales adquirió un carácter más básico. Los materiales WSM0.5, WSM1 y WSM2 aumentaron su PCC de manera mucho más considerable en hasta 5 unidades, por lo que la superficie se volvió más básica y, por lo tanto, más positiva.

Los experimentos de azul de metileno corroboraron que la capacidad de adsorción del biochar modificado mejoró, aumentando en más de 8 veces comparado con la del biochar sin modificar dado que tanto el área superficial como el volumen de poros incrementó, así como que la superficie cargada más positivamente incrementó la fuerza con la que el compuesto orgánico se adsorbió.

BIBLIOGRAFÍA

- Fidel, R. B., Laird, D. A., & Thompson, M. L. (2013). Evaluation of modified Boehm titration methods for use with biochars. *Journal of environmental quality*, 42(6), 1771-1778.
- Figueiredo, J. L., Pereira, M. F. R., Freitas, M. M. A., & Orfao, J. J. M. (1999). Modification of the surface chemistry of activated carbons. *Carbon*, 37(9), 1379-1389.
- Kar, Y. (2011). Co-pyrolysis of walnut shell and tar sand in a fixed-bed reactor. *Bioresource technology*, 102(20), 9800-9805.

REGISTRO DE FAUNA SILVESTRE EN LA SIERRA DE ALVAREZ, SAN LUIS POTOSÍ

Méndez González Karen Neftalí¹ y Espinosa Andrade Santiago Rafael²

RESUMEN

Las áreas naturales protegidas son la clave para la sobrevivencia de la fauna silvestre. Para lograr el manejo efectivo de las áreas naturales protegidas, es necesario conocer el estado actual de su biodiversidad. El objetivo de este proyecto actualizar el conocimiento de la fauna silvestre en el Área de Protección de Flora y Fauna Sierra de Álvarez, S.L.P. Se utilizaron trampas cámara para observar estudiar la fauna silvestre de Sierra de Álvarez. Se encontraron 13 especies de mamíferos y de 4 de aves. De las especies registradas, dos se encuentran en la NOM-059-SEMARNAT-2010. Se confirmó la presencia de especies que se creía ya no existían en la zona y registró una especie nueva, el zorrillo manchado occidental *Spilogale gracilis*.

ABSTRACT

Natural protected areas are key for the maintenance of wildlife. To achieve the effective management of protected areas, it is necessary to know the current state of biodiversity of these areas. The objective of this project was to obtain a current record of wildlife in the Area of Protection for Flora and Fauna Sierra de Álvarez, SLP. We used camera traps study wildlife. We registered 13 species of mammals and 4 species of birds. Of the registered species, two are included in NOM-059-SEMARNAT-2010. This study confirmed the presence of species that were believed to no longer exist in the area and recorded one new species in the area, the western spotted skunk *Spilogale gracilis*.

Palabras clave: conservación, fauna silvestre, biodiversidad

INTRODUCCIÓN

México es considerado como uno de los países con gran riqueza biológica, al contar con el 12% de la biodiversidad terrestre del planeta (CONABIO, 2017). Gracias a su ubicación en un área de transición entre dos biomas: la neotropical y neártica, la biogeografía de México es rica en flora y fauna (Neyra y Durand, 1998). Sin embargo, esta riqueza se ha visto afectada a lo largo del tiempo por una variedad de factores naturales y principalmente antropológicos, que ponen en riesgo ecosistemas completos, comprometiendo la sobrevivencia de la biota que la habita (Ceballos, 1993). Ante esta situación, se han creado estrategias de conservación como la política de áreas naturales protegidas (ANP) con diferentes categorías como Áreas de Protección de Recursos Naturales, Áreas de Protección de Flora y Fauna, Santuarios Reservas de la Biosfera, y otras. Estos espacios además de preservar el hábitat, tienen influencia cultural y social que involucra la presencia del hombre por lo que el éxito de conservación involucra y se logra con la participación de las comunidades aledañas (Valle 2006).

La fauna silvestre refiere a los animales que habitan de forma libre en una área y no necesitan del cuidado del hombre (Conafor, 2009), es un recurso natural renovable, con valor ecológico al formar parte del mantenimiento de hábitats, económico por los beneficios de auto consumo y venta, cultural y deportivo como la cetrería y la cacería. Esta fauna en muchas ocasiones se encuentra en ANP's, donde el 70% del terreno son propiedad ejidal en México (anónimo 1993, anónimo 2002.), y su aprovechamiento no está ampliamente documentado en estas áreas.

Al reconocer la gran diversidad, el registro faunístico actualizado funciona como una herramienta para conocer la riqueza y abundancia biológica, que permitan a futuro el desarrollo de estrategias de conservación y planes de manejo adecuadas.

San Luis Potosí, posee una gran diversidad en aspectos fisiográficos, climáticos y de vegetación que permite hospedar una amplia diversidad de especies (Rzedowski, 1961). Es el quinto estado con mayor biodiversidad en México (Rodríguez, 2017). El 30% de las especies de vertebrados se encuentran en alguna categoría de peligro de extinción. San Luis Potosí cuenta con 12 ANP de nivel estatal y 5 de nivel federal (Segam, 2015). Una de ellas es Sierra de Álvarez que ha sido ampliamente estudiada principalmente en la flora y, aunque existen registros de fauna silvestre (e.g., Martínez de la Vega 2003), estos no han sido actualizados. Según la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), el registro de fauna para S.L.P. es aún incompleto. Por esta razón, el objetivo de este estudio es actualizar el conocimiento de la fauna silvestre, particularmente vertebrados terrestres de tamaño mediano y grande, en el área de Protección de Flora y Fauna Sierra de Álvarez, S.L.P.

El Área de Protección de Flora y Fauna Sierra de Álvarez se encuentra en San Luis Potosí (N: 21° 42' 32" a 22° 23' 21" , W: 100° 05' 24" a 100° 49' 30") con una superficie de 2,265 km², distribuida entre los municipios de Armadillo de los Infantes, Cerro de San Pedro, Ciudad Fernández, Rioverde, San Luis Potosí, San Nicolás Tolentino, Santa María del Río, Tierra nueva, Villa Hidalgo y Zaragoza. El clima predominante es Semiárido, templado, con la temperatura media anual entre 12°C y 18°C con precipitación anual de 200 a 1800 mm anuales. El terreno abarca sierra, lomeríos, cañadas y piedemonte. Los principales tipos de vegetación son bosque de encino, bosque de pino,

matorral crasicaule y pastizal natural (Calderon, 1957). Las principales actividades productivas por la población son la ganadería, producción agrícola y a la minería.

METODOLOGÍA

Se realizó un muestreo sistemático con 30 cámaras trampa a una distancia promedio de 1 km entre una y otra para cubrir un área aproximada de 40 km². Las cámaras funcionaron por un periodo continuo de 35 días entre Junio y Julio 2017. Las cámaras utilizadas fueron (Cudde back digital ®) de 20 megapíxeles y se utilizó de cebo de atún en todas las estaciones. La identificación de especies se hizo con el apoyo de bibliografía especializada (Ceballos y Oliva 2005) y recursos en línea como los de CONABIO, Naturalista, SEGAM y la Lista Roja de la UICN.

RESULTADOS

Se registraron 13 especies de mamíferos (9 familias, 6 ordenes), en su mayoría carnívoros (Tabla 1), entre ellos *Puma concolor* (puma) (Fig. 1), *Lynx rufus* (lince rojo) (Fig. 2) y *Urocyon cinereoargenteus* (zorro gris) (Fig. 3). Entre las aves se encontraron 4 especies de 4 familias y 4 ordenes. De las especies registradas *Bassariscus astutus* (cacomixtle) (Fig. 4) y *Bubo virginianus* (Búho cornudo) se encuentran registradas NOM-059-SEMARNAT-2010, las dos especies con distribución endémica y en categoría de amenazadas.



Figura 1. Puma (*Puma concolor*)



Figura 2. Lince (*Lynx rufus*)

Tabla 1. Registro de fauna silvestre en la ANP Sierra de Álvarez

Clase	Orden	Familia	Especie	Nombre común
Mammalia	Carnivora	Canidae	<i>Urocyon cinereoargenteus</i>	Zorro gris
Mammalia	Carnivora	Canidae	<i>Canis latrans</i>	Coyote
Mammalia	Carnivora	Mephitidae	<i>Spilogale gracilis</i>	Zorrillo manchado occidental
Mammalia	Carnivora	Mephitidae	<i>Mephitis macroura</i>	Mofeta encapuchada
Mammalia	Carnivora	Felidae	<i>Puma concolor</i>	Puma
Mammalia	Carnivora	Felidae	<i>Lynx rufus</i>	Lince rojo
Mammalia	Carnivora	Procyonidae	<i>Bassariscus astutus</i>	Cacomixtle
Mammalia	Carnivora	Procyonidae	<i>Procyon lotor</i>	Mapache
Mammalia	Didelphimorphia	Didelphidae	<i>Didelphis marsupialis</i>	Tlacuache
Mammalia	Artiodactyla	Tayassuidae	<i>Pecari tajacu</i>	Pecarí de collar
Mammalia	Cingulata	Dasypodidae	<i>Dasypus novemcinctus</i>	Armadillo de 9 bandas
Mammalia	Artiodactyla	Cervidae	<i>Odocoileus virginianus</i>	Venado de cola blanca
Mammalia	Rodentia	Sciuridae	<i>Sciurus aureogaster</i>	Ardilla gris
Aves	Columbriformes	Columbidae	<i>Zenaida auriculata</i>	Paloma sabanera
Aves	Passeriforme	Corvidae	<i>Aphelocoma ultramarina</i>	Chara pecho gris
Aves	Cuculiformes	Cuculidae	<i>Geococcyx californianus</i>	Correcaminos nortño
Aves	Strigiformes	Strigidae	<i>Bubo virginianus</i>	Buho cornudo

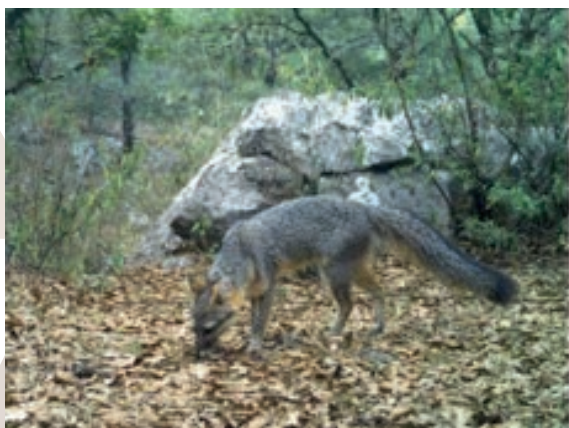


Figura 3. Zorra (*Urocyon cinereoargenteus*)



Figura 2. Cacomixtle (*Bassariscus astutus*)

DISCUSION

Dentro del último registro de Martínez de la Vega 2003, no se tenía registro de *Spilogale gracilis* en el área. En ese mismo estudio se menciona la importancia de las especies silvestres para los pobladores, en usos medicinales como el armadillo, tlacuache, zorrillo, venado, coyote y zopilotes; otros usos como peleteros, adorno, venta y comida. La importancia de la vida silvestre para las comunidades locales resalta la necesidad de crear programas de manejo adecuado de fauna con la finalidad de mantener las poblaciones de estas especies en el largo plazo.

CONCLUSIÓN

El presente estudio resalta la importancia de actualizar los registros faunísticos que son necesarios para la base de la creación de estrategias de conservación. Es necesaria la inversión en más proyectos amplios que permitan conocer la riqueza del estado de S.L.P. de todos los grupos animales.

REFERENCIAS

- ANÓNIMO (1993). *Áreas Naturales Protegidas de México*. SEDESOL. México, D.F. 215p.
- ANÓNIMO (2002). *Bosques y biodiversidad en riesgo: vulnerabilidad en áreas estratégicas y nuevos instrumentos de conservación*. Centro de Estudios del Sector Privado para el Desarrollo Sustentable (CÉSPEDES y PRONATURA, A.C. México, D.F. 261 p.
- CALDERÓN DE R., G. (1957). *Vegetación del valle de San Luis Potosí*. Tesis profesional. Esc. Nal. Cienc. Biol. México, D. F. 101 pp.
- CEBALLOS, G. (1993). *Especies en peligro de extinción*. Ciencias. Número Especial 7: 5.10
- CEBALLOS, G. Y G. OLIVIA. (2005). *Los mamíferos silvestres de México*. Fondo de Cultura Económica, CONABIO. México D.F. 986 pp.
- CONABIO. (2017). *La diversidad biológica de México*. Consultado en http://www.conabio.gob.mx/institucion/cooperacion_internacional/doctos/db_mexico.html (Fecha de consulta 18-07-2017)
- CONAFOR. (2009). *Manual técnico para beneficiarios: Manejo de vida silvestre*. (1era ed.). México: Coordinación General de Educación y Desarrollo Tecnológico.
- MARTÍNEZ DE LA VEGA G. (2003). *Utilización de la fauna silvestre de la sierra de Álvarez, San Luis Potosí*. Tesis Doctoral.
- NEYRA-GONZÁLEZ, L. Y L. DURAND-SMITH. (1998). *La Diversidad Biológica de México. Estudio del País*. Parte II, Recursos Naturales: Biodiversidad. 1ra. Ed. CONABIO, México, D.F. 62-96 pp.
- RODRÍGUEZ LUCERO, G. (2017). *Comunicación Social San Luis Potosí, el quinto estado con mayor biodiversidad*. Consultado en <http://www.uaslp.mx/ComunicacionSocial/Paginas/Divulgacion/Gaceta/Notas/2016/SEPTIEMBRE/JUEVES%2015/> (Fecha de consulta 15-07-2017)

SECRETARÍA DE ECOLOGÍA Y GESTIÓN AMBIENTAL (2017). *Áreas naturales protegidas en San Luis Potosí*. Consultado en <http://www.segam.gob.mx/ANPsIntro.html> (Fecha de consulta 12-07-2017)

VALLE RODRÍGUEZ, S. (2006). *Las áreas naturales protegidas de México. Un ejemplo de propuesta de gestión de un área protegida y plan de manejo en la Sierra de Monte Escobedo (Zacatecas, México)*. Tesis Doctoral. 223 pp.

ALTERACIONES DEL SISTEMA COLINERGICO ESTRIATAL EN UN MODELO DE RATA AUTISTA.

Cantú Flores K.; Ibáñez-Sandoval O.; Ibáñez Sandoval D. N.; Nolasco Alfaro K.; Aguilar Aguilar A. E.

Departamento de Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Venustiano Carranza 2405, Col. Los Filtros, C.P. 78210, San Luis Potosí, San Luis Potosí., MÉXICO,
karlacantuflores@hotmail.com; osvaldo.ibanez@uaslp.mx; osobanez@gmail.com

RESUMEN

El trastorno del espectro autista (TEA) es considerado de acuerdo con el DSM-V (American Psychiatric Association, 2013) como un trastorno del desarrollo neurológico, caracterizado por: déficit en la interacción y comunicación social, estereotipias y rigidez cognitiva. Su etiología es poco conocida, pero estudios han propuesto que una de las áreas cerebrales con cambios anatómico-funcionales es el estriado (NStr), principal vía de entrada a los ganglios basales asociado con funciones motoras voluntarias y cognitivas. En este sentido, Ibáñez-Sandoval Dayna N. (2016), mostró que el sistema colinérgico estriatal (SCE) se encuentra disminuido (~50%), en ratas de 60 DPN (días post-natal) expuestas al ácido valproico como un modelo del TEA.

El objetivo de este proyecto de investigación consistió en identificar las alteraciones anatómo-funcionales en el SCE a lo largo de la vida de la rata, desde edades tempranas, con inducción del modelo autista; en el cual se identificó una disminución significativa de interneuronas colinérgicas a lo largo de 7 (-44.9%) y 14 (-35.6%) DPN.

ABSTRACT

Autism spectrum disorder (ASD) is considered to be DSM-V as a neurodevelopmental disorder characterized by: deficits in social interaction and communication, stereotypies and cognitive rigidity. Its etiology is poorly understood, but studies have proposed that one of the brain areas with anatomic-functional changes is the striatum (NStr), the main entryway to the basal ganglia associated with voluntary and cognitive motor functions. In this sense, Ibáñez-Sandoval Dayna N. (2016), showed that the striatal cholinergic system (SCE) is decreased (~ 50%) in rats of 60 PND (post-natal days) exposed to valproic acid as a model of ASD.

The aim of this investigation project was to identify anatomic-functional alterations in SCE throughout the life of the rat, from early ages, with induction of the autistic model; In which a significant decrease in cholinergic interneurons was identified along 7 (-44.9%) and 14 (-35.6%) PND.

Palabras clave: autismo, núcleo estriado, interneuronas colinérgicas.

INTRODUCCIÓN

El trastorno del espectro autista (TEA) es considerado de acuerdo con el DSM-V como un trastorno del desarrollo neurológico, caracterizado por: déficit en la interacción y comunicación social, estereotipias y rigidez cognitiva. La ambigüedad de esta descripción va de la mano con lo poco que ha sido estudiado el TEA, sin embargo, en los últimos 50 años se ha tratado de encontrar la etiológica del TEA, con la finalidad de obtener una terapéutica puntual empleable. Esto ha dado acceso a diversas líneas de investigación, adquiriendo como resultado la multifactorialidad de la causa del TEA. Entre estos factores se encuentra el genético (Herman et al., 2007), el ambiental (p.e. tratamiento con valproato durante el embarazo (Kolevzon, Gross & Reichenberg, 2007) y la psicosocial.

Las alteraciones anatómo-funcionales encontradas hasta la fecha en el TEA se relacionan directa e indirectamente con la corteza media prefrontal, cerebelo, tracto oculomotor, tálamo y el sistema límbico entre otros. Este último, está conformado por diversos componentes entre ellos los ganglios basales, en donde específicamente el estriado ha tenido una relación con el TEA (Fuccillo, 2016).

El estriado (NStr) es la principal vía de entrada a los ganglios basales y tiene asociación con funciones motoras voluntarias y cognitivas (e.g. la atención). El NStr está conformado en un 95% de neuronas espinosas medianas (NEMs) de naturaleza GABAérgica y el 5% restante de diferentes subtipos de interneuronas, entre ellas las colinérgicas (Kawaguchi, 1993; Tepper et al., 2010; Ibáñez-Sandoval et al., 2011), las cuales participan en un microcircuito estriatal en donde pueden insidir sobre la actividad de las NEMs, repercutiendo en su salida sináptica. Además, se ha sugerido que este microcircuito participe en la reorientación del comportamiento a través de la colaboración en reactivar microcircuitos sensibles a las entradas excitatorias tálamo-estriales, impulsadas por un estímulo de alerta (Ibáñez-Sandoval et al., 2016).

Las alteraciones anatómo-funcionales encontradas hasta la fecha en el TEA se relacionan directa e indirectamente con la corteza media prefrontal, cerebelo, tracto oculomotor, tálamo y el sistema límbico entre otros. Este último, está conformado por diversos componentes entre ellos los ganglios basales, en donde específicamente el estriado ha tenido una relación con el TEA (Damasio & Maurer, 1978). Diversos reportes han mostrado que la conducta de la atención se encuentra afectada en pacientes con TEA, encontrándose un incremento en la conexiones sinápticas a nivel de la corteza media prefrontal, lo que pudiera explicar este incremento en la atención o hiper-atención (Markram y Markram, 2010), sin embargo, no es el único núcleo que participa en dicha conducta, también participa el estriado en donde se ha encontrado una alteración en el sistema colinérgico, lo que pudiera manifestar también esta hiper-atención que se observa en pacientes autistas. En este sentido, Ibáñez-Sandoval Dayna N. (2016), mostró que el sistema colinérgico estriatal se encuentra disminuido (~50%), en ratas expuestas al ácido valproico como un modelo del TEA. Esta disminución se vio más clara a nivel del NStr lateral dorsal a los 60 DPN.

El objetivo de este trabajo consiste en identificar alteraciones anatómo-funcionales en el núcleo estriado, en relación a las interneuronas colinérgicas (IC) a lo largo de la vida de la rata con inducción del modelo autista, tomando en

cuenta la asociación cronológica rata-humano, para con ello determinar si la disminución de IC comienza a edad temprana, su decremento es progresivo o si existe alguna otra variante, tomando en cuenta las edades 7, 14, 21, 35 y 60 días postnatal (DPN). Asimismo se propone que la variación en el número de neuronas IC podría ser en función de la migración, neurogénesis modificada, reducción/incremento de la muerte celular, modificaciones en la expresión génica o aumento/decremento de la supervivencia celular como resultado de alteraciones en la producción o disponibilidad de los factores neurotróficos, con los resultados obtenidos se pretende mejorar el entendimiento de los mecanismos cerebrales involucrados en el TEA.

METODOLOGÍA

La investigación requirió de múltiples procesos, en orden cronológico:

Inicialmente se realizó la obtención del modelo de TEA a partir de; la administración peritoneal de ácido valpróico en ratas gestantes (Ibáñez Sandoval, D. N.). En la investigación del TEA se han propuesto varios modelos para su estudio involucrando las aparentes etiologías, uno de ellos es el ambiental en el que con ácido valpróico administrado en gestación tanto en rata como humano se han observado conductas relacionadas al TEA, por lo cual es el modelo utilizado en este estudio (Schneider & Przewlocki, 2004).

De acuerdo al trabajo de Ibáñez-Sandoval (2016), se utilizaron ratas de la especie Sprague Dawley de las instalaciones del bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. A partir del día en que se visualizó el tapón espermático en la vulva de la rata, tomando ese día como el día 0, se realiza la inyección peritoneal de ácido valpróico (AVP) dosis única de 500 mg/kg en ratas preñadas al día 12,5 de gestación, en el grupo control (SHAM) se les administró 0.5 ml de solución salina isotónica (SSI).

Obtención y fijación de tejido cerebral de la rata.

Para llevar a cabo la realización de la inmunohistoquímica para la enzima ChAT, se continuó con el sacrificio para obtener el encéfalo de las ratas de ambos grupos, siguiendo el protocolo planteado por Ibáñez-Sandoval (2016), fue necesario limpiar el sistema nervioso central mediante una perfusión intracardiaca con un fluido cerebroespinal artificial (~200 ml) a un pH de 7.4. Inmediatamente después, se perfundió al animal utilizando una solución de paraformaldehído al 4% (~200 ml) para ser fijado. Posteriormente se procedió a la extracción de los cerebros los cuales fueron almacenados a 4°C durante 24 horas en la misma solución de paraformaldehído al 4%. Al día siguiente, los cerebros se colocaron en una solución de sacarosa al 30% y azida de sodio al 0.04% y se almacenaron a 4°C. Al menos, dos cambios se realizaron de la solución de sacarosa al 30%.

Inmunohistoquímica.

Se realizaron cortes coronales alternados de 40 µm a la altura del estriado con un vibratomo y se colocaron en una caja multi-pozos con PBS, obtenidos los cortes, se realizó la inmunohistoquímica de luz para la enzima ChAT utilizando el siguiente protocolo: 3 lavados de 5 min. cada uno con PBS 0.01 M. Se incubaron las rebanadas con metanol al 10% + H₂O₂ al 0.5% en PBS durante 15 min. Se preparó una solución denominada SUPERMIX a un pH 7.4 (tritónX100 al 0.5%, gelatina al 0.25% disuelto en TBS), a la cual se añadió el anticuerpo primario para ChAT (Anti-Choline Acetyltransferase polyclonal, goat, Merckmillipore: AB144P200UL) a una concentración de 1:400 (20 µl en 4 ml de SUPERMIX).

En cada pozo se añadieron 500 µl de la solución del anticuerpo primario (paso 3), se colocaron las series de cortes y se dejaron en agitación a temperatura ambiente durante 1 hora. Posteriormente el tejido se dejó incubar por 48 hrs. a 4°C. 3 lavados de 5 min. cada uno con PBS 0.01 M. Durante los lavados se preparó la solución del anticuerpo secundario (Anti Goat IgG/ Donkey, Jackson Inmun: 705-065-003, biotilado) en SUPERMIX (1:200; 20 µl en 4 ml de SUPERMIX). Se colocaron 500 µl de esta solución (paso 6), en cada pozo y se dejó incubando durante 2 hrs. en agitación constante. 3 lavados de 5 min. cada uno con PBS 0.01 M. En el último lavado se preparó una solución 1:500 del complejo avidina-biotina (Kit Vectastain Elite ABC – peroxidasa) (se añadieron 8 µl de cada una de las soluciones A y B en 4 ml de SUPERMIX), se añadieron 500 µl de la solución ABC (paso 9) por pozo y se dejó incubar durante 2 hrs. en agitación constante. 3 lavados de 5 min. cada uno con PBS 0.01 M.

Revelado.

Solución de revelado: 0.0125 g de diaminobenzidina (DAB) + 15 µl de H₂O₂ al 30 % + 500 µl de sulfato de níquel y amonio al 10% en 50 ml de TBS 1X a pH 7.4. Se colocó el tejido en la solución de revelado y se dejó actuar por 5 min. y finalmente 3 lavados de 5 min. con PBS 0.01M.

Montado del tejido.

Una vez realizada la inmunohistoquímica para ChAT, se colocaron los cortes en portaobjetos previamente silanizados al 3% y se dejaron secar a temperatura ambiente, durante dos días. Una vez montado y seco, el tejido fue sumergido en una serie de alcoholes a concentraciones crecientes (50%, 70%, 90% y 100%) durante 10 min. en cada uno para su deshidratación. Por último, los portaobjetos se sumergieron en xileno por 10 min. y se cubrieron con resina sintética y un cubreobjetos para su posterior análisis bajo el microscopio de luz.

Conteo celular.

Las muestras fueron observadas con un microscopio vertical de luz (Leica DMLS; Germany), usando un objetivo de 40X y con la ayuda de una cámara digital montada en uno de los oculares (AmScope; MU1400) conectada a una computadora. A continuación, se identificó al estriado y utilizando un acetato, el cual fue fijado al monitor de la computadora, se delineó el contorno del mismo y se marcaron las células ChAT positivas (ChAT+). Una vez terminado, se procedió a digitalizar los dibujos con ayuda del programa Adobe Illustrator CS6. Posteriormente, las

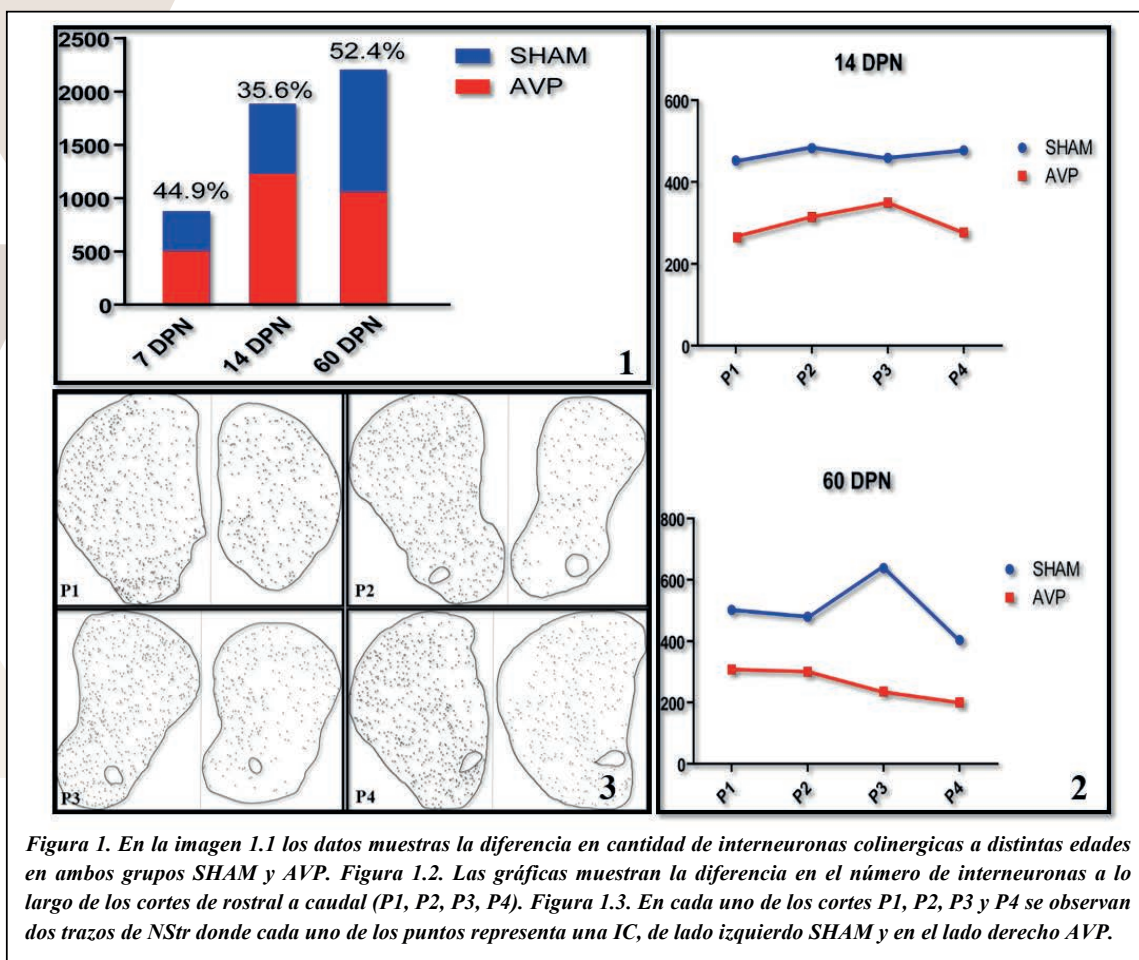
imágenes del NStr se dividieron en cuatro cuadrantes: estriado ventromedial (VMStr, estriado ventrolateral (VLStr), estriado dorsomedial (DMStr) y estriado dorsolateral (DLStr) y se realizó el conteo de las células ChAT+ para cada cuadrante.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los datos muestran una disminución significativa de interneuronas colinérgicas, se puede observar la reducción porcentual de éstas en la Figura 1.1, en la cual se muestra una comparativa que permanece desde los 7 DPN hasta los 60 DPN. En 7 DPN existe una diferencia de 44.9%, en 14 DPN 35.6% y haciendo la comparación con el trabajo de Ibañez-Sandoval D. N., 2016, en el que se encuentra una diferencia del 52.4%.

En la Figura 1.2 se grafica la diferencia en el número de interneuronas que hay a lo largo del núcleo NStr, en éstas se identifica una disminución significativa en el grupo de AVP de rostral a caudal (P1, P2, P3, P4) en comparación con SHAM; en las AVP se encuentra un número alrededor de 300 IC mientras que en el grupo SHAM alrededor de 500 IC. Asimismo se identifica el patrón de disminución en el NStr de los AVP en los diferentes niveles de corte en la Figura 1.3 se observan las ilustraciones creada en Adobe CS6.

Se puede observar en las imágenes (Figura 2) mayor espacio entre cada interneurona, por supuesto no es valorable



con estas imágenes, sin embargo hasta en una ampliación es reconocible esta diferencia entre AVP y SHAM.

CONCLUSIONES

Los resultados promueven la identificación de alteraciones anatomo-funcionales en el núcleo estriado en relación a las interneuronas colinérgicas (IC) a lo largo de la vida de la rata con inducción del modelo autista, ya que se encuentra una disminución de IC desde los primeros días de nacimiento (7 y 14 DPN) de la rata hasta los 60 DPN, lo cual puede sugerir que el decremento que permanece a lo largo del crecimiento.

Dicho esto se propone que la variación en el número de neuronas IC podría ser en función de la migración, neurogénesis modificada, incremento de la muerte celular, modificaciones en la expresión génica o decremento de la supervivencia celular como resultado de alteraciones en la producción o disponibilidad de los factores neurotróficos, con los resultados obtenidos se pretende mejorar el entendimiento de los mecanismos cerebrales involucrados en el TEA.

BIBLIOGRAFÍA

1. American Psychiatric Association. (2013) – Diagnostic and statistical manual of mental disorders (5 th). Washington, DC: Author.
2. Herman, G., Henninger, N., Ratliff-Schaub, K., Pastore, M., Fitzgerald, S., & McBride, K. (2007). Genetic testing in autism: how much is enough?. *Genetics In Medicine*, 9(5), 268-274. <http://dx.doi.org/10.1097/gim.0b013e31804d683b>
3. Kolevzon, A., Gross, R., & Reichenberg, A. (2007). Prenatal and Perinatal Risk Factors for Autism. *Archives Of Pediatrics & Adolescent Medicine*, 161(4), 326. <http://dx.doi.org/10.1001/archpedi.161.4.326>
4. Schneider, T., & Przewlocki, R. (2004). Behavioral Alterations in Rats Prenatally Exposed to Valproic Acid: Animal Model of Autism. *Neuropsychopharmacology*, 30(1), 80-89. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.npp.1300518>
5. Fuccillo, M. (2016). Striatal Circuits as a Common Node for Autism Pathophysiology. *Frontiers In Neuroscience*, 10. <http://dx.doi.org/10.3389/fnins.2016.00027>
6. Kawaguchi, Y. (1993). 1524 Functional characterization of three classes of interneurons in rat neostriatum. *Neuroscience Research Supplements*, 18, S163. [http://dx.doi.org/10.1016/s0921-8696\(05\)81133-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0921-8696(05)81133-8)
7. Black, D., & Grant, J. (2014). *Dsm-5tm guidebook*. Washington: American Psychiatri Publishing.
8. Hashimoto, T., Tayama, M., Murakawa, K., Yoshimoto, T., Miyazaki, M., Harada, M., & Kuroda, Y. (1995). Development of the brainstem and cerebellum in autistic patients. *Journal Of Autism And Developmental Disorders*, 25(1), 1-18. <http://dx.doi.org/10.1007/bf02178163>.
9. Bolam, J., Wainer, B., & Smith, A. (1984). Characterization of cholinergic neurons in the rat neostriatum. A combination of choline acetyltransferase immunocytochemistry, Golgi-impregnation and electron microscopy. *Neuroscience*, 12(3), 711-718. [http://dx.doi.org/10.1016/0306-4522\(84\)90165-9](http://dx.doi.org/10.1016/0306-4522(84)90165-9)
10. Pakhotin, P., & Bracci, E. (2007). Cholinergic Interneurons Control the Excitatory Input to the Striatum. *Journal Of Neuroscience*, 27(2), 391-400. <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.3709-06.2007>
11. English, D., Ibáñez-Sandoval, O., Stark, E., Tecuapetla, F., Buzsáki, G., & Deisseroth, K. et al. (2011). GABAergic circuits mediate the reinforcement-related signals of striatal cholinergic interneurons. *Nature Neuroscience*, 15(1), 123-130. <http://dx.doi.org/10.1038/nn.2984>
12. Ibáñez-Sandoval, O., Tecuapetla, F., Unal, B., Shah, F., Koos, T., & Tepper, J. (2011). A Novel Functionally Distinct Subtype of Striatal Neuropeptide Y Interneuron. *Journal Of Neuroscience*, 31(46), 16757-16769. <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.2628-11.2011>
13. Ibáñez-Sandoval Dayna N. 2016. “Alteraciones en el Sistema colinérgico del estriado en un modelo de autism en rata” Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Biomedicas Basica, Facultad de Medicina de la UASLP. San Luis Potosí, S.L.P. Mexico.
14. Damasio, A.R. and Maurer, R.G. (1978) A Neurological Model for Childhood Autism. *Archives of Neurology*, 35, 777-786. <http://dx.doi.org/10.1001/archneur>.
15. Markram, K. and Markram, H. (2010) The Intense World Theory – A Unifying Theory of the Neurobiology of Autism. *Front Hum Neurosci*. 2010; 4: 224. Published online 2010 Dec 21. Prepublished online 2010 Aug 16. doi: 10.3389/fnhum.2010.00224.
16. Tepper J. M., Tecuapetla F., Koos T. and Ibáñez-Sandoval O. (2010) Heterogeneity and diversity of striatal GABAergic interneurons. *Front Neuroanat* 4:150.

ESTIMACIÓN DE PRODUCCIÓN DE ENERGÍA SOLAR CONSIDERANDO LOS EFECTOS DE LOS PARÁMETROS METEOROLÓGICOS, EN LA REGIÓN ALTIPLANO DEL ESTADO DE SAN LUIS POTOSÍ.

Olvera Laura¹, Nava Dora¹, Reyes Diego¹

RESUMEN

Este trabajo muestra el estudio de la evaluación de la eficiencia de generación de energía de un panel solar considerando los cambios ambientales que se presentan en la Región Altiplano del estado de San Luis Potosí. Los experimentos se hicieron del 27 de junio al 5 de julio y se tomaron registros de los valores de carga resistiva que alimentan un panel solar (1.68 m^2) y de voltaje con un analizador de potencia continua *Pqube*. Se adaptó un sensor RTD Pt100 para registrar la temperatura de la celda durante un día; al mismo tiempo se obtuvieron datos irradiancia con una estación meteorológica. El rendimiento de la celda se correlacionó con la temperatura de la celda y datos extraterrestres (radiación); a través, de un modelo matemático. Demostrando que la energía fototérmica afecta el rendimiento de la celda solar (CP). Por lo que además de las celdas solares se propone instalar tecnología de concentración térmica (CPV).

ABSTRACT

This work shows the study of the evaluation of the energy efficiency of a solar cell considering the environmental changes that occur in Region Altiplano in the state of San Luis Potosi. Experiments were done during one week from the 27th of June at 5th of July. Permanent resistive load currents and voltages was measured continuously with power analyzer *Pqube*. A sensor RTD Pt100 was fitted to record the cell temperature during one day, at the same time, weather data were obtained with meteorological station. The cell performance was correlated to cell temperature and extraterrestrial data; through, a mathematical model. Proving that photothermal energy affects the performance of the solar cell. Therefore, it is proposed to install thermal concentration (CPV) technology and solar cells.

Palabras Clave: celda solar, sensor RTD Pt100, temperatura de la celda, parámetros meteorológicos.

INTRODUCCIÓN

El Acuerdo de París, tiene comprometido mantener el calentamiento global por debajo de los 2°C , implementado en su totalidad tecnología en energía renovable, en 195 países, a través de los recursos naturales como, el viento, el agua, el calor interno de la Tierra y el Sol. La energía solar, es una opción viable, en países, como México, que se encuentra en la región más favorable del cinturón solar y en el que, además, existe población que no tiene acceso a la electricidad. Por lo que resulta ser un recurso energético abundante, económico y no contaminante. El estado de San Luis Potosí, propiamente, la región Altiplano, es una zona rica en radiación solar, de la que sólo se ha aprovechado, menos del 1% en la producción de electricidad [SEMARNAT]. Desde esta perspectiva, es propicio realizar una estimación de tecnología solar instalada que cubra las demandas de la región.

Uno de los aspectos más importantes a considerar de la energía solar, es que emite radiación electromagnética (fotones que contienen diferente longitud de onda) en forma de luz, calor, rayos ultravioletas, entre otros. Por lo que la variación de la radiación, es aprovechada de dos maneras: por **conversión térmica de alta temperatura** (sistema fototérmico) y por **conversión fotovoltaica** (sistema fotovoltaico). La **conversión térmica de alta temperatura** consiste en transformar los fotones en calor. Este comportamiento es aprovechado en sistemas que utilizan la energía térmica para transformarla en mecánica y posteriormente en eléctrica, y son conocidos como sistemas de concentración de energía solar (CPS) por sus siglas en inglés [Norwood, y col., 2014]. Mientras que los sistemas fotovoltaicos (PV) convierten los fotones provenientes de la luz del sol en energía eléctrica a través de una celda solar [Norwood y col., 2014]. Las celdas solares están hechas de la unión p-n de dos materiales semiconductores, generalmente de silicio tipo p (posee espacios o huecos extra) y tipo n (posee electrones extra). Los fotones provenientes de la luz solar impactan sobre el silicio con una energía superior a la energía del electrón de valencia, promoviéndolo hacia la banda de conducción y, por tanto, generando un electrón-hueco. A través de un campo eléctrico, estas especies portadoras de carga se separan, ocurriendo el desplazamiento del electrón hacia la zona p y del hueco hacia la zona n. Ambas regiones al estar conectadas por un circuito eléctrico externo, generan corriente eléctrica a través de éste. Cuando la energía del fotón es menor a la requerida para que electrón se desplace hacia la zona p, ocurrirá un efecto denominado de recombinación, en el que el electrón regresa a ocupar un hueco, evitando viajar a través del circuito externo, afectando de manera significativa la eficiencia de la celda (9% - 17%). Luque y col. [2003], han planteado que este efecto es propiciado por los parámetros de la celda (materiales cristalinos, policristalinos o amorfos) y por variaciones en las condiciones ambientales que influyen en la irregularidad de la distribución de la energía solar. Esta última depende de la insolación que alcanza su valor máximo en horas, cuando el Sol está por encima del horizonte, así como, de la radiación solar. En este sentido la radiación global, involucra tres tipos: directa, difusa (a través de las distintas capas de la atmósfera ocurren procesos de absorción, reflexión y refracción) y la que es proyectada por el suelo. La potencia máxima de radiación es conocida como la *irradiancia* y la magnitud del valor que adquiere cuando se encuentra a una distancia media Tierra-Sol en el plano externo de la Tierra y perpendicular al Sol es de 1.37 kW/m^2 denominado constante solar. Por lo anterior, en ingeniería solar, el factor más importante a considerar es la radiación solar [Assi y col., 2010]. Sin embargo, las tecnologías que existen para medir la radiación solar, son de alto grado de sofisticación, que aún son de difícil acceso para países, como México [Almorox, 2004]. En este sentido, algunos autores han propuesto modelos que predicen la radiación solar a partir de parámetros meteorológicos que pueden medirse de manera fácil y confiable como, la duración de la luz solar, el índice de claridad, la velocidad del viento, la humedad relativa, la temperatura del

aire, la nubosidad, entre otros [Assi y col., 2010, Menges, 2006]. Algunos parámetros como la insolación y la temperatura en la celda, son utilizados para explicar el rendimiento de la misma. Durante el incremento de la temperatura, en la celda, la corriente permanece estable, mientras que el voltaje disminuye provocando una caída de potencia. Esto ocasiona que la eficiencia decrezca alrededor de 0.4 y 0.5% / °C, para las celdas de Si y 0.3% / °C para las de GaAs [Flores, s.f]. Dado lo anterior este trabajo tiene como objetivo medir la eficiencia de un panel solar considerando el efecto de la temperatura de la celda y la insolación, siguiendo un modelo matemático propuesto por Saglam, 2010. Como objetivo particular se instalará un sensor de temperatura RTD Pt100 a la celda acoplado a una tarjeta de desarrollo Arduino registrando los datos cada minuto.

MARCO TEORICO

Modelo que predice la eficiencia de la celda solar

La energía eléctrica instantánea generada por un panel fotovoltaico depende de varios parámetros dados por cada celda y de las condiciones ambientales como la insolación y la temperatura de la celda. Su comportamiento eléctrico puede modelarse a partir de una fuente de corriente no lineal conectada en serie con la resistencia intrínseca de las celdas, R_s [Saglam, 2010] el valor de esta resistencia es muy pequeño del orden de los $\mu\Omega$, el modelo se describe en la ecuación [Hussein et al., 1995].

$$i_{pv} = I_{ph} - I_{rs}(e^{q(v_{pv}+i_{pv}R_s)/AKT}-1) \quad (1)$$

Donde I_{ph} es la corriente generada bajo una insolación dada (fotocorriente), I_{rs} es la corriente de saturación inversa de la celda, i_{pv} y v_{pv} son la corriente y el voltaje de salida de la celda solar, respectivamente; q es la carga del electrón (1.602×10^{-19} C), K es la constante de Boltzmann (1.38×10^{-19} J/K) o (8.61×10^{-5} eV/K) y T es la temperatura de la celda dada en (K). A es el factor de idealidad de unión p-n de la celda ($A=3.36$) y se obtiene de acuerdo a la ecuación 2 [Moreno, 2014]. N_s es el número de celdas en serie (60 celdas), V_{dmp} es el voltaje en el punto de máxima potencia, V_{oc} es el voltaje de circuito abierto e I_{dmp} la corriente en el punto de máxima potencia. I_{sc} es la corriente de la celda de corto circuito a la temperatura de referencia (ver Tabla 1) y la insolación, K_I es el coeficiente de temperatura de corriente de cortocircuito (2.67×10^{-3} A/°C ó 9.73×10^{-6} A/K) y λ es la insolación (100 mW/cm^2).

$$A = \frac{q}{N_s K T_o} \left\{ \frac{V_{pmp} - V_{oc}}{\ln \left(1 - \frac{I_{pmp}}{I_{sc}} \right)} \right\} \quad (2)$$

La corriente de saturación inversa I_{rs} y la fotocorriente I_{ph} dependen de la insolación y la temperatura de la celda, de acuerdo a las ecuaciones 3) y 4) respectivamente:

$$I_{rs} = I_{or} \left(\frac{T}{T_r} \right)^3 e^{\left[\frac{q E_{go}}{KA} \left(\frac{1}{T_r} - \frac{1}{T} \right) \right]} \quad (3)$$

Donde I_{or} es la corriente de saturación inversa en la temperatura de referencia $T_r = 300$ K, de acuerdo a los parámetros del panel utilizada en este trabajo $I_{or} = 6.0$ A. E_{go} es la energía de banda de separación del semiconductor, utilizado en la celda. En este trabajo $E_{go} = 1.12$ eV para Silicio [Hussei y col., 1995].

$$I_{ph} = (I_{sc} + K_1(T - T_r))\lambda/100 \quad (4)$$

Sensor de temperatura RTD pt100

Para poder obtener lecturas de voltaje provenientes del sensor, se implementó un divisor de tensión, ecuación 5), los datos obtenidos fueron interpretados con la entrada analógica del Arduino (ADC).

$$V_{out} = \frac{R_2}{R_2 + R_1} V_{in} \quad (5)$$

Donde V_{out} es el voltaje de salida, R_2 (sensor Pt100), es la resistencia donde se quiere conocer el voltaje, R_1 es la resistencia fija (200Ω) y V_{in} es el voltaje de entrada.

El convertidor analógico digital del Arduino tiene una resolución de 10 bits, lo que significa que tiene 1023 escalones dentro del intervalo de (0.00 a 4.600 V) con una resolución de ± 0.004 V, por lo que se determinó un factor de conversión en el que 4.600 V equivalen a 1023 escalones. El modelo que se utiliza para obtener la temperatura de la celda (T_c) en función de los escalones, está dada en la ecuación 6):

$$T_c(E_{V(T)}) = a(E_{V(T)} - E_{V(25^\circ C)}) + T_R \quad (6)$$

Donde T_c es la temperatura de la celda, $E_{V(25^\circ C)}$ es el valor de escalón en el voltaje de entrada analógica del Arduino y tiene un valor 358, $E_{V(T)}$ es el valor del escalón en función de la temperatura de la celda, a es el factor de temperatura del escalón cuyo valor es de 0.42 °C, T_R es la temperatura de referencia y es de 25 °C.

MÉTODOS Y MATERIALES

Los experimentos se realizaron en la COARA en Matehuala, del 27 de junio al 5 de julio de 2017. El voltaje de salida (V_{output}) y la corriente de salida (I_{output}) se registraron en intervalos por minuto. La estación meteorológica registró la radiación solar (por minuto), mientras que el sensor de temperatura de la celda registró datos (por minuto) y estos fueron obtenidos para un día.

La tabla 1 contiene los datos de placa de los módulos que fueron monitoreados, la figura 1 muestra el diagrama de conexión que se siguió para la instalación del Pt100 y la adquisición de datos.

Datos de la celda	
Tipo de celda	Monocrystalina
Máxima potencia de salida (P_{mpp})	250 W
Número de celdas	60 (6X10)
Voltaje de corto circuito (V_{sc})	37.92 V _{dc}
Voltaje óptimo de operación (V_{mpp})	30.96 V _{dc}
Voltaje de circuito abierto (V_{oc})	37.3 V
Corriente de corto circuito (I_{sc})	8.58 A
Corriente óptima de operación (I_{mpp})	8.07 A
Temperatura de operación	-40 a 90°C
Voltaje máximo del sistema	600 V _{dc}
Resistencia al fuego	Clase C
Coefficiente de temperatura de I_{sc}	$2.67 \times 10^{-3} \frac{A}{^\circ C} / 8.75 \times 10^{-3} \frac{A}{^\circ C}$
Dimension del modulo	1640x99x40 mm

Tabla 1. Datos de placa de cada módulo fotovoltaico.

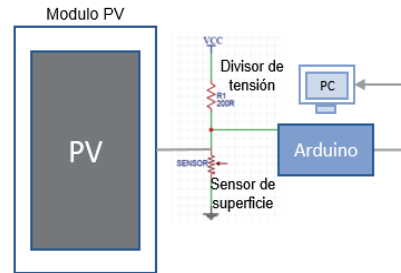


Figura 1. Diagrama de conexión del RTD Pt100 al módulo PV.

RESULTADOS

La figura 2 muestra el comportamiento del panel solar tanto para un día soleado, como para uno nublado. La potencia observada para un día nublado resulta ser mayor comparada con la del día soleado (figura 2), este comportamiento se debe a que ocurre una caída de potencial (figura 2b) que está relacionada con la energía de radiación fototérmica, que incrementa la temperatura de la celda [Saglam y col, 2010].

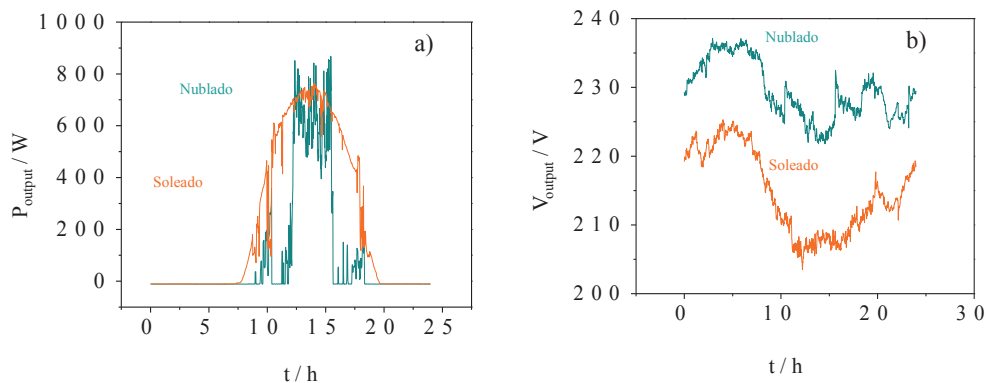


Figura 2. Gráfico que muestra los parámetros del panel solar: a) Potencia y b) Voltaje de salida para un día soleado (Naranja) y un día nublado (Azul).

El efecto de la tempera de la celda se hace evidente en la figura 3, en la que se observa una disminución tanto de potencial (figura 3a), como de corriente (figura 3b). Considerando que la temperatura de la celda es un parámetro a considerar en el rendimiento de un panel solar, este fue considerado en un modelo matemático, propuestos Saglam, descrito en la ecuación 1; así como lo datos temperatura obtenidos del sensor instalado. La figura 4 muestra la comparación entre los datos obtenidos de la corriente de salida obtenida experimentalmente (figura 4a línea azul) con respecto a los del modelo (figura 4b línea naranja), mostrando una aproximación en su comportamiento. Esto se debe a que faltó incluir el valor de la resistencia en serie de la celda R_s . Por lo que en estudios posteriores se desarrollará una estrategia experimental para su determinación e incluirlo en el modelo matemático.

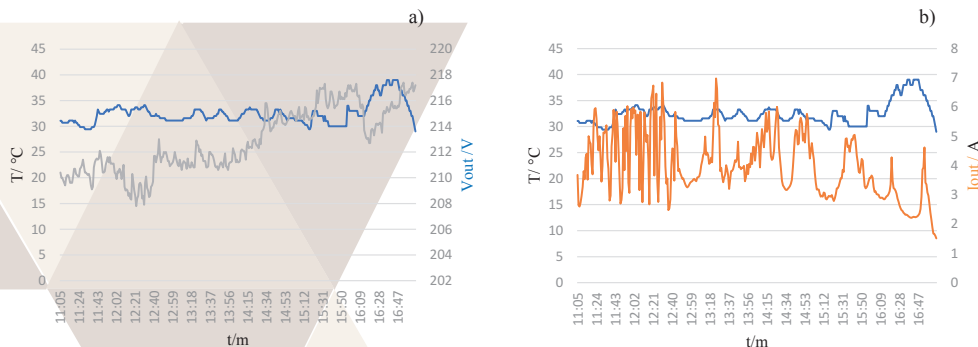


Figura 3. Gráficos que demuestran la influencia de la temperatura en los parámetros de: a) voltaje y b) corriente.

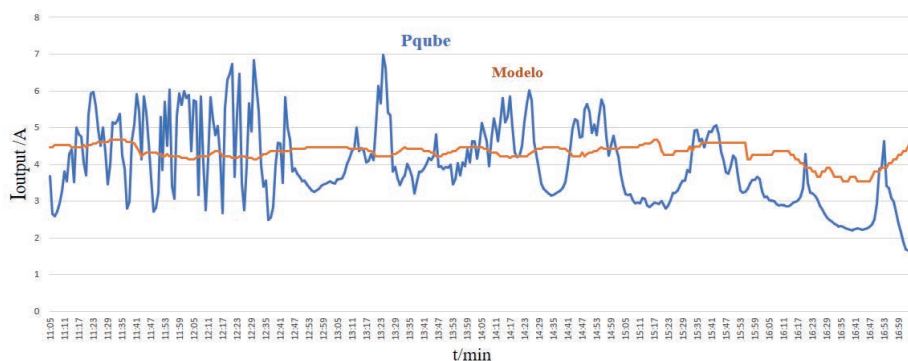


Figura 4. Gráficos comparativos del valor de la corriente experimental (línea azul) y teórica (línea naranja).

CONCLUSIONES

El estudio sistemático que se llevó a cabo en este trabajo comprueba que la energía fototérmica afecta el rendimiento de la celda solar (CP). El incremento de la temperatura de la celda baja la eficiencia de producción de energía eléctrica. Se observó que el rendimiento óptimo ocurre en un valor de temperatura de la celda de 25 °C. Esto señala la importancia de considerar el clima de la región para instalar tecnologías que aprovechen de manera óptima tanto la energía fotoquímica como la fototérmica. En zonas de clima cálido como la Región Altiplano, se propone instalar sistemas de concentración de energía térmica (CPS) y de potencial nominal, es decir, celdas solares (CP). La latitud septentrional de alta irradiancia de la zona Altiplano, sugiere instalar CP de películas policristalinas. La instalación de ambas tecnologías asegurara una producción mayor al 65% de la convencional.

BIBLIOGRAFÍA

- Almorox, J. Y., & Hontoria, C. (2004). *Global solar radiation estimation using sunshine duration in Spain*. *Energy Conversion and Management*, 45(9), 1529-1535.
- Assi, A., & Jama, M. (2010, May). *Estimating global solar radiation on horizontal from sunshine hours in Abu Dhabi-UAE*. In *Advances in Energy Planning, Environmental Education and Renewable Energy Sources*, 4th WSEAS international Conference on Renewable Energy Sources (pp. 101-108).
- Flores, N., & Domínguez, M. (sin fecha). *Medición de la eficiencia energética de paneles solares de silicio* (tesis de maestría). Centro de Investigación en Materiales Avanzados, S. C. Posgrado. MEXICO.
- Good, C., Chen, J., Dai, Y., & Hestnes, A. G. (2015). *Hybrid photovoltaic-thermal systems in buildings—a review*. *Energy Procedia*, 70, 683-690.
- Hussein, K. H., Muta, I., Hoshino, T., & Osakada, M. (1995). *Maximum photovoltaic power tracking: an algorithm for rapidly changing atmospheric conditions*. *IEE Proceedings-Generation, Transmission and Distribution*, 142(1), 59-64.
- Luque A., Hegedus, S., *Handbook of Photovoltaic Science and Engineering*, John Wiley & Sons Ltd, Great Britain, 2003.
- Menges, H. O., Ertekin, C., M. Sonmete, H., *Evaluation of solar radiation models for Konya, Turkey*. *Energy Conversion and Management* 47 (2006), 3149 – 73.
- Moreno, C. (2014). *Estudio sobre los sistemas solares fotovoltaicos para aplicarse fuera de la red* (tesis de licenciatura). Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Coordinación Académica Región Altiplano, Matehuala, San Luis Potosí, MEXICO.
- Norwood, Z., Nyholm, E., Otanicar, T., & Johnsson, F. (2014). *A geospatial comparison of distributed solar heat and power in Europe and the US*. *PloS one*, 9(12), e112442.
- Sağlam, Ş. (2010). *Meteorological parameters effects on solar energy power generation*. *WSEAS Transactions on Circuits and Systems*, 9(10), 637-649.

AGRADECIMIENTOS

A la doctora Margarita Teutli, por facilitarnos el equipo medidor multifuncional ambiental, al doctor Diego Espinoza, por permitirnos acceder a los datos del Pqube y la estación meteorológica.

DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS COLIFORMES TOTALES EN PLACA, DE QUESOS FRESCOS DE CABRA EN EL ALTIPLANO POTOSINO, SAN LUIS POTOSÍ, MÉXICO

Noemi Orozco Villegas¹ y María Cruz del Rocío Terrones Gurrola²

RESUMEN

La falta de higiene y de sanidad en el procesamiento y elaboración de los alimentos es un problema que aqueja usualmente a la población en general, aumentando la incidencia de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), y estas no se limitan al daño físico que causan, sino también al impacto socioeconómico negativo que conlleva tácitamente. El proyecto de investigación se realizó con el fin de obtener un análisis microbiológico del queso fresco de cabra en 7 municipios del altiplano potosino, para determinar así coliformes totales en placa mediante la técnica de unidades formadoras de colonia (UFC) según la norma NOM-113-SSA1-1994, encontrando que el 90% de muestras contienen un elevado número de coliformes, excediendo los límites máximos estipulados en la NOM-243-SSA1-2010, lo que conlleva a conocer y llevar a cabo una buena cadena de valor, con el fin de guiar al correcto seguimiento de las buenas prácticas de higiene y manufactura.

ABSTRACT

Lack of hygiene and sanitation in food processing and processing is a problem that usually afflicts the general population, increasing the incidence of foodborne diseases (FBD), and these are not limited to the physical damage they cause, but also to the negative socio-economic impact that it entails tacitly. The research project was carried out in order to obtain a microbiological analysis of fresh goat cheese in 7 municipalities of the Potosí highlands, in order to determine total coliforms in plaque using the technique of colony forming units (CFU) according to NOM-113 - SSA1-1994, finding that 90% of samples contain a high number of coliforms, exceeding the maximum limits stipulated in NOM-243-SSA1-2010, which implies knowing and carrying out a good value chain, with in order to guide the correct monitoring of good hygiene and manufacturing practices.

Palabras clave: Altiplano_ Potosino, coliformes_totales, quesos_frescos_de_cabra.

INTRODUCCIÓN

Desde la antigüedad, el queso ha sido uno de los más notables procesamiento de productos primarios que han alcanzado el nivel de creaciones gastronómicas. Durante la colonización se unificaron los gustos europeos e indígenas y se transformaron algunas técnicas de fabricación incorporando características propias de las zonas de producción, dando lugar a quesos mexicanos elaborados principalmente con leche de vaca y algunos con leche de cabra. México se ubica en el noveno lugar mundial en producción de quesos con alrededor de 268 mil toneladas. En donde las principales zonas productoras de queso incluyen Coahuila, Durango, Chihuahua, Oaxaca, Querétaro, Aguascalientes, Jalisco, Guanajuato, San Luis Potosí, Michoacán, Puebla, Tlaxcala, Toluca y Chiapas (SAGARPA, 2012).

Según del *Codex Alimentarius* propuesto por la FAO/OMS (2008); el queso es el producto sólido o semisólido, madurado o fresco, en el que el valor de la relación suero, proteínas, caseína no supera al de la leche, y que es obtenido por coagulación ya sea total o parcial de la leche por medio de la acción de ciertos aditivos como el cuajo o de otros agentes coagulantes adecuados, con un escurrido parcial del lactosuero (C. Ramírez López, 2012). El queso de cabra, a nivel mundial es considerado un producto de un alto valor nutricional, debido a su digestibilidad y asimilación de los productos lácteos caprinos por tener, glóbulos de grasa pequeños y mayor cantidad de vitamina A, calcio, potasio, cobre, magnesio y fósforo en comparación a la leche de vaca (Duran, 2010).

México es el principal productor de ganado caprino en América, con el 42.8% de la producción total del continente, según datos de la FAO. La producción de ganado caprino se realiza en zonas de producción extensiva (Guzmán, 2011). Una de las regiones caprinas más importantes de México es actualmente el Altiplano Potosino. La ganadería menor ha sido el medio de vida de gran parte de la población de esta región. En donde los municipios con mayor aglutinación de ganado son Villa de Guadalupe, Catorce, Cedral, Charcas, Matehuala, Vanegas, Venado, Moctezuma y Villa de la Paz por su condición desértica y de matorral (chaparros), le ha permitido una excelente adaptación al ganado. La ciudad de Matehuala, municipio más importante del altiplano potosino, es el principal centro nacional comercial de cabras (Ledesma, 2011).

En la zona del Altiplano Potosino existen alrededor de 700,000 cabras, con un 60% de hembras productoras de leche, de la cual se destina el 75% para la producción de quesos que en la mayoría de los casos se elabora a partir de leche sin pasteurizar lo que constituye un riesgo importante para la población (Mendoza, 2007).

Aunado a esto, la falta de un adecuado seguimiento de las buenas prácticas de manufactura (BPM) y de higiene (BPH) en el procesamiento que se emplea en la elaboración de quesos facilita la aparición de enfermedades originadas por la ingestión de dichos alimentos contaminados con microorganismos o sustancias tóxicas, denominadas genéricamente como Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) que actualmente son uno de los riesgos sanitarios más frecuentes a los que se enfrenta la población a nivel mundial (COFEPRIS, 2012).

Algunas de estas enfermedades son causadas por la presencia de microorganismos como son *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Enterococos*, Coliformes fecales y totales, entre otros. Sus consecuencias afectan negativamente el ámbito personal y laboral de las personas y pueden ser de gran impacto social cuando se presentan como brotes epidemiológicos (Armida Zúñiga Estrada, 2012).

El grupo de organismos coliformes son bacterias en forma de bacilos facultativamente aerobios Gram negativos que no forman esporas y fermentan la lactosa. El término bacterias coliformes se utiliza para designar a las enterobacterias más frecuentes encontradas en los productos lácteos. La cuenta de estas bacterias es uno de los medios más

significativos para la estimación de la calidad higiénica de la leche. Varias especies de la familia Enterobacteriaceae son los responsables de graves enfermedades infecciosas, que pueden adquirir carácter epidémico, en el caso de los productos lácteos las salmonelas son las más alarmantes. Existen fuentes de contaminación en los productos lácteos que se alcanzan por dos vías: la vía mamaria y medio externo. La vía mamaria se da cuando los microorganismos se adhieren a la piel de la ubre de la cabra y posteriormente al ordeño, entrando a través del esfínter del pezón y también pueden causar enfermedad sistémica que infecta la ubre, y por el medio externo puede ocurrir después de haber sido extraída de la glándula mamaria. Los utensilios, tanques de almacenamiento transportes e incluso el personal que manipula la leche (González-Cueto, 2007).

Esta investigación tiene como objetivo principal determinar las unidades formadoras de colonias de coliformes totales en placa, en quesos frescos de cabra de diferentes comunidades de municipios del altiplano potosino, San Luis Potosí, México mediante un análisis microbiológico, comparando los resultados obtenidos, así como sus límites máximos de acuerdo a la NOM-113-SSA1-1994 y NOM-243-SSA1-2010.

MÉTODOS Y MATERIALES

El presente trabajo se llevó a cabo según procedimientos concertados en diferentes normas oficiales mexicanas relativas a referido análisis microbiológico, con la finalidad de determinar coliformes totales en placa en queso fresco de cabra y se fundamenta en una investigación experimental- cuantitativa.

1. Ubicación: se elaboró la estructuración del muestreo, designando las comunidades productoras de queso consignadas en SAGARPA así como la fecha de visita de cada comunidad de los municipios de Cedral, Vanegas, Catorce, Charcas, Matehuala, Villa de Guadalupe y Venado pertenecientes al Altiplano Potosino.
2. Organización y preparación de materiales para la manipulación de la obtención de las muestras, de las cuales fueron adquiridas directamente del productor, según NOM-109-SSA1-1994 Procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.
3. Ya obtenidas las muestras, se sometieron a la preparación y dilución de los quesos de cabra, establecido en la NOM-110-SSA1-1994, Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.
4. Determinación de coliformes en placa mediante la técnica de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) según NOM-113-SSA1-1994, bienes y servicios. método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa y NOM-092-SSA1-1994 Método para la Cuenta de Bacterias Aerobias en Placa.
5. Equiparación entre los resultados obtenidos y los límites máximos de contenido microbiano para los quesos, estipulados en la NOM-243-SSA1-2010 Leche, fórmula láctea, productos lácteos combinados y derivados lácteos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 1. Se observa el mapa con la ubicación de diferentes comunidades de municipios de Cedral, Vanegas, Catorce, Charcas, Matehuala, Villa de Guadalupe y Venado. De las cuales pertenecen las muestras del queso de cabra sometidas a análisis para la determinación de coliformes en placa.

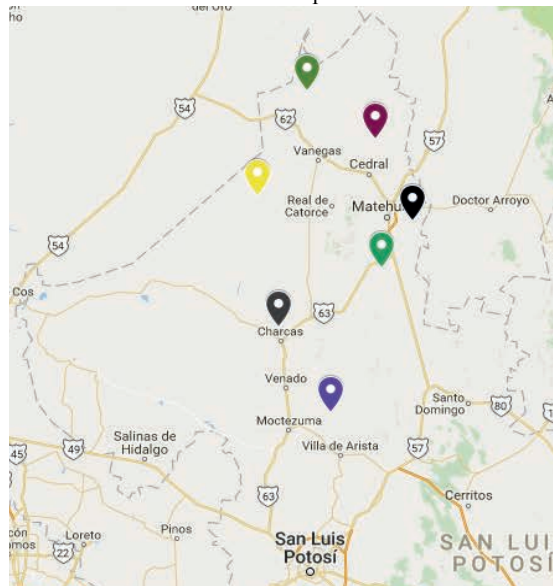


Figura 1. Ubicación de las comunidades productoras de queso registradas en SAGARPA.

Después de llevar a cabo la metodología estipulada referida precedentemente, se lograron los resultados explicados a continuación. En total se muestrearon 7 comunidades de los municipios mencionados anteriormente; una comunidad por cada municipio.

Tabla 1. Resultados de análisis microbiológico de queso fresco de cabra; determinación de coliformes en placa.

Nº DE MUESTRA	UBICACIÓN	COLIFORMES TOTALES (UFC/G)*
01.	Presa Verde, Cedral.	11,900
02.	Tepetate, Vanegas.	2,220,000
03.	Santa María del Refugio, Catorce.	177,500

04.	Noria del Cerro Gordo, Charcas.	No desarrollo de coliformes
05.	Buenavista, Matehuala.	1,800
06.	Guadalupito, Villa de Guadalupe.	Incontables.
07.	El Epazote, Venado.	625,000

*UFC/g en placa de agar rojo violeta bilis (RVBA), incubados a 35° C durante 24 ± 2h.

Tabla 2. Límites máximos de contenido microbiano para los quesos concertado en la NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.

MICROORGANISMO	LÍMITE MÁXIMO
Organismos coliformes totales	<100 UFC/g o ml

Al comparar el límite máximo de contenido microbiano de coliformes totales (tabla 2) con los resultados obtenidos de las muestras que se sometieron al análisis microbiológico para la determinación de coliformes totales (tabla 1) se puede percibir que la mayoría de las muestras exceden los límites máximos de organismos coliformes totales que deben de estar presentes en los quesos frescos de cabra, establecidos en la NOM-243-SSA1-2010.

(Camacho, 2011) nos mencionan en su análisis microbiológico de agua y hielo para consumo humano, que el grupo de bacterias coliformes totales comprende todos los bacilos Gramnegativos aerobios o anaerobios facultativos, no esporulados, que fermentan la lactosa, el grupo de coliformes está conformado por 4 géneros principalmente: Enterobacter, Escherichia, Citrobacter y Klebsiella.

Un estudio realizado por Luis D. et al., 2010 En Venezuela, sobre la caracterización fisicoquímica y microbiológica de quesos de cabra, nos refiere que los organismos coliformes totales se pueden encontrar en el suelo, comida, agua y tracto intestinal de humanos y animales; como consecuencia puede producir infecciones importantes, especialmente en huéspedes inmunodepresivos y son causa frecuente de infecciones en el hombre, en especial infecciones urinarias, meningitis neonatal y abscesos cerebrales, además de destruir las microvellosidades intestinales.

Los manipuladores tienen una importancia vital en la flora de los productos alimenticios. Junto con el aire constituyen una de las principales fuentes/vehículos de microorganismos para los alimentos. También el hombre es poseedor de una flora específica adaptada a los diferentes ambientes en los que se encuentra el cuerpo humano. Coliformes y Staphylococcus aureus son los principales microorganismos que participan en la contaminación de alimentos por el hombre. Los microorganismos poseen un gran interés e impacto en la vida diaria, ya que son fundamentales en la adquisición de algunos productos alimenticios pero son también los responsables del deterioro de gran parte de los alimentos, debido a ciertos factores como las características físico-químicas del propio alimento y a las condiciones de almacenamiento y ambientales. Además de que juegan un papel muy importante en las enfermedades de origen alimentario siendo los principales causantes de las mismas (Epralima, 2015)

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos al llevar a cabo el análisis microbiológico para determinar la presencia de coliformes totales en queso fresco de cabra en el Altiplano potosino se puede concluir que el 90% de las muestras de queso presentó un elevado número de unidades formadoras de colonias de coliformes, precediendo considerablemente los límites máximos de contenido microbiano para los quesos concertado en la NOM-243-SSA1-2010. La elevada carga microbiana en las muestras de queso analizadas refleja deficiencias higiénicas en la manipulación del queso fresco de cabra, lo cual representa un riesgo para la salud del consumidor. La buena higiene de los alimentos engloba las condiciones y medidas necesarias para comprometer una justa seguridad y salubridad de los productos alimentarios. Incluida la manipulación por el consumidor desde el momento en que adquiere el producto en un punto de venta hasta que lo prepara y consume. Para que se pueda dar una buena seguridad alimentaria se tiene que llevar a cabo un riguroso control de calidad de la materia prima durante su procesamiento hasta que se obtenga el producto final, pero también es de vital importancia lograr condiciones adecuadas de almacenamiento, transporte, tiempo de venta, y manipulación del producto final en los mercados donde se comercializa, hasta que finalmente llegue a la persona que consuma el producto; cadena de valor.

BIBLIOGRAFÍA

- Armida Zúñiga Estrada, C. O. (2012). Red PulseNet Su impacto en tu salud. *Revista COFEPRIS Protección y salud*. Recuperado el 30 de Junio de 2017, de <http://revistacofepris.salud.gob.mx/n/no6/ciencia.html>
- C. Ramírez López, J. V. (2012). Quesos frescos: propiedades, métodos de determinación y factores que afectan su calidad. *Temas selectos de ingeniería de alimentos.*, 131-148. Recuperado el 14 de Junio de 2017, de <http://web.udlap.mx/tsia/files/2013/12/TSIA-62Ramirez-Lopez-et-al-2012.pdf>
- Camacho, A. M. (2011). Análisis Microbiológico de Agua y hielo para consumo humano. (Determinación de bacteriascoliformes, coliformes fecales y Escherichia coli por la técnica de Número más probable (NMP). *Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos*, 1-16. Recuperado el 3 de Julio de 2017

Chaires., W. J. (2006). Los mercados asociados con los sistemas de producción de caprinos y las oportunidades de mercado. 1-25. Recuperado el 05 de Julio de 2017, de http://evirtual.uaslp.mx/Ambiental/Pmpca/Biblioteca/Articulos/PMPCA_Gome_Ruiz_%202006.pdf

COFEPRIS. (2012). *Programa: alimentos*. México: COMISIÓN FEDERAL PARA LA PROTECCIÓN CONTRA RIESGOS SANITARIOS. Recuperado el 24 de Junio de 2017, de <http://www.cofepris.gob.mx/Paginas/Temas%20Interes/Programas%20y%20Proyectos/Alimentos/Alimentos.aspx>

Duran, C. S. (2010). Caracterización fisicoquímica y microbiológica de quesos de cabra en Carora, estado Lara, Venezuela. *Zootecnia Tropical*, 28 (4), 467-475. Recuperado el 06 de Junio de 2017

Epralima. (2015). Microorganismos y alimentos. *Food quality*, 1-28. Recuperado el 10 de Julio de 2017, de http://www.epralima.com/infoodquality/materiais_espanhol/Manuais/3.Microorganismos_y_alimentos.pdf

González-Cueto, U. D.-V.-C.-E.-T.-F. (Marzo de 2007). Determinación de coliformes totales en los productos lácteos y su comparación entre dos queserías del municipio de Pijijiapan, Chiapas, México. *Bioquímica*, 98. Recuperado el 28 de Junio de 2017, de <http://www.redalyc.org/pdf/576/57609832.pdf>

Guzmán, G. M. (2011). *El mercado del queso de cabra en México*. Ministerio de agricultura. Chile: Embajada de Chile en México. Recuperado el 27 de Junio de 2017, de <http://www.consejagri.mx/images/boletininteligenciapdf/queso%20de%20cabra%202011.pdf>

Ledesma, M. I. (Enero- Junio de 2011). Vámonos con todo y chivas. *Revista del Colegio de San Luis*(1), 49-66. Recuperado el 4 de Julio de 2017

Mendoza, G. S. (2007). *Estandarización y mejoramiento del proceso de elaboración de queso a partir de leche de cabra en una zona del altiplano potosino*. Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Facultad de ciencias químicas, San Luis Potosí. Recuperado el 22 de Junio de 2017, de file:///C:/Users/SONY/Downloads/LIA1EMP00701.pdf

SAGARPA. (2012). *Querétaro es reconocido por su producción de quesos de alta calidad, inclusive a nivel internacional*. Querétaro: Boletín No. 033. Recuperado el 20 de Junio de 2017, de <http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/queretaro/boletines/2012/mayo/Documents/B0332012.pdf>

Sylvia Vázquez, S. O. (2013). Importancia de los coliformes en los alimentos. 1-2. Recuperado el 10 de Julio de 2017, de http://www.montevideo.gub.uy/sites/default/files/importancia_de_los_coliformes_en_los_alimentos.pdf

Norma Oficial Mexicana NOM-109-SSA1-1994, Bienes y servicios. Procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994, Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa.

Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placas.

Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por permitirme la vida y llenarme cada día más de sabiduría. A la Dra. María Cruz del Rocío Terrones Gurrola por permitirme colaborar y hacer posible la realización de esta investigación, además de manifestar mi más sincero agradecimiento por el apoyo brindado, por su paciencia, por su disponibilidad, por sus conocimientos, por preocuparse por el bienestar de sus estudiantes demostrando ser un excelente ser humano. Al MVZ Sixto Espinoza Franco por brindarnos su conocimiento sobre diferentes áreas de trabajo. A mi familia; por ser siempre mi apoyo incondicional. A mis compañeros; por compartir buenos momentos y poder hacer una buena empatía logrando así un buen trabajo en equipo. Al comité organizador de 19° Verano de la Ciencia de la Ciencia por darme la oportunidad de seguir ampliando mis conocimientos.

EVALUACIÓN DE LA REGENERACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ZnO Y NANOCOMPOSITOS ZnO/POLIPIRROL COMO ADSORBENTES DE CROMO (VI).

Hernández Loredo, N. E.¹ y Pérez Aguilar, N. V.²

RESUMEN

La contaminación de agua por Cromo (VI) aún en concentraciones traza, implica uno de los mayores riesgos para la salud y el ambiente, debido a que este elemento es altamente tóxico y a que se utiliza ampliamente en la industria. Una tecnología para remediar la contaminación de agua con Cr(VI) es la adsorción, que consiste en depositar el contaminante sobre la superficie de un material. En este trabajo se utilizaron nanopartículas de óxido de zinc (NPs ZnO) y un nanocomposito de NpsZnO-PPy, para adsorber Cr(VI) en solución acuosa utilizando ensayos de adsorción-desorción, para evaluar la vida útil de cada material. Se encontró que en cada ciclo, disminuye la capacidad de adsorción en los materiales probados, pero es menor en los nanocompositos. Se concluye que los materiales evaluados tienen una vida útil de al menos tres ciclos.

ABSTRACT

Water pollution by chromium (VI) even in trace concentrations implies one of the greatest risks to health and the environment, because this element is highly toxic and widely used in industry. Adsorption is a technology to remediate water pollution with Cr (VI), it consists in depositing the contaminant on the surface of a material. In this work, zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) and a NpsZnO-PPy nanocomposite were used to adsorb Cr (VI) in aqueous solution using adsorption-desorption assays to evaluate the useful life of each material. It was found that in each cycle, the adsorption capacity in the tested materials decreases, but it is lower in the nanocomposites. It is possible to use the tested materials at least three cycles.

Palabras clave: Adsorbente, Cromo (VI), Regeneración, Nanocompositos, Nanopartículas.

INTRODUCCIÓN

Actualmente, las nanoestructuras de óxido de zinc (ZnO) se investigan intensamente para conocer sus propiedades eléctricas, optoelectrónicas, fotoquímicas y catalíticas, con la intención de desarrollar aplicaciones en campos como catálisis, sensores de gas, celdas solares, pinturas, barnices, plásticos, productos farmacéuticos, láseres y dispositivos optoelectrónicos y en remediación ambiental. Dentro de los problemas ambientales que deben atenderse de forma prioritaria, la contaminación del agua es uno de los más relevantes debido al manejo de metales pesados en los procesos industriales, por los cuales se generan efluentes que resultan dañinos para la salud y el medio ambiente. Entre los metales más peligrosos se encuentra el cromo hexavalente, Cr(VI), utilizado ampliamente en la industria del cuero, la galvanoplastia y en la producción de pigmentos y baterías [1]. La Norma Mexicana NMX-AA-044-SCFI-2014 menciona que el cromo en su estado hexavalente resulta tóxico para los humanos, los animales y la vida acuática; se le ha asociado como un factor de riesgo del cáncer de pulmón cuando se inhala, así como de sensibilización en la piel [2].

Las nanopartículas de óxido de zinc (NPs ZnO) pueden sintetizarse por varios métodos que pueden resultar en morfologías esféricas, hexagonales, barras u hojuelas, cada una presenta diferentes propiedades [3-4]. Estas nanopartículas son un material que podría utilizarse para adsorber Cr(VI) presente en el agua, con la ventaja de emplear una masa menor del material, en comparación con la que se utiliza normalmente con adsorbentes comerciales. Por su parte, el polipirrol (PPy) ha sido investigado para aplicaciones de contaminación por Cr(VI) debido a su capacidad de reducirlo a Cr(III), una especie ambientalmente más manejable [5]. Por ello, la preparación de un material compuesto con NPs ZnO y polipirrol (NC ZnO/PPy) permitiría adsorber Cr(VI) en solución acuosa y probablemente reducirlo a Cr(III). En esta investigación, se evaluaron dos adsorbentes, NPs ZnO y NC ZnO-PPy, para remover Cr(VI) en solución acuosa, haciendo ensayos de adsorción y desorción en tres ciclos consecutivos, para estimar la vida útil de estos materiales.

MARCO TEÓRICO

Los estudios de adsorción y desorción permiten evaluar la vida útil de un material adsorbente. Los ensayos de adsorción permiten establecer la masa depositada en la superficie del material, posteriormente se realizan pruebas de desorción utilizando una solución adecuada para remover el adsorbato de la superficie del material. Estas soluciones pueden seleccionarse considerando algunos factores, como el pH y la naturaleza de la adsorción, que permitiría el uso de iones en solución que pudieran competir por los sitios de adsorción del adsorbente, desplazando a las moléculas del adsorbato. Con estas pruebas se determina si es posible regenerar el material para utilizarlo nuevamente durante cierto número de ciclos. La regeneración del adsorbente depende de la desorción, por lo que es

importante que se logre fácilmente y que las soluciones para la desorción sean efectivas, de bajo costo, no contaminantes y que no dañen la estructura del adsorbente [7].

METODOLOGÍA

Las NPs ZnO y los NC ZnO/PPy se sintetizaron por precipitación alcalina utilizando la metodología reportada por Ovando y col. [6]. Las pruebas de adsorción y desorción se realizaron para cada material utilizando ensayos por duplicado. Se realizaron tres ciclos de adsorción-desorción: la etapa de adsorción consistió en poner en contacto 20 mg del material adsorbente con 20 mL de una solución de Cr(VI) de 10 ppm de concentración inicial a pH 7. Esta suspensión se puso en agitación a 150 rpm y temperatura de 25°C en una incubadora orbital (INO 650V-7) durante 24h para alcanzar el equilibrio. Al concluir el periodo de agitación, se dejó sedimentar la fase sólida para extraer 10 mL de la fase líquida, la cual se conservó en un vial limpio para medir la concentración de Cr(VI) en el equilibrio. El volumen extraído se reemplazó por agua desionizada a pH 7 para realizar la etapa de desorción, que se realizó en las mismas condiciones de agitación, temperatura y tiempo que la etapa de adsorción. Al terminar la desorción, se separaron la fase líquida para medir la concentración en el equilibrio. La fase sólida se mantuvo en el vial para comenzar nuevamente el procedimiento descrito para las etapas de adsorción y desorción; este procedimiento se realizó un total de tres ciclos. En cada etapa de los ciclos de adsorción y desorción se registró el pH; la concentración de Cr(VI) en solución se midió de acuerdo a la metodología de la Norma Mexicana NMX-AA-044-SCFI-2014 [2], por espectrofotometría UV-Vis, para ello se preparó una curva de calibración con estándares de Cr(VI) de concentración desde 0.1 a 1 mg/L. La concentración inicial y en el equilibrio de las soluciones de Cr(VI) se midió a las soluciones previamente filtradas con membranas de celulosa de 22 µm de diámetro de poro. Con los datos de la concentración inicial y en el equilibrio se calculó la masa adsorbida y desorbida en la superficie de cada material.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Dos materiales adsorbentes, NP ZnO y NC ZnO/PPy se evaluaron con pruebas de adsorción y desorción durante tres ciclos consecutivos, para estimar la masa de Cr(VI) depositado en la superficie y que posteriormente se remueve con agua desionizada de pH 7. La concentración de Cr(VI) al inicio y en el equilibrio, se determinó por espectrofotometría UV-Vis, para calcular la masa adsorbida y desorbida en la superficie de los materiales, en cada etapa del experimento. La curva de calibración para medir Cr(VI) reportó un valor de $R^2=0.9997$. Los datos se analizaron con un balance de masa.

Los resultados de Cr(VI) en la adsorción y desorción sobre las NP ZnO, se reportan en la Tabla 1 y en la Figura 1. Los datos de que en la desorción de los ciclos 2 y 3 se reportaron como no detectado (n.d.), como consecuencia de que la concentración de Cr(VI) en solución fue menor que la registrada en los ciclos previos, 1 y 2, respectivamente, lo que sugiere que el cromo permaneció depositado en la superficie del material sin ser desorbido.

Tabla 1. Ciclos de Adsorción y desorción de Cr(VI) sobre NPs ZnO

Ciclo	Adsorción		Desorción	
	C_e (mg/L)	q_e (mg/g)	C_e (mg/L)	q_e (mg/g)
1	6.84 ± 0.06	7.01 ± 0.01	5.70 ± 0.13	0.19 ± 0.28
2	8.10 ± 1.10	0.45 ± 0.51	4.56 ± 0.08	n.d.
3	7.99	0.12	4.20	n.d.

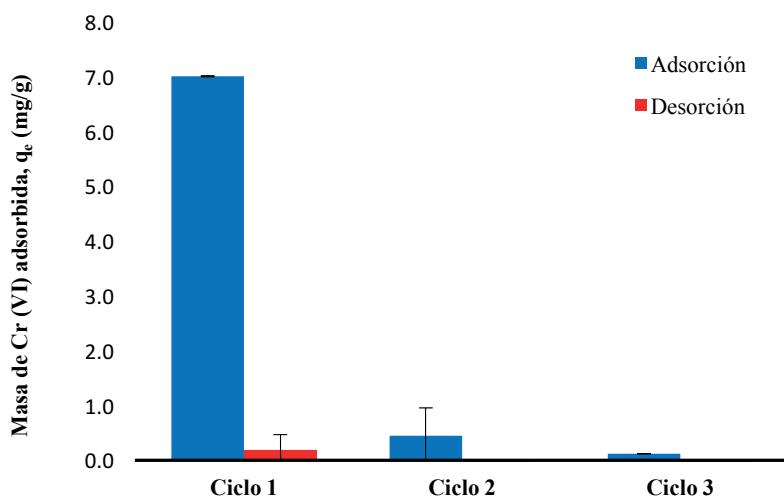


Figura 1. Masa de Cr (VI) adsorbida, q_e , utilizando NPs ZnO.

En la Figura 1 se observó que la capacidad de adsorción del Cr(VI) se reduce en cada ciclo, pero no se observó una desorción significativa del Cr(VI). Entre la adsorción de los ciclos 1, 2 y 3 y la desorción del ciclo 1 existió una acumulación de la masa adsorbida de Cr (VI) sobre las NPs ZnO y solo el ciclo 1 mostró desorción, por lo que la masa total de adsorbato depositada sobre las nanopartículas fue de 7.03 mg/g. Después de la adsorción del ciclo 1, el material presentó una disminución en la capacidad de adsorción del 96.3 % y del ciclo 2 al ciclo 3 del 73.3%. En el caso de la desorción, las cantidades de Cr (VI) desorbido resultaron muy pequeñas en comparación de las de la adsorción. Es probable que con las condiciones experimentales, en las que se utilizó una solución de concentración inicial de 10 mg/L, las NP ZnO tiene capacidad suficiente para adsorber el cromo, y que el agua desionizada a pH 7 no es suficiente para promover la difusión del cromo desde la superficie hacia la solución.

Los resultados de las pruebas con NC ZnO/PPy se presentan en la Tabla 2 y en la Figura 2. En los ciclos de adsorción 1 y 2 se observó que la capacidad de adsorción del material disminuyó 77.4%. Posteriormente, del ciclo 2 al 3, puede considerarse que permaneció constante. En cuanto a la desorción, esta fue menor en cada ciclo, lo que sugiere que el material mantiene al adsorbato retenido en la superficie, probablemente porque existe una cantidad suficiente de sitios de adsorción además de que utilizar solamente agua desionizada a pH 7 es insuficiente para desplazar las moléculas de adsorbato.

Tabla 2. Ciclos de Adsorción y desorción de Cr(VI) sobre NC ZnO/PPy

Ciclo	Adsorción		Desorción	
	C_e (mg/L)	q_e (mg/g)	C_e (mg/L)	q_e (mg/g)
1	7.33 ± 0.10	6.55 ± 0.15	1.32 ± 0.23	2.50 ± 0.04
2	5.17 ± 0.05	1.48 ± 0.06	2.27 ± 0.24	0.42 ± 0.36
3	5.22 ± 0.47	1.84 ± 0.16	2.73 ± 0.16	n.d.

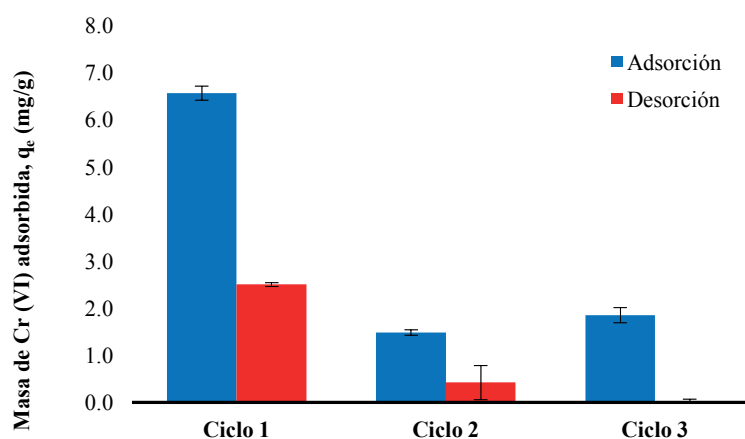


Figura 1. Masa de Cr (VI) adsorbida, q_e , utilizando NC ZnO/PPy.

Durante el ciclo 1 de adsorción-desorción las NPs ZnO adsorbieron mayor concentración de Cr(VI) que la de NC ZnO/PPy, pero en el segundo ciclo el adsorbente de NP ZnO se saturó. En contraste, los NC ZnO/PPy continuaron adsorbiendo en el ciclo 3. Para comparar la capacidad de adsorción de cada material, se sumaron los datos de q_e en las etapas de adsorción y desorción, dando como resultado que NP ZnO removió 7.77mg/g y NC ZnO/PPy 12.79mg/g, esto es una diferencia de 5.68mg/g o 70% en la capacidad de adsorción del compuesto con polipirrol.

Finalmente, el hecho de que la desorción no ocurrió de manera significativa en los materiales probados, sugiere que el material contiene suficientes sitios de adsorción para el cromo (VI). Esto también sugiere que el mecanismo de adsorción de Cr(VI) sobre la superficie de estos materiales podría ocurrir por la formación de complejos, por lo que es importante continuar investigando otras soluciones de desorción para desplazar el Cr(VI).

CONCLUSIONES

Materiales nanoestructurados preparados con nanopartículas de ZnO y nanocompuestos de ZnO/PPy adsorben Cr(VI) en solución acuosa a pH 7 y 25°C, y pueden utilizarse en ciclos consecutivos de adsorción y desorción, considerando

la concentración inicial del adsorbato. La desorción con agua desionizada a pH 7 no es suficiente para regenerar el material adsorbente, por lo que se debe investigar otras condiciones para desorber el Cr(VI) de manera eficiente.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Ahmed, N. M., & Yousef, N. S. (2015). "Synthesis and Characterization of Zinc Oxide Nanoparticles for the removal of Cr (VI)" en *International Journal of Scientific & Engineering Research*. 7(6), 1235-1242.
- [2] Norma Mexicana NMX-AA-044-SCFI-2014. "Análisis de agua-Medición de cromo hexavalente en aguas naturales, salinas, residuales y residuales tratadas-Método de prueba". Diario Oficial de la Federación, 13 de enero de 2015.
- [3] Kumar, S. S., Venkateswarlu, P., Rao, V. R., & Rao, G. N. (2013). "Synthesis, characterization and optical properties of zinc oxide nanoparticles" en *International Nano Letters*. 3(1), 30.
- [4] Sharma, R. K., & Ghose, R. (2015). "Synthesis of zinc oxide nanoparticles by homogeneous precipitation method and its application in antifungal activity against *Candida albicans*" en *Ceramics International*, 41(1), 967-975.
- [5] Alatorre, M. A., Gutie, S., Pa, U., & Ibanez, J. G. (1998). "Reduction of hexavalent chromium by polypyrrole deposited on different carbon substrates" en *Journal of applied electrochemistry*, 28(5), 551-557.
- [6] Ovando-Medina, V. M., López, R. G., Castillo-Reyes, B. E., Alonso-Dávila, P. A., Martínez-Gutiérrez, H., González-Ortega, O., & Fariás-Cepeda, L. (2015). "Composite of acicular rod-like ZnO nanoparticles and semiconducting polypyrrole photoactive under visible light irradiation for methylene blue dye photodegradation" en *Colloid and Polymer Science*, 293(12), 3459-3469.
- [7] Kołodyńska, D., Krukowska, J., & Thomas, P. (2017). "Comparison of sorption and desorption studies of heavy metal ions from biochar and commercial active carbon" en *Chemical Engineering Journal*, 307, 353-363.

DESARROLLO DE SEMICONDUCTORES PARA APLICACIONES EN CELDAS SOLARES

Aguirre Contreras, S.¹; Moreno García, H.²

¹Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Manuel Nava No. 6, C.P. 78260, San Luis Potosí, S.L.P., MÉXICO, samuel.aguirre@alumnos.uaslp.edu.mx; ²Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Lateral Av. Salvador Nava s/n. CP 78290, San Luis Potosí, S.L.P., MÉXICO, hamog@ier.unam.mx

RESUMEN

En el presente trabajo se reporta el desarrollo de dos semiconductores de película delgada. El depósito por baño químico fue la base para el crecimiento de las películas delgadas de seleniuro de cadmio (CdSe) y diseleniuro de tungsteno (WSe₂). Se parte con los detalles experimentales, tales como la preparación del baño químico, y las condiciones de trabajo. La formulación para el diseleniuro de tungsteno se fue perfeccionando al modificar la composición del baño químico, la temperatura y el tiempo. La caracterización estructural, óptica y morfológica de las películas obtenidas se realizó con análisis de espectroscopia de energías dispersiva de rayos X (EDX), RAMAN, y microscopia electrónica de barrido (SEM). El análisis EDX confirma que la identidad química de la película de CdSe. Los análisis RAMAN de igual forma comprueban que las formulaciones para el WSe₂ son adecuadas.

ABSTRACT

In this paper we report the development of two thin film semiconductors. Chemical bath deposition was the basis for the growth of thin films of cadmium selenide (CdSe) and tungsten diselenide (WSe₂). It starts with the experimental details, such as the preparation of the chemical bath, and the working conditions. The formulation for tungsten diselenide was further refined by modifying the composition of the chemical bath, temperature and time. The structural, optical and morphological characterization of the obtained films was performed with X-ray dispersive energy (EDX), RAMAN, and scanning electron microscopy (SEM) spectroscopy. EDX analysis confirms the chemical identity of the CdSe film. The RAMAN analyzes likewise prove that the formulations for WSe₂ are adequate.

Palabras clave: CdSe, WSe₂, baño químico.

INTRODUCCIÓN

Actualmente el desarrollo de las celdas solares se encuentra en constante innovación. A pesar de que existen celdas solares funcionales, sus eficiencias son bajas y los costos de producción no son los adecuados para suplir la demanda energética. Por ejemplo, las celdas solares a base de silicio se desarrollaron hace algunos años, pero ha sido muy difícil elevar su eficiencia. Al día de hoy la que posee la eficiencia más alta (fabricada con silicio) tiene un 25% de eficiencia, además que no es accesible obtener mucho silicio para producir a gran escala, con un bajo costo (National Renewable Energy Laboratory, 2017). Esto nos indica que el buscar nuevos materiales es una de las claves para el desarrollo de la energía solar.

Los nuevos materiales como el telurio de cadmio (CdTe) y la Perovskita, en los últimos 6 años han elevado de manera rápida sus eficiencias, hasta un $20.4 \pm 0.5 \%$ y $17.9 \pm 0.8 \%$ respectivamente (Green, Emery, Hishikawa, Warta y Dunlop, 2014).

Con base en esto, el propósito de este proyecto es encontrar una formulación para el depósito de materiales en desarrollo, como lo son el seleniuro de cadmio (CdSe) y el diseleniuro de tungsteno (WSe₂). Ambos se basan en el depósito por baño químico.

METODOLOGIA

El depósito de las películas se realiza sobre sustratos que se tratan previamente de la siguiente manera: primero se lavan con etanol y un algodón. Se enjuagan con agua destilada y a continuación se les da un baño ultrasónico por cinco minutos con acetona, y al término; otro baño ultrasónico por cinco minutos con agua destilada. Después se secan con una secadora.

La primera película depositada es una de sulfuro de cadmio (CdS), la cual ayuda al depósito del calcogenuro del metal en cuestión (CdSe, WSe₂). Este primer depósito se realiza con los siguientes reactivos: nitrato de cadmio (0.1M, 25mL), citrato de sodio (1M, 15mL), hidróxido de amonio (concentrado, 2mL), tiourea (1M, 5mL) y agua destilada (53mL). La preparación del baño químico es de la siguiente forma: en un vaso de precipitado de 100mL se adicionan los reactivos en el orden mencionado, agitando con un agitador de vidrio al adicionar cada reactivo. Al finalizar, no se presenta ningún color, se mantiene de incoloro. Después se acomodan los sustratos alrededor de las paredes del vaso de precipitado, de manera que mantengan una posición vertical, sin alguna inclinación. Se introducen a un baño a 80°C por 45 minutos. Se saca el vaso de precipitado, y cada sustrato se enjuaga con abundante agua, se retiran algunas partículas con un algodón de manera muy suave, y se seca con la secadora. La película de diseleniuro de tungsteno (WSe₂), se depositó sobre una película de sulfuro de cadmio previo para ayudar a la formación de centros de nucleación. Se usó la siguiente formulación (B-1): tungstato de sodio (0.5M, 5mL), ácido tartárico (1M, 2.5mL), trietanolamina (1M, 5mL), selenosulfito de sodio (0.2M, 10mL) y agua destilada (17.5 mL), a una temperatura de 80°C por 60 minutos. El depósito no mejoró con un tratamiento térmico previo a la película de sulfuro de cadmio. El tratamiento que se hizo consistió en recocer los sustratos a 300°C por 10 minutos. Los sustratos con los que finalmente creció de manera adecuada fue usando sustratos TCO (vidrio con recubrimiento transparente de SnO₂:F). Al momento de sacar las muestras de diseleniuro de tungsteno sólo se secó con la secadora, sin ningún enjuague ni limpieza con algodón.

Después, se modificó la formulación B-1, eliminando la trietanolamina, y manteniendo todos los reactivos en misma cantidad, concentración, orden a adición, temperatura y tiempo. Esta formulación se llamó B-2. Con esta formulación se utilizaron sustratos de vidrio y TCO, no observo alguna diferencia significativa en el depósito entre los dos sustratos. Se observa que el depósito sucede prácticamente al secar y es de coloración uniforme, con una película delgada. La forma en que se deposita depende en gran medida de la forma que se maneja el sustrato/TCO al retirarlo del baño, porque como se mantenga la película al momento de secarse es como se deposita.

Se realizó una modificación disminuyendo la temperatura a 60°C y el tiempo se aumentó a 120 minutos. Esta formulación se llamó B-3. El depósito sucede de igual forma, se deposita al secarse. Se aprecia que al bajar la temperatura el tiempo se puede prolongar, dando un mejor depósito. Además, con el contenido del baño que quedó, se aplicó una gota sobre un sustrato con un depósito previo de CdS. Este sustrato se colocó en una placa de calentamiento a 80°C y a los 4 minutos se secó formándose una capa muy delgada. Esto sugirió usar la solución del baño como tinta para la técnica Spin Coating sobre sustratos.

Por último, se volvió a modificar la cantidad de ácido tartárico a 3.5mL con la misma concentración de 1M. Todos los demás parámetros se mantuvieron constantes. Con esta formulación (B-4) al momento de agregar el selenosulfito de sodio, la reacción ocurre de manera rápida, por lo que se debe adicionar primero el agua y después el selenosulfito de sodio. El depósito se aprecia más consistente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las películas de diseleniuro de tungsteno se analizaron con espectroscopia RAMAN. Formulación B-1. El depósito presentó tres fases: una región plana sobre la cual se formaron pequeñas manchas y algunos aglomerados. Las tres fases presentan un modo a 250 cm⁻¹, que corresponde al diseleniuro de tungsteno (2D Semiconductors, 2017).

Formulación B-2. El depósito es uniforme, pero con algunos aglomerados. Presentó el modo a 250 cm^{-1} en las dos fases, tanto en la zona plana y en los aglomerados. En la zona plana el espectro es similar al de los aglomerados, pero con intensidad mucho menor.

Formulación B-3. De la formulación B-3 se tienen tres muestras. La primera corresponde al depósito por baño químico. En la figura 7 se aprecian las dos fases que presenta. El espectro de las dos zonas es muy parecido, con los mismos modos. Ambos presentan el de 250 cm^{-1} . La segunda muestra corresponde a la gota que se aplicó al sustrato. La zona plana es más delgada que la zona de los huecos, porque al hacer el análisis RAMAN, se quemó la zona plana con el láser. El modo a 250 cm^{-1} lo muestran las dos zonas. La tercera muestra corresponde al depósito con la técnica de Spin Coating. Esta muestra presentó tres zonas oscuras y una plana. En las cuatro zonas se muestra el modo a los 250 cm^{-1} , aunque en la zona plana es muy débil.

Formulación B-4. La formulación B-4 se trabajó con dos muestras, una del depósito por baño químico, y la segunda por Spin Coating. En el depósito por baño químico, los espectros de las dos zonas son similares, solo varían en intensidad. En la muestra de Spin Coating sólo la zona oscura presentó el modo a los 250 cm^{-1} .

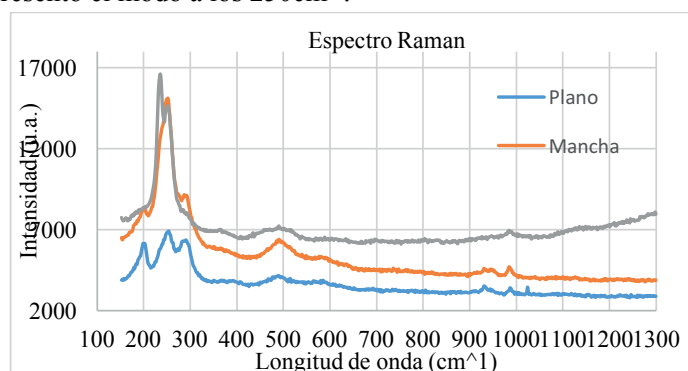


Figura 4. Espectro de la película obtenida de WSe_2 con la formulación B-1

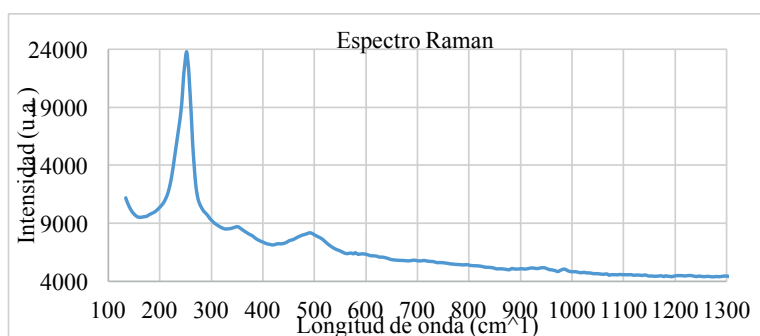


Figura 6. Espectro de la película obtenida de WSe_2 con la formulación B-2

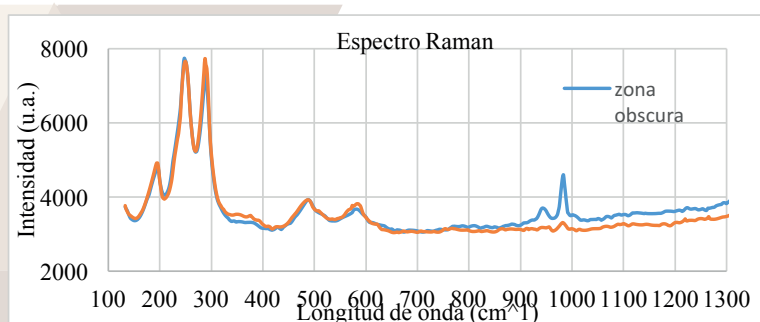


Figura 8. Espectro de la película obtenida por baño químico de WSe_2 con la formulación B-3.

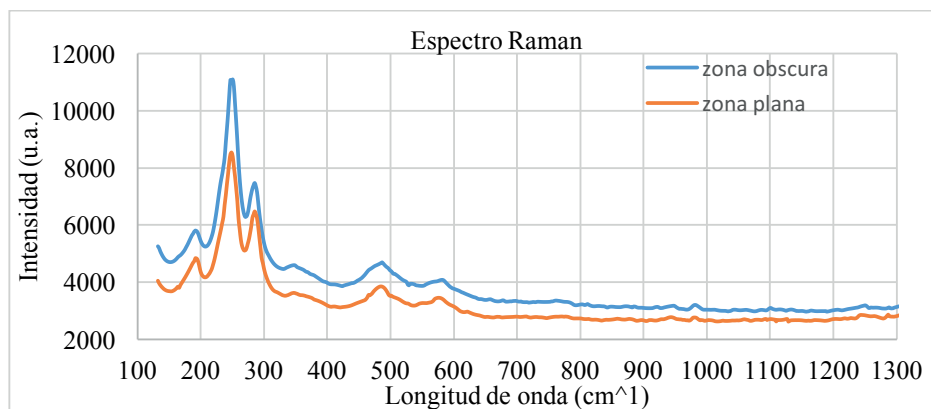


Figura 14. Espectro de la película de WSe_2 obtenida por depósito por baño químico con la formulación B-4.

CONCLUSIONES

Con el diseleniuro de tungsteno se partió de la formulación B-1 y se fueron encontrando mejores condiciones para el depósito por baño químico. El descartar la trietanolamina, bajar la temperatura y aumentar el tiempo, y aumentar la cantidad de ácido tartárico nos condujo a mejorar la película hasta llegar a la formulación B-4. El observar cómo es que se depositaba la película al momento de secarse, sugirió que se podría usar el contenido del baño químico como una tinta y se obtuvieron películas delgadas mediante la técnica de Spin Coating. Los análisis RAMAN comprueban que las películas contienen diseleniuro de tungsteno, por el modo a 250cm^{-1} , ya que los espectros lo presentan.

BIBLIOGRAFIA

Chopra K. L., Kainthla R. C., Pandya D. K., y Thakoor A. P. (1982). Physics of thin films. *Academic Press: New York*, 12(1982), 201.

Green A. M., Emery K., Hishikawa Y., Warta W., y Dunlop E. D. (2014). Solar Cell efficiency tables (versión 44). *Progress in photovoltaics: research and applications*. 22(2014), 701-710.

National Renewable Energy Laboratory. (2017). Photovoltaic Research. Golden Colorado, EU. Recuperado de <http://www.nrel.gov>

2D Semiconductors. (2017). Tungsten Diselenide (WSe_2). EU. Recuperado de <http://www.2dsemiconductors.com>

ESTUDIO FITOQUÍMICO Y EVALUACIÓN DEL EFECTO HIPOGLUCEMIANTE DEL EXTRACTO FLUIDO DE TRONADORA COMPUESTO REDSA®.

Hernández Zapata, S.¹; Juárez Flores, B.²; Portillo Gerónimo, E.³; Rendón Huerta, J. A.²; Regalado Rentería, E.².

¹Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Manuel Nava No. 6, C.P. 78260, San Luis Potosí, S.L.P., MÉXICO, sara.isabel-97@hotmail.com; ²Instituto de Investigación de Zonas Desérticas, Altair 200, Col del Llano, C.P. 78377, San Luis Potosí, S.L.P., MÉXICO, berthajf@uaslp.mx; ³Facultad de Enfermería, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Manuel Nava No. 6, C.P. 78260, San Luis Potosí, S.L.P., MÉXICO, eder.portillo33@gmail.com

RESUMEN

La diabetes mellitus es un desorden metabólico caracterizado por hiperglucemia crónica con perturbaciones metabólicas generalizadas. Aproximadamente 10% de la población mexicana padece diabetes, 90% de los casos son de tipo II. En México es la principal causa de mortandad. Existe una gran variedad de fármacos antidiabéticos en el mercado, pero su costo y disponibilidad limitan su uso por la población marginada del país. Además, los hipoglucemiantes de patente pueden provocar diversos efectos secundarios importantes. Por estas razones, es pertinente la investigación y evaluación de tratamientos alternativos sin dichos inconvenientes. El objetivo de este trabajo fue realizar un estudio fitoquímico preliminar y evaluar el efecto agudo del extracto fluido de tronadora compuesta (Laboratorio de Remedios Herbolarios REDSA®) mediante una curva de tolerancia a la glucosa en ratas sanas. En base en los resultados, se pudo constatar la presencia de azúcares reductores, flavonoides, taninos, coumarinas y lactonas sesquiterpénicas. El extracto de tronadora compuesto tiene propiedades hipoglucemiantes.

ABSTRACT

Diabetes mellitus is a metabolic disorder characterized by chronic hyperglycemia with generalized metabolic disturbances. Approximately 10% of the Mexican population suffers from diabetes, 90% of cases are type II. In Mexico, it is the main cause of death. A wide variety of antidiabetic drugs exist in the market, but their cost and availability limit their use by the marginalized population of the country. In addition, patent hypoglycemic agents can cause several side effects. For these reasons, research and evaluation of alternative treatments without such drawbacks is relevant. The objective of this work was to carry out a preliminary phytochemical study and to evaluate the acute effect of the fluid extract (REDSA® Herbal Remedies Laboratory) by means of a glucose tolerance curve in healthy rats. Based on the results, it was possible to verify the presence of reducing sugars, flavonoids, tannins, coumarins and sesquiterpene lactones. The extract has hypoglycemic properties.

Palabras clave: diabetes, tronadora, hipoglucemiante, medicina tradicional.

INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus (DM) es un síndrome orgánico, multisistémico y crónico que se caracteriza por el aumento de los niveles de glucosa en la sangre (hiperglucemia). En la DM tipo 1 (DM1) no hay síntesis de insulina. La diabetes de tipo 2 (DM2) tiene su origen en la incapacidad del cuerpo para utilizar eficazmente la insulina.

La diabetes es una de las grandes epidemias del siglo XXI. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que de 1995 a la fecha el número de personas que viven con diabetes se ha triplicado, la cifra actual llega a más de 347 millones de personas en el mundo. La DM2 es la más frecuente, representa el 90% de los casos mundiales y se debe en gran medida a un peso corporal excesivo y a la inactividad física.

Según la Federación Internacional de Diabetes, los países con mayor número de personas que padece la enfermedad son: China, India, Estados Unidos, Brasil, Rusia y México (en ese orden), es por eso que es importante luchar contra este padecimiento.

La Encuesta Nacional de Nutrición (2012), reveló que el 9.2 % de la población adulta padece diabetes, lo que se traduce en 6.4 millones de personas. Los estados con prevalencias más altas son: Distrito Federal, Nuevo León, Veracruz, Tamaulipas, Durango y San Luis Potosí. De las personas que viven con diabetes, el 15.8 % no cuenta con algún tipo de seguridad social.

Los tratamientos farmacológicos más utilizados son la sulfanilurea glimepirida que se usa junto con un programa de dieta y actividad física y, a veces, con otros medicamentos. La acción hipoglucemiante de la glimepirida se debe a la estimulación de las células de los islotes pancreáticos. Las sulfonilureas se unen a su receptor en la membrana plasmática de las células beta del páncreas, lo que produce un cierre del canal de potasio sensible a ATP, estimulando de este modo la liberación de insulina.

Otro fármaco frecuentemente utilizado es la metformina, una biguanidas que se utiliza sola o con otros medicamentos, incluyendo insulina. Aunque el mecanismo de acción de este fármaco no está claro, se cree que su principal efecto en la DM2 es la disminución de la gluconeogénesis y glucogenólisis hepática. Además, la metformina mejora la utilización de la glucosa en músculo esquelético y en tejido adiposo aumentando su transporte en la membrana celular. También se ha observado disminución de la absorción intestinal de la glucosa sólo en animales.

Otro fármaco es la acarbosa es un pseudotetrascárido de origen microbiano, se usa para tratar la DM2 ya que inhibe alfa-glucosidasas intestinales, retrasa de modo dosis dependiente la digestión de disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. Esta disminución en la digestión de los alimentos, ayuda a que el nivel de glucemia en la sangre no suba descontroladamente después de las comidas.

Desafortunadamente, el uso prolongado de estos hipoglucemiantes puede provocar distintos efectos adversos, por ejemplo, las sulfanilureas inducen hipoglucemia y aumento de peso corporal. Las biguanidas producen problemas gastrointestinales, acidosis láctica e insuficiencia renal y los inhibidores de las alfa-glucosidasas ocasionan trastornos gastrointestinales, fallas renales y cardiovasculares. Por esta razón es deseable buscar nuevas terapias antidiabéticas que restauren de manera eficiente los niveles de glucemia sin los efectos secundarios de los tratamientos actuales.

Una alternativa en el control de la diabetes es la medicina tradicional, presente en todas las culturas del mundo y se ha definido como un conjunto de todos los conocimientos y prácticas usadas en la prevención, diagnóstico y eliminación enfermedades confiado exclusivamente en experiencia práctica, observación, normalmente estos conocimientos y habilidades son transmitidos de generación a generación, en forma oral o escrita.

De acuerdo con la OMS (1979), planta medicinal es cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos. Entre las plantas medicinales del noreste de México, se ha encontrado algunas que son utilizadas como antidiabéticas, entre las más importantes está *Tecoma stans* (tronadora), cuenta con estudios en donde se ha demostrado su efecto hipoglucemiante, es originaria de México y tiene una distribución muy amplia, desde el sur de los Estados Unidos hasta Centroamérica. Frecuentemente es cultivada en Morelos, Guanajuato, Hidalgo y el Valle de México.

El laboratorio de remedios herbolarios Rosa Elena Dueñas, S.A de C.V. (REDSA®), la utiliza junto con otras plantas medicinales como base para la preparación de un extracto fluido compuesto que recomienda para el tratamiento de la diabetes. REDSA®, como parte de sus políticas responsables, nos ha pedido verificar el efecto atribuido al extracto, para lo cual diseñamos un proyecto de investigación que les permitiera tener un sustento científico. Así, el objetivo del presente trabajo fue realizar un estudio fitoquímico preliminar del extracto y evaluar el efecto hipoglucemiante del extracto fluido de tronadora compuesto (REDSA®) en ratas sanas y diabéticas, así como esclarecer su mecanismo de acción hipoglucemiante, sensibilizador de los receptores de insulina o antihiperoglucemiante. Para el Verano de la Ciencia, solo se trabajó en el estudio fitoquímico y el establecimiento del mecanismo de acción.

METODOLOGIA

Para la caracterización del extracto fluido de tronadora compuesto REDSA® se realizaron distintas pruebas fitoquímicas con la finalidad de identificar carbohidratos, flavonoides, saponinas, taninos, cumarinas, heterósidos cardiotónicos, lactonas sesquiterpénicas, alcaloides, heterósidos antaquinónicos y heterósidos cianogenéticos (Evans...).

Para esclarecer el mecanismo de acción, se utilizaron 30 ratas macho sanas de la cepa Wistar como unidades experimentales, las cuales se mantuvieron en cajas de acrílico individuales, en una habitación con condiciones controladas de temperatura y humedad (18–26 °C y 30%-70% de humedad relativa), revirtiendo su ciclo y adaptándolo a 12 h luz /12 h oscuridad, por un lapso de siete días, con consumo de agua purificada a libre acceso y de 20-30 g de alimento por día. Todos los animales se mantuvieron de acuerdo con las recomendaciones éticas de la Norma Oficial Mexicana de especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999).

Después del periodo de aclimatación de una semana, las unidades experimentales se dividieron de forma aleatoria en seis grupos de cinco animales cada uno para realizar las curvas de tolerancia a la glucosa. Para verificar el efecto hipoglucemiante agudo se realizó una curva de tolerancia a la glucosa; para ello se midió la glucosa basal, y se les administró una solución de glucosa (3 g/kg de peso corporal). Cinco min después, se administraron 0.8 mg/kg de peso de glimepirida, o 150 mg/kg de peso de metformina, o 10 µL/kg de peso del extracto, o agua. Se tomaron muestras de sangre 30, 60 y 120 min después.

El efecto antihiperoglucemiante agudo se midió con la concentración basal de glucosa; inmediatamente se administró carbosa (20 mg/kg de peso), o 10 µL/kg de peso del extracto o agua. Cinco min después del T0 se administró una solución de maltosa (3 g/kg de peso corporal). Se tomaron muestras de sangre 30, 60 y 120 min después y se midió la glucosa plasmática. Para la administración oral de los tratamientos se usó una cánula esofágica. El diseño experimental fue completamente aleatorio con mediciones repetidas en el tiempo ($p \leq 0.05$), se analizó con un análisis de varianza y una comparación múltiple de medias de Tukey (SAS).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se muestran las reacciones realizadas para el análisis fitoquímico del extracto compuesto de tronadora REDSA®, y los resultados obtenidos. En el extracto fluido se reconoció la presencia de azúcares reductores, flavonoides, taninos, cumarinas, heterósidos cardiotónicos (desoxiazúcares) y alcaloides. En estudios anteriores, se señala la presencia de alcaloides y flavonoides en la tronadora y su acción farmacológica hipoglucemiante es atribuida a los alcaloides, el efecto que genera es similar al producido por la glibenclamida a la dosis máxima de 500 mg/kg de un extracto de tronadora (Pérez *et al.*, 1984; Roig, 1988; Atlan, 1994; Suarez, 1996).

Tabla. 1. Estudio fitoquímico del extracto de tronadora compuesto REDSA®

Nombre de la prueba o reacción	Resultados y observaciones
Azúcares reductores	
Molish	Positivo (+) Anillo púrpura, presencia de carbohidratos
Fehling	Positivo (+) Precipitado rojo ladrillo, presencia de azúcares reductores
Flavonoides	
Reacción con NaOH 10%	Positivo (+) Coloración amarilla, presencia de flavonas y flavonoles
Reacción con KOH 10%	Positivo (+) Coloración amarilla, presencia de flavonas y flavonoles

Reacción con NH_4OH 10%	Positivo (+) Coloración naranja, presencia de flavonoles
Reacción con FeCl_3	Positivo (+) Coloración verde, presencia de heterósidos de flavonoides
Shinoda	Positivo (+) Coloración naranja, presencia de flavonas
Constantinescu	Negativo (-) No se observó una fluorescencia amarilla
Dimroth	Positivo (+) Coloración naranja, presencia de 5-hidroxi flavonas
Reacción con H_2SO_4	Positivo (+) Coloración naranja, presencia de flavononas
Prueba para Flavandiol-3,4	Positivo (+) Coloración castaño-amarillo, presencia de catequinas
Prueba para Antocianinas	Negativo (-) No se formó precipitado amarillo
Saponinas	
Prueba de la espuma	Negativo (-) para saponinas
Liebermann- Buchard	Negativo (-) Coloración amarilla
Rosenthaler	Negativo (-) No hubo cambio en la coloración
Rosenheim	Negativo (-) No hubo cambio en la coloración
Taninos	
Ensayo de la gelatina	Positivo (+) Precipitado color pajizo, presencia de taninos
Caracterización con sales férricas	Positivo (+) Coloración verde pardo, presencia de taninos condensados
Oxidación de taninos catéquicos	Positivo (+) Coloración rojiza por la formación de flobáfenos o rojos catéquicos
Ensayo de la catequina	Positivo (+) Coloración rosa-roja en la astilla
Ensayo del ácido clorogénico	Negativo (-) Coloración amarilla
Ensayo del ácido gálico	Negativo (-) Coloración amarilla
Cumarinas	
Reacción general	Positivo (+) Coloración amarilla
Heterósidos cardiotónicos	
Baljet	Positivo (+) Coloración roja-naranja, presencia de cardiotónicos
Raymond	Negativa (-) Coloración roja
Keller-Killiani	Positivo (+) Anillo de color azul, presencia de desoxiazucares
Keller-Killiani modificada	Positivo (+) Coloración verde, presencia de desoxiazucares
Keller-Killiani para digitoxosa	Positivo (+) Coloración roja y verde, presencia de desoxiazucares
Lactonas sesquiterpénicas	
Reacción de hidroximato férrico	Negativo (-) Coloración verde intenso
Alcaloides	
Meyer	Positivo (+) Formación de un precipitado
Wagner	Positivo (+) Formación de grumos
Hager	Positivo (+) Formación de grumos
Dragendorff	Positivo (+) Formación de precipitado
Sonnenchein	Positivo (+) Formación de grumos
Heterósidos antraquinónicos	
Reacción general con NH_4OH	Negativo (-) No hubo cambio en la coloración
Reacción general con H_2SO_4	Negativo (-) No hubo cambio en la coloración

Los cambios en la concentración de la glucosa plasmática de las ratas sanas de los seis tratamientos en los cinco tiempos se muestran en la Figura 1. Como se puede observar, en el tiempo cero todos los tratamientos fueron iguales ($p=0.1686$), en la evaluación del efecto hipoglucemiante del extracto en la curva de tolerancia a la glucosa, la entrada de glucosa se llevó a cabo en los primeros 30 min del experimento para después pasar a los órganos diana por acción de la insulina.

El extracto se comportó igual a los tres fármacos de referencia durante los primeros 60 min, y diferente al tratamiento control (agua), al final del experimento (120 min), el extracto mostró un efecto estadísticamente igual a la glimepirida y la metformina, por lo que podemos discernir que actúa sobre la liberación de insulina y la sensibilidad de sus receptores.

Con respecto a su efecto antihiper glucemaiante, las concentraciones plasmáticas de glucosa producto de la hidrólisis de maltosa y la subsecuente absorción de glucosa, cuando las unidades experimentales solo recibieron agua, la entrada de glucosa se produce en la primera hora del experimento, llegando a su pico de absorción aproximadamente a los 45 min, lo que concuerda con la literatura, para después pasar de la sangre a los órganos periféricos. Cuando se administra extracto y acarbosa vemos dos efectos: la reducción y el retardo en la absorción de glucosa, y al final del experimento se comporta igual que los otros fármacos de referencia.

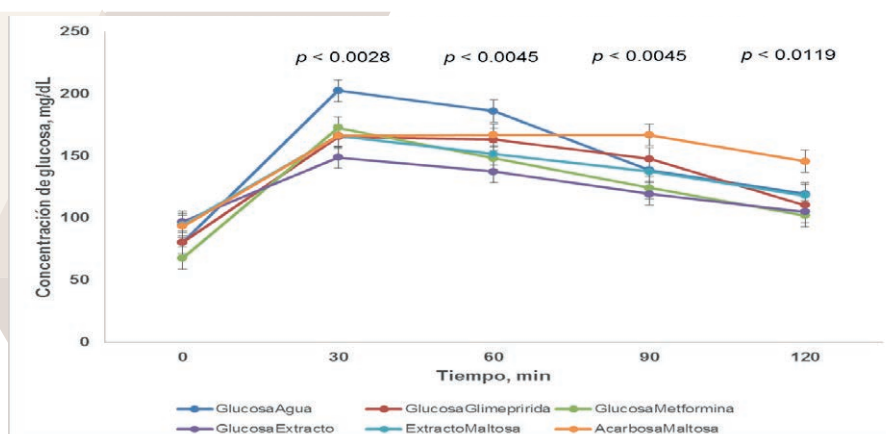


Figura 1. Curvas de glucosa con diferentes fuentes de carbohidratos.

CONCLUSIONES

El extracto fluido de tronadora compuesto REDSA[®] se compone en su mayoría de azúcares reductores, flavonoides (flavonas, flavonoles, flavononas y catequinas), taninos, cumarinas, heterósidos cardiotónicos (desoxiazucares) y alcaloides. El extracto fluido de tronadora compuesto REDSA[®] presenta actividad hipoglucemiante igual a los fármacos glimepirida y metformina. Este efecto puede deberse a que contiene compuestos fenólicos con actividad antioxidante comprobada. Para poder afirmar su uso como antidiabético, se continuará con el estudio del extracto fluido de tronadora compuesto REDSA[®] en un modelo animal de diabetes inducida con estreptozotocina. Es importante buscar nuevas terapias antidiabéticas que restauren de manera eficiente los niveles de glicemia sin los efectos secundarios de los tratamientos actuales, que sean de fácil acceso y bajo costo.

BIBLIOGRAFIA

TREASE GE, EVANS WC. Pharmacognosy. 12th ed. Baillier Tindall: ELBS Publications. 996; p. 344–539.

ALIA, TEJACAL, I., SOTO-HERNÁNDEZ, R. M., COLINAS, LEÓN, M. T. & MARTÍNEZ, DAMIÁN, M. T. (2005). Análisis preeliminar de carotenoides y compuestos fenólicos en frutos de zapote mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) H.E. Moore & Stearn). *Revista Chapingo Serie Horticultura*, julio-diciembre, 225-231.

BRAND WILLIAMS, W., CUVELIER, M.E. & Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *LebensmittelWissenschaft and Technologie*, 28, 25-30.

CHUQUIMIA F., ALVARADO J. A., PEÑARRIETA J. M., BERGENSTAHL B., & AKESSON B. (2008). Determinación de la capacidad antioxidante y la cuantificación de compuestos fenólicos y flavonoides de cuatro especies vegetales de la región andina de Bolivia. *REVISTA BOLIVIANA DE QUÍMICA*, 25(1), 75-83.

MANZOCO, L. ANESE, M., & NICOLE, M. C. (1998). Antioxidant properties of tea extracts as affected by processing. *Lebensmittel Wissenschaft and Technologie*, 3, 694-698

PONTING JD. (1960). Polyphenoloxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC Crit Rev Food Sci and Nutr*, 1, 49-127

REYES MUNGUÍA, A., AZÚARA NIETO, E., BERISTAIN, C. I., CRUZ SOSA, F. & VERNON CARTER, E.J. (2009) Propiedades antioxidantes del maguey morado (*Rhoeodiscolor*) antioxidant properties, *CyTA Journal of Food*, 7 (3), 209-216.

SINGLETON, V.L., ORTHOFER, R., & LAMUELA-RAVENTOS, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.

EVALUACIÓN DE LA FACTIBILIDAD TECNOLÓGICA DE ELABORADO PAPEL CON CELULOSA DE *OPUNTIA FICUS INDICA* Y SUS CARACTERÍSTICAS.

Aleydis Cervantes Dueñas¹ y Myrna Alicia Abraján Villaseñor²

RESUMEN

La presente investigación contempla la utilización de fibra de *Opuntia* spp. para la elaboración de papel. Se utilizó una mezcla de mucilago y fibra de nopal forrajero, los cuales se trataron con hidróxido de sodio y posteriormente con ácido nítrico para desechar toda materia innecesaria para la fabricación del papel. Se estudió su capacidad formadora de films evaluando la solubilidad, las propiedades mecánicas y las propiedades ópticas (color y brillo).

ABSTRACT

The present research contemplates the use of *Opuntia* spp. for the production of paper. A mixture of mucilage and forage nopal fiber were used, which were treated with sodium hydroxide and later with nitric acid to discard all material unnecessary for papermaking. Its film forming capacity was studied by evaluating the solubility, mechanical properties and optical properties (color and brightness).

Palabras Clave: Nopal, opuntia, papel, celulosa.

INTRODUCCIÓN

El nopal es un recurso que tiene un alto potencial agrotecnológico, tanto como cultivo alimenticio, como elemento base para productos derivados, que se utilizan en la industria alimenticia (humana y animal), la farmacología, la medicina, y la industria agropecuaria, por mencionar algunos (Aguilar et al., 2008). *Opuntia* spp., comúnmente llamado en México como nopal, es una planta que pertenece a las cactáceas, y por sus características, es apta para el desarrollo en zonas áridas y semiáridas. Presenta el metabolismo ácido crasuláceo (CAM) en donde las estomas captan el CO₂ que va a ser utilizado para la síntesis de carbohidratos durante la noche, permitiendo que la pérdida de agua sea menor debido a que ocurre en las horas más frescas del día.

La composición química del nopal en base húmeda es de 91% agua, 0.66% proteínas, 0.11% grasas, 5.5% de carbohidratos, 1.15% celulosa y 1.58% cenizas (Aguilar et al., 2008).

Crece en medios con temperaturas extremas, y presencia de lluvias erráticas, y se adapta a las variaciones en los niveles de CO₂ atmosférico. Además desempeña un papel importante en el ecosistema puesto que protege la fauna silvestre. Existen alrededor de 300 especies del género; cerca de 100 de ellas existen en México y de ellas, cerca de 40% se localiza en el desierto Chihuahuense (Méndez-Llorente et al., 2008).

El género *Opuntia* comprende plantas bien definidas, que en el caso del nopal pueden ser rastreros o frutescentes cuando son ramificados, o arborescentes cuando los cladodios viejos toman una forma cilíndrica. El género *Opuntia* presenta hojas convertidas en espinas lo cual es un rasgo común en las cactáceas; o bien carece de ellas; pero en brotes tiernos numerosas especies presentan hojas verdaderas de vida muy corta. Por lo general las espinas son de dos tipos; unas pequeñas agrupadas en gran número (gloquideos) que comúnmente se denominan ahuate, y las grandes que son, según algunos naturistas, hojas modificadas (Feungang et al., 2006). El nopal es una planta arbustiva con tronco leñoso y ramas que se forman por cladodios, estos últimos reciben el nombre de nopalitos, si son frescos, y de pencas si son adultos. La epidermis del nopal tiene dos capas, una de células verdes, llamada clorénquima y otra capa interna que está formada por un cilindro de células blancas conocida como parénquima, dentro de estos tejidos existen células mucilaginosas que almacenan mucilago (Granados- Sánchez y Castañeda-Pérez, 2003).

La celulosa es el componente fundamental de la pared de las células vegetales en plantas, madera y fibras naturales, y se encuentra combinada, generalmente, con sustancias como la lignina, hemicelulosas (carbohidratos más cortos principalmente pentosanos), pectinas y ácidos grasos.

La celulosa es un polímero lineal de cadena larga formado por moléculas de D-glucopiranosas. Se la considera como una de las materias primas más abundantes en la naturaleza (Medina-Morales, 2011). La celulosa tiene una gran variedad de aplicaciones en las industrias del papel, textil, alimenticia, de explosivos y de azúcares fermentables, entre otras, además de aplicaciones específicas en medicina y biotecnología.

La fabricación del papel tiene su origen en China, hacia el año 100 antes de Cristo. Como materia prima se utilizaban trapos, cáñamo, paja y hierba, que se golpeaban contra morteros de piedra para separar la fibra original. En este proyecto se utilizó como materia prima el nopal, separando la celulosa para la elaboración de papel filtro el cual se pretende utilizar como material de trabajo en laboratorios.

MÉTODOS Y MATERIALES

Para el desarrollo de esta investigación se utilizó nopal forrajero lavado y triturado, se separó por medio de filtración el mucilago, dejando el bagazo separado y almacenado en empaques de 2kg.

Extracción de Mucilago

Las cascarras de nopal se depositaron en una marmita para así poder lavarlas con agua purificada y agitándolas por una hora. Posteriormente se decantó todo el líquido depositándolo en una cubeta que se guardó en un refrigerador, se centrifugo y filtro para tu utilización.

Fibra

Se procedió a hacer una purificación alcalina-acida de la cascara lavada del nopal, primeramente se hizo la digestión alcalina con hidróxido de sodio (NaOH) al 3M en dos tratamientos, esto se hizo tres veces a 90° C, al tratamiento uno se dejó una hora y media y al segundo tratamiento una hora de digestión. Después de esta digestión se procedió a lavar la fibra con agua purificada y filtrarla, esto hasta obtener un pH cercano al neutro. Para la digestión acida se usó ácido nítrico (HNO₃) al 3N, con el cual se hizo solamente un digestión, de igual manera al tratamiento uno se dejó una hora y media y al segundo tratamiento una hora de digestión a 90° C, se lavó varias veces con agua destilada tratando de obtener un pH neutro, pero se dejó con el pH del 9no lavado, 5.1 para el tratamiento uno y 4.8 al tratamiento dos. La fibra obtenida se dejó secar 24hrs en el horno de secado. Se molió con la licuadora y se fotografiaron las fibras obtenidas. El tratamiento 1 (Figura 1) tenía partículas un poco más pequeñas y delgadas que el tratamiento 2 (figura 2).

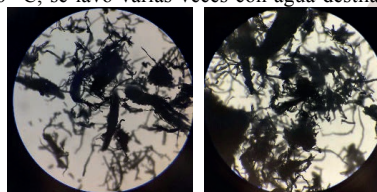


Figura 1. Tratamiento uno

Figura 2. Tratamiento dos

Placas de papel

Para la elaboración de las placas de papel se hicieron varias pruebas, la primera con fibra de nopal y agua destilada al 10%, se pusieron en las placas y se dejó secar durante 24hrs. Las placas no amalgamaron por lo que al tratarlas de sacar de la placa se convirtió en polvo. Se separó el polvo de las placas pero ahora se hizo una mezcla con mucilago al 10%. Esta mezcla se separó para hacer dos tratamientos, uno sometido a ultrasonido (Hielscher UP200S) por 20 minutos a una amplitud de 60% y ciclo de 0.5 y el otro dejándolo sin sonicar. Se elaboraron dos placas de 30gr y dos placas de 25gr con cada tratamiento y se dejaron secar durante dos días.

Se hizo otra mezcla de fibra y mucilago al 10% sometida a ultrasonido (Hielscher UP200S) por aproximadamente tres días a una amplitud de 30% y ciclo de 0.5. De esta mezcla se elaboraron diez placas de 30gr cada una y otras 10 placas de 40gr. Se dejaron secar por dos días.

Pruebas mecánicas

Se obtuvieron las placas de todos los tratamientos y se hicieron láminas de 2cm de ancho por 8cm de largo. Las pruebas mecánicas se llevaron a cabo solamente con las placas de 30gr y 40gr del tratamiento que se sometió a ultrasonido a una amplitud de 30% y ciclo de 0.5 por tres días.

Espesor

Con un micrómetro digital (Mitutoyo H-2780) se midió el espesor de todas las láminas. Como patrón se tomaron tres medidas de cada lámina, una al centro y las otras dos a los costados, lo más cercano a los bordes de las láminas.

Solubilidad

Se elaboraron en seis tubos cónicos de 50ml las muestras, se agregó 30ml de agua destilada y un pedazo de 2gr de la lámina a cada tubo (Figura 3) y se dejó 30 minutos en agitación suave con una temperatura de 40°C. Después se pusieron a centrifugación durante 15 minutos a 1500rpm.

Se tomó una alícuota del sobrenadante y se puso en un crisol de porcelana previamente secado y pesado a peso constante (120°C/4hrs). Se sacó el crisol de la estufa y se dejó enfriar en desecador para un posterior pesaje y así saber el porcentaje de solubilidad.



Figura 3 Muestras para la prueba de solubilidad

Hinchamiento

A seis láminas se hizo un corte para hacer un cuadrado de 2cm. Tres fueron de la muestra de 30gr y las otras tres de la muestra de 40gr. A cada una se le midió el espesor y el peso inicial. Cada muestra se colocó en un vaso de precipitado de 50ml (Figura 4) y se agregó 30ml de agua destilada, se dejó reposar durante 30min con una leve agitación. Después se procedió a decantar el agua tratando de no romper el papel. Se dejó secar a 120°C hasta que el agua evaporó. Se realizó otra medida de espesor y se pesó nuevamente el vaso para obtener el peso final.



Figura 4 Muestras para prueba de hinchamiento

Color

Se utilizó un Medidor de Colorimetría (CR-400) para evaluar el color de las láminas. Se tomaron 5 láminas de cada muestra (30gr y 40gr).

Tensión



Figura 5
Texturómetro con
pinzas de tensión

A 20 láminas se les midió el espesor y con un texturómetro (TA.XTplus) y utilizando las pinzas de tensión se colocaron cada una para hacer las pruebas respectivas (Figura 5) y en el software se introdujeron los parámetros para evaluar la fuerza, la distancia y el tiempo que cada lámina soportaba antes de la fractura.

RESULTADOS

Solubilidad

Tabla 1. Porcentaje de solubilidad de las láminas de papel de nopal

Muestra	Crisol	MH+C	MH	MS+C	MS	% solubilidad
1 (30gr)	8.209	15.0489	6.8394	8.238	0.0286	0.42%
2 (30gr)	7.37	14.2	6.8299	7.3984	0.0283	0.41%
3 (30gr)	8.213	15.0193	6.8065	8.2478	0.035	0.51%
4 (40gr)	7.72	14.6315	6.9116	7.745	0.0252	0.36%
5 (40gr)	6.774	13.6404	6.8665	6.7989	0.025	0.36%
6 (40gr)	7.68	14.574	6.8936	7.7137	0.0333	0.48%
7 (control)	10.13	15.9641	5.8327	13.1813	3.0499	52.20%

Donde
MS=Muestra seca
MH=Muestra húmeda

Para obtener el porcentaje de solubilidad se utilizó la fórmula

$$\%S = \frac{MS}{MH} (100)$$

Se hicieron seis muestras y una séptima que fue el control, el cual no contenía nada de muestra eso para ver si variaba el peso al introducirlo en el horno de secado. Como se puede ver en la Tabla 1, el porcentaje de solubilidad de las muestras de placas de 30gr es más alto (1.34%) que en las placas de 40gr donde el promedio fue 1.2%.

Hinchamiento

Tabla 2 Peso del vaso con solución para prueba de hinchamiento

Espesor inicial			
40gr		30gr	
A	0.267mm	D	0.258mm
B	0.255mm	E	0.253mm
C	0.267mm	F	0.244mm
Espesor final			
40gr		30gr	
A	0.275mm	D	0.248mm
B	0.250mm	E	0.248mm
C	0.255mm	F	0.239mm

Tabla 3 Espesor de láminas para prueba de hinchamiento

Peso vaso inicial			
40gr		30gr	
A	29.1947g	D	35.2259g
B	29.4703g	E	29.948g
C	30.425g	F	29.4312g
Peso vaso final			
40gr		30gr	
A	29.5299g	D	35.5127g
B	29.8017g	E	30.1854g
C	30.6991g	F	29.7040g

De las seis muestras evaluadas se calculó el espesor de cada lámina, tanto el inicial como el final, dando como resultado un pequeño aumento en espesor que nos da como resultado que el papel puede ser factible para su utilización como filtro. También se pesó el vaso de precipitado inicialmente con la muestra y el agua destilada y también después del proceso de secado. Se puede notar en las tablas 2 y 3 un pequeño aumento después de la prueba de hinchamiento tanto en el espesor como en el peso, lo que nos demuestra una buena absorción de agua y resistencia del papel, ya que al manejarlo para medir el espesor después del secado no se fracturó.

Color

Se obtuvieron las coordenadas del espacio del color del colorímetro (Tabla 4).

L*=luminosidad

a*= coordenadas rojo/verde (+a indica rojo, -a indica verde)

b*= coordenadas amarillo/azul (+b indica amarillo, -b indica azul)

Lo que nos muestra un color amarillo tenue en todas las láminas evaluadas.

Tensión

Tabla 5 Obtención datos del texturómetro (láminas 30gr)

Muestras	Fuerza (N)	Distancia (mm)
Papel nopal 30g 1	11,190	70,348
Papel nopal 30g 2	13,043	70,418
Papel nopal 30g 3	14,964	70,597
Papel nopal 30g 4	10,126	70,450
Papel nopal 30g 5	8,760	70,300
Papel nopal 30g 6	18,517	70,657
Papel nopal 30g 7	4,857	70,385
Papel nopal 30g 8	11,703	70,404
Papel nopal 30g 9	7,398	70,429
Papel nopal 30g 10	13,731	70,551

Tabla 4 Coordenadas del espacio del color

30gr	L	a	b
1	82.74	1.82	18.59
2	82.03	1.93	19.34
3	81.92	2.01	19.17
4	82.98	1.88	18.93
5	82.94	1.94	17.95
40gr			
1	81.1	1.78	16.13
2	81.72	1.54	16.03
3	82.07	1.54	16.73
4	81.4	1.66	16.83
5	82.28	1.5	16.13

Tabla 6 Obtención datos texturómetro (láminas 40gr)

Muestras	Fuerza(N)	Distancia(mm)
Papel nopal 40g 1	14,574	70,470
Papel nopal 40g 2	23,513	70,437
Papel nopal 40g 3	19,681	70,458
Papel nopal 40g 4	17,040	70,358
Papel nopal 40g 5	28,488	70,838
Papel nopal 40g 6	34,728	70,655
Papel nopal 40g 7	31,348	70,674
Papel nopal 40g 8	36,420	70,643
Papel nopal 40g 9	29,173	70,603
Papel nopal 40g 10	6,584	71,819

Podemos notar que en las muestras de 40gr (Tabla 6) se ocupó más fuerza para la fractura de las láminas de 30gr (Tabla 5). Lo que nos demuestra que es más factible realizar placas con mayor cantidad de muestra.

CONCLUSIONES

El variar el tiempo del tratamiento de las digestiones no influyó mucho en los resultados finales, lo único que cambió fue el tamaño de las partículas, en el tratamiento que se dejó más tiempo, las partículas fueron más pequeñas lo que se podría significar que al elaborar las placas de papel este podría quedar más uniforme.

De la cantidad de placas realizadas solo se formó el 70%. Las muestras que estuvieron expuestas a ultrasonido obtuvieron un resultado más satisfactorio que aquellas que solamente se pusieron en la placa sin ningún tratamiento. El tiempo y fuerza de fractura de las láminas fue mi corto, lo que significa que aún se tienen que cambiar algunos parámetros al momento de realizar las digestiones, ya sea disminuyendo el tiempo entre cada una de ellas o modificando las concentraciones de las soluciones para tener una mayor resistencia y que sean factibles para uso como papel filtro.

BIBLIOGRAFIA

AGUILAR, C. N.; RODRÍGUEZ, H. R.; SAUCEDO, P. S. Y JASSO, C. D. (2008). Fitoquímicos Sobresalientes del Semidesierto Mexicano: de la planta a los químicos naturales y a la biotecnología. Ed. Path Design. Saltillo, Coahuila, México. 579 p.

FEUGANG, J. M.; KONARSKI, P.; ZOU, D.; STINTZING, F. C. AND ZOU, C. (2006). "Nutritional and medicinal use of cactus pear (*Opuntia* spp.) cladodes and fruits". *Front. Biosci.* [pp 2574-2589].

GRANADOS-SÁNCHEZ, D. Y CASTAÑEDA-PÉREZ, A. D. 2003. El nopal. Historia, fisiología, genética e importancia frutícola. Editorial Trillas. México, D. F. 227 p.

MEDINA-MORALES, M.A. (2011) "Aprovechamiento de materiales lignocelulósicos para la producción de etanol como carburante". *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila, México.* [pp. 35-41]

MENDEZ-LLORENTE F.; RAMÍREZ-LOZANO, R. G.; AGUILERA-SOTO, J. I. AND ARECHIGA-FLORES, C. F. (2008). "Performance and nutrient digestion of lambs fed incremental levels of wild cactus (*Opuntia leucotrichia*)". In: Conference on International Research on Food Security, Natural Resource Management and Rural Development University of Hohenheim. October 2008, [pp.1-7].

IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS METAL RESISTENTES EN SUELOS CONTAMINADOS

Claudia Zelmira Jiménez Aguilar¹ y Juan Armando Flores De La Torre²

RESUMEN

Se analizaron cuatro muestras de suelo (identificadas como S42A, BR3A *C. Selloana*, BR26A *C. Selloana* y BR10A *C. Selloana*) provenientes de la antigua mina de Zacatecas “El Bote” con el objetivo de aislar bacterias presentes en el jales mineros contaminados con metales, además de someterlos a concentraciones de arsénico en medio de cultivo de 250 ppm y 500 ppm. Las bacterias fueron identificadas, inicialmente de acuerdo a su morfología y por medio de la tinción de Gram, encontrando mayoritariamente bacilos gram positivos, presentando crecimiento y resistencia al arsénico, mostrando así características de adaptación.

ABSTRACT

Four soil samples were analyzed (identified as S42A, BR3A *C. Selloana*, BR26A *C. Selloana* y BR10A *C. Selloana*) from the old Zacatecas mine “El Bote” with the purpose of isolate bacteria present in metal contaminated mine shafts, in addition to submit them to arsenic levels of 250 ppm and 500 ppm in culture media. The bacteria were identified, initially according to their morphology and by Gram staining, mainly finding gram positive bacilli, presenting growth and resistance to arsenic, showing adaptation characteristics.

Palabras Clave: bacteria, adaptación, crecimiento, resistencia, contaminación.

INTRODUCCIÓN

La minería ha sido la actividad económica más importante en Zacatecas desde la época de la Colonia, por lo que sus efectos tanto positivos como negativos han sido parte de la vida cotidiana en el estado. Esta actividad ha resultado polémica en cuanto la utilización de métodos y creación de residuos contaminantes para el ambiente, tanto a corto como a largo plazo. Sin embargo, existen microorganismos que logran adaptarse con el tiempo a ciertos niveles de contaminación y toxicidad gracias a mecanismos y características celulares que les permiten sobrevivir (Rodríguez-Sánchez et al., 2017). El objetivo del presente fue el identificar las bacterias que se presentan en el suelo de la antigua mina “El Bote”, las cuales han logrado adaptarse y tolerar las condiciones de contaminación, así como el observar su crecimiento y resistencia en el laboratorio cuando se encuentran expuestas a ciertos niveles de elementos presentes en la minería, en este caso, al metaloide arsénico.

MARCO TEÓRICO

Dada la geología del territorio zacatecano, dentro de las sierras se presentan ricos yacimientos de metales y minerales, principalmente de plata, oro, cobre, plomo y zinc. Esto permitió la creación de diversos distritos mineros en el estado, sobre todo en los municipios de Zacatecas, Sombrerete, Vetagrande, Fresnillo, Concepción del Oro y Chalchihuites. Dentro de la capital del estado existió la mina subterránea “El Bote” (donde se recolectaron las muestras de suelo con las bacterias analizadas en este trabajo), de donde se extraían por flotación selectiva plomo y zinc, así como plata, cobre y oro en menor proporción. Los procesos de esta actividad pueden resultar abrasivos y dejar residuos contaminantes por lo que, muchos ambientes contaminados por metales son atribuidos como consecuencia de varios siglos de actividad minera ininterrumpida (Rodríguez-Sánchez et al., 2017).

El arsénico se encuentra generalmente presente con otros minerales como sulfuros de cobre (Bazán et al., 2015). lo que conlleva a procesos de eliminación tales como la flotación selectiva. Es un elemento presente de manera natural en el ambiente principalmente en la corteza en cantidades mínimas, el cual, en ocasiones puede resultar contaminante y tóxico dependiendo la condición en la que se encuentre o haya sido generado. Este es el caso de las emisiones de arsénico producto de la fundición, refinación y separación, siendo la mayor fuente de contaminación por arsénico en la industria minera y metalúrgica (Matschullat, 2000). Los microorganismos tienen un rol importante en el ciclo biogeoquímico del arsénico, siendo los principales responsables de la biotransformación y movilización de éste en el ambiente (Morgante y González, 2013). Sin embargo, algunos metales como plata, arsénico, cromo, cadmio, mercurio y plomo en pequeñas concentraciones (ppb o ppm) puede resultar inofensivos en muchos organismos (Rodríguez-Sánchez et al., 2017), llegando a formar parte de su fisiología.

Algunos de los microorganismos que se pueden encontrar en suelos son las bacterias, las cuales pueden ser identificadas morfológicamente de acuerdo a Vargas y Kuno (2014) en bacilos, cocos y espirilos. Los bacilos pueden ser cilíndricos, en forma de bastón, largos y delgados, pequeños y gruesos, presentando variaciones según la tendencia que tengan para mantenerse unidas formando diplobacilos (pares) o estreptobacilos (cuatro o más bacilos).

Las bacterias caracterizadas como cocos presentan formas casi esféricas y homogéneas, con la capacidad de formar agrupaciones conocidas como diplococos (pares), tétradas (disposición cuadrada), sarcinas (disposición cúbica), estreptococos (secuencia de cuatro o más) y estafilococos (irregular de cuatro o más). Por último, los espirilos son aquellas que presentan una o más curvaturas incluso forma de hélice, donde podemos encontrar subgrupos de vibrones (forma de coma), espirilos (forma helicoidal) y espiroquetas (helicoidal flexible).

Las bacterias pueden ser observadas a través de un microscopio óptico o electrónico con una adecuada tinción dado que son incoloras, sin embargo, también pueden ser vistas sin tinción siendo colocadas en soluciones no acuosas para aumentar el índice de refracción (Vargas y Kuno, 2014). Existen varias técnicas de tinción para la identificación bacteriana, una de las cuales es la tinción gram que, de acuerdo a López et al. (2014), ésta da a conocer de manera rápida las características principales de los microorganismos dado a que es una tinción diferencial, ya que utiliza dos colorantes y clasifica a las bacterias en dos grandes grupos (gram positivas y gram negativas) de acuerdo a las características de la pared celular de la bacteria. La pared de las gram positivas es gruesa y sin membrana celular, la cual retiene el colorante primario de la tinción, mostrándose como morado-azuldo; en cambio, las gram negativas están constituidas por una pared celular delgada y una membrana celular externa, perdiendo éstas el color primario y tomando el color de contraste, observándose de color rojo.

MÉTODOS Y MATERIALES

Inicialmente se elaboraron dos medios de cultivo diferentes (agar de eosina y agar nutritivo) en cajas Petri para las bacterias de las muestras de suelo aún sin aislar. Las muestras de suelo analizadas fueron cuatro, definidas como S42A, BR3A *C. Selloana*, BR26A *C. Selloana* y BR10A *C. Selloana*. Se pesaron 5 gr. de cada suelo y se aforaron a 50 ml. con agua destilada en tubos de ensayo individuales, dejándose en agitación constante por 24 horas ininterrumpidas. Después de dicho proceso, se pasó a medir el pH de las muestras terminando el proceso de agitación y al día anterior, para así obtener un promedio del pH en el que se da la presencia de las bacterias que serán después identificadas. Este proceso se realizó primero pasando las muestras por 10 minutos de centrifugado a velocidad 250 y después la medición con un potenciómetro, utilizando soluciones buffer con pH 4 y 7 anterior a la medición de las muestras.

Tabla 1. pH de muestras de suelo

	S42A	BR3A	BR26A	BR10A
Después de agitación por 24 hrs.	6.18	6.29	6.04	6.62
Día anterior	7.16	7.28	7.10	7.52
Promedio	6.67	6.79	6.57	7.07

A continuación, se realizó el cultivo en ocho cajas de agar eosina y azul de metileno, agregando 100 µL de cada muestra por duplicado. Se incubaron a una temperatura de 37°C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo y observado el crecimiento de las muestras se pasó a aislar únicamente las bacterias en cajas Petri del mismo medio de cultivo y se dejaron reposar en la estufa a las mismas condiciones durante el mismo tiempo. Se realizó el mismo procedimiento de cultivo para las muestras de suelo en agar nutritivo. Se obtuvieron un total de 35 bacterias aisladas, 19 de ellas en agar eosina y azul de metileno y 16 en agar nutritivo simple.

La identificación de las bacterias de las cuatro muestras de suelo, se realizó por medio de la tinción de Gram y observación en el microscopio de las muestras finales aisladas en ambos medios de cultivo. Inicialmente, cada bacteria se colocó en laminillas de vidrio y se fijaron para proceder a la tinción; este proceso se realizó con un kit de tinción, en el cual se colocaron las placas en una gradilla, se cubrieron con colorante violeta de genciana durante 1 minuto, se escurrieron y cubrieron ahora con yodo gram durante otro minuto, las placas se lavaron por 30 segundos con una solución de acetona-alcohol y fueron enjuagadas con agua de la llave hasta remover el exceso para finalmente ser cubiertas con safranina durante 1 minuto y enjuagadas con agua hasta que las muestras se encontraron secas.

La parte final consistió en el aislamiento de las bacterias en agar de eosina y azul de metileno ahora con la presencia de arsénico a 250 ppm y 500 ppm. Se prepararon 500 ml. de medio para As a 250ppm (12.5 ml. de As) y 500 ml. para As 500 ppm (25 ml. de As), los cuales fueron integrados al agar después de ser este esterilizado y enfriado, dado la volatilidad del metaloide. Basándonos en las 19 bacterias aisladas del inicio del trabajo, en total se obtuvieron 38 muestras (19 para As 250 ppm y 19 para As 500 ppm), las cuales se incubaron a 37°C durante 24 a 48 hrs, para observar crecimiento en dichas condiciones.

RESULTADOS

La observación de la tinción de Gram, dio como resultados los observados en la Tabla 2 y 3, que nos indica que en su mayoría se encontraron bacilos Gram positivos.

Tabla 2. Bacterias en agar de eosina y azul de metileno

Muestra	Tinción	Bacteria	Muestra	Tinción	Bacteria
---------	---------	----------	---------	---------	----------

S42A-3	Gram -	Bacilos	BR26A-2	Gram +	Diplobacilos
S42A-1	Gram +	Estreptococos	BR10A-5	Gram +	Bacilos
S42A-2	Gram +	Bacilos	BR10A-2B	Gram +	Diplobacilos
BR3A-2	Gram -	Bacilos	BR10A-4B	Gram +	Bacilos
BR3A-3	Gram +	Bacilos	BR10A-3	Gram -	Estreptococos
BR3A-1	Gram +	Bacilos	BR10A-4A	Gram +	Bacilos
BR26A-5	Gram +	Bacilos	BR10A-1B	Gram +	Diplobacilos
BR26A-1	Gram +	Bacilos	BR10A-1A	Gram +	Bacilos
BR26A-4	Gram +	Bacilos	BR10A-2A	Gram +	Bacilos
BR26A-3	Gram +	Bacilos			

Tabla 3. Bacterias en agar nutritivo

Muestra	Tinción	Bacteria	Muestra	Tinción	Bacteria
S42A-C	Gram +	Bacilos	BR3A-A	Gram +	Bacilos
S42A-D	Gram +	Bacilos	BR26A-B	Gram +	Bacilos
S42A-B	Gram -	Estreptococos	BR26A-C	Gram +	Diplobacilos
S42A-A	Gram +	Bacilos	BR26A-A	Gram +	Diplobacilos
S42A-E	Gram +	Bacilos	BR10A-C	Gram -	Estreptococos
BR3A-D	Gram +	Bacilos	BR10A-B	Gram +	Bacilos
BR3A-B	Gram +	Bacilos	BR10A-D	Gram +	Estreptobacilos
BR3A-C	Gram +	Bacilos	BR10A-A	Gram -	Bacilos

En cuanto al crecimiento de las bacterias en un medio con arsénico, después de los 24 a 48 hrs, el crecimiento se manifestó en menor cantidad en As 500ppm que con As 250ppm (Figura 1, Figura 2), pero ambos casos en todas las muestras se mostraron con menor crecimiento a comparación de las bacterias que se aislaron en medio sin presencia del metaloide.



Figura 1. Crecimiento muestra S42A-1 con As 250 ppm



Figura 2. Crecimiento muestra BR10A-4A con As 500 ppm

CONCLUSIONES

En todas las muestras de suelo se identificaron bacterias, las cuales, de un total de 35, 22 fueron identificadas como bacilos gram positivos. De acuerdo a los promedios de pH tomados anterior al aislamiento, se podría concluir que las bacterias habitan en un medio neutro, sin embargo, dos muestras bacterianas (S42A-1 y BR3A-1) presentaron capacidad para acidificar el medio. Las bacterias aisladas en medio contaminado con As tanto a 250 ppm y 500 ppm presentaron crecimiento, lo que indica una posible resistencia al arsénico. Dicha resistencia forma parte de las características de adaptación que muchos organismos crean con el fin de la supervivencia en ambientes modificados. Estos microorganismos resistentes pueden ser estudiados a mayor profundidad, identificados molecularmente y posiblemente coadyuvar en procesos de remediación de suelos contaminados por metales.

BIBLIOGRAFÍA

- BAZÁN, V., OROZCO, I., BRANDALEZE, E. & RUARTE, P. (2015). "Eliminación de arsénico de concentrados de cobre" en *Asociación Argentina de Materiales*, 3, pp. 4-10. Consultada en http://www.materiales-sam.org.ar/sitio/revista/2015_3/V_Bazan.pdf (fecha de consulta 03-08-2017).
- LÓPEZ-JÁCOME, L. et al. (2014). "Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología" en *Medigraphic*, 1(3), pp. 10-18. Consultada en <http://www.medigraphic.com/pdfs/invidis/ir-2014/ir141b.pdf> (fecha de consulta 09-08-2017).
- MARRERO-COTO, J., DÍAZ-VALDIVIA, A. & COTO-PÉREZ, O. (2010). "Mecanismos moleculares de resistencia a metales pesados y sus aplicaciones en la biorremediación" en *CENIC Ciencias Biológicas*, 41, pp. 67-78. Consultada en <http://www.redalyc.org/pdf/1812/181221644010.pdf> (fecha de consulta 31-07-2017).
- MATSCHULLAT, J. (2000). "Arsenic in the geosphere – a review" en *The Science of the Total Environment*, 249, pp. 297-312. Consultada en <http://www.sci.muni.cz/~sulovsky/IC2002/Lectures/Arsenic%20in%20the%20geosphere.pdf> (fecha de consulta 03-08-2017).

MORGANTE, V. & GONZÁLEZ-PASTOR, J. (2013). "Identificación de nuevos mecanismo moleculares de resistencia a arsénico en microorganismos adaptados a ambientes acuáticos altamente contaminados con metales pesados" en *Seguridad y medio ambiente*, 129, pp. 44-53. Consultada en https://www.fundacionmapfre.org/documentacion/publico/es/catalogo_imagenes/grupo.cmd?path=1073463 (fecha de consulta 31-07-2017).

RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, V. et al. (2017). "Biosorption of lead phosphates by lead-tolerant bacteria as a mechanism for lead immobilization" en *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33, agosto, [pp. 150-161].

VARGAS-FLORES, T. & KUNO-VARGAS, A. (2014). "Morfología bacteriana" en *Revista de Actualización Clínica*, 49(2), pp. 2594-2598. Consultada en http://metabase.uaem.mx/bitstream/handle/123456789/1466/280_2.pdf?sequence=1 (fecha de consulta 03-08-2017).

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE REMOCIÓN DE DICLOFENACO Y NAPROXENO, SOLOS O EN MEZCLA UTILIZANDO PLANTAS

Gamez Villela Sandra Nayeli¹ y Alfaro de la Torre Ma. Catalina²

RESUMEN

La remoción de fármacos requiere ser considerado en los procesos convencionales de tratamiento de aguas residuales. En estos procesos el uso de plantas como *Cyperus papyrus* es una buena alternativa porque se considera que usan la sustancia orgánica como fuente de carbono como nutriente.

En este proyecto se estudió específicamente la remoción de naproxeno y diclofenaco solos o en mezcla; como resultados se logró la adaptación de *Cyperus papyrus* en condiciones de vivero en un sustrato volcánico, así mismo se comprobó para la remoción un máximo de 99 % para naproxeno, un 98% para diclofenaco y en mezcla se obtuvo una remoción de 25% para diclofenaco y 99 % para naproxeno.

ABSTRACT

The removal of pharmaceuticals should be considered in the current treatment systems to treat wastewaters. In these process, the use of plants like *Cyperus papyrus* is a good alternative because is considered that use the organic substance as a source of carbon as a nutrient.

This project will study specifically the removal of naproxen and diclofenac alone or in mixture; from our results, *Cyperus papyrus* has been successfully adapted in a volcanic substrate in nursery conditions. We have also found that a maximum removal of 99 % for naproxen, 98% for diclofenac; for this last one only 25% was removed from the pharmaceutical mixture.

Palabras Clave: Remoción, Macrofitas, Fármacos.

ANTECEDENTES

Los contaminantes emergentes son compuestos de distinto origen y naturaleza química cuya presencia en el medio ambiente, han pasado en gran parte inadvertidas. Son compuestos de los cuales se sabe relativamente poco acerca de su presencia e impacto en los distintos compartimentos ambientales y que por tanto, precisan investigación. De todos los contaminantes emergentes, los que probablemente suscitan mayor preocupación y estudio en los últimos años son los fármacos en el medio ambiente acuático. En general, los productos farmacéuticos son ampliamente usados para diferentes propósitos, y los residuos de estos son colectados y llevados como afluentes a las plantas de tratamiento de aguas residuales, esto en el mejor de los casos. La presencia de fármacos en el medio receptor es preocupante debido a su naturaleza bioactiva y que aún en concentraciones muy bajas pueden afectar negativamente a los organismos incluyendo la vida silvestre y los seres humanos (Barceló y col. 2008). En México se tiran aproximadamente 10% de residuos de medicamentos al ambiente de los cuales se han encontrado en mayores concentraciones naproxeno 54 ng/mL, bupropión y diclofenaco en concentraciones de 1.5 ng/mL (Peña y col, 2015). Así, para su eliminación es posible utilizar los tratamientos basados en la fitorremediación mediante humedales, en donde los fármacos se pueden remover mediante diversos procesos físicos y químicos. Estos procesos se consideran terciarios en las plantas de tratamiento de aguas residuales, por lo que se aplican después de haber eliminado a las aguas residuales partículas, materia orgánica y otros contaminantes. Hasta la fecha, el énfasis de la tecnología de los humedales construidos se ha dado a plantas como *Cyperus papyrus*, *Phragmites*, *Typha* y *Schoenoplectus*. Estas son especies de crecimiento rápido que tienen menor contenido de lignina y son adaptables a profundidades de agua variables. Para este caso se seleccionó *Cyperus papyrus* (papiro) ya que es una de las macrófitas emergentes más prolíficas en los humedales subtropicales y tropicales africanos. Los estudios botánicos han demostrado que los soportes del papiro son capaces de acumular grandes cantidades de nutrientes y tienen una alta biomasa en pie, la capacidad de *C. papyrus* para utilizar los nutrientes de las aguas residuales y la incorporación de metales pesados y orgánicos en su fitomasa, sumada a su facilidad de manejo mediante cosecha regular, la convierten en una de las plantas más adecuadas para la fitorremediación de aguas residuales en áreas tropicales por lo tanto, continúa siendo un candidato excelente para la aplicación en el tratamiento de las aguas residuales.

OBJETIVO

Evaluar la remoción de diclofenaco y naproxeno, utilizando la planta *Cyperus papyrus* con el fin de considerar su uso en el tratamiento de aguas residuales.

Objetivos específicos

- Adaptación de *Cyperus papyrus* en condiciones de vivero usando como sustrato tezontle.
- Evaluar la cinética de remoción de naproxeno y diclofenaco solos o en mezcla.

METODOLOGIA

Se obtuvieron plantas de *Cyperus papyrus* del vivero de la FCQ, UASLP. Posterior a la recolecta se le hizo un tratamiento de lavado tratando de separarlas de manera individual, después se mantuvieron con nutrientes

¹ Universidad Autónoma de Zacatecas, Campus UAZ siglo XXI, Km 6 Carretera Zacatecas-Guadalajara s/n, ejido la escondida, C.P. 98160, Zacatecas, Zac. jcv9693@hotmail.com

² Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Dr. Manuel Nava 6, Zona Universitaria, C. P. 78210, San Luis Potosí, S.L.P., México, alfaroca@uaslp.mx.

(15N:30P:15K) y en soporte de piedra tezontle previamente lavado con hipoclorito de sodio y agua. Todo esto para favorecer el crecimiento de nuevos brotes, el objetivo de adaptar las plantas es generarles el menor estrés posible por el cambio de hábitat. Se seleccionaron plantas de cierta altura para la experimentación, las cuales se identificaron con un código, se les midió su altura y tamaño de raíz. Posteriormente estas fueron expuestas a soluciones de concentración conocida del fármaco (3 plantas / solución). Se procedió a colocarlas cada una en matraz Erlenmeyer ya forrados con aluminio para evitar el contacto con la luz, cada matraz contenía agua y fármaco a diferentes concentraciones.

Después se prepararon soluciones, comenzando con la preparación farmacéutica de naproxeno y diclofenaco a una concentración de 250 mg/L. De esta solución, se prepararon soluciones de diferentes concentraciones para evaluar la cinética de remoción del fármaco. Para naproxeno se prepararon soluciones de 5, 8, 10, 12, y 15 mg/L. De cada solución se tomaron, 300 µL de muestra, 50 µL de buffer de fosfatos (0.01 M, pH 2.5) 250 µL de azul de bromotímol, 560 µL metanol absoluto y 840 µL de agua completando un volumen final de 2 ml para determinar la concentración de naproxeno mediante espectrofotómetro UV a una longitud de onda de 206 nm. Este mismo método se utilizó para la realización de la curva de calibración a concentraciones de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 y 40 ppm. Para Diclofenaco se prepararon soluciones de 3, 5 y 10 ppm. Para su determinación se tomaron 200 µL de la muestra, 80 µL de cloruro férrico (0.03M), 80 µL de hexaciano ferrato de potasio III (0.001M) y 640 µL de agua para completar un volumen de 1 mL. De igual manera se hace uso de espectrofotómetro UV a una longitud de onda 710 nm, para la curva de calibración se realiza el mismo método pero con concentraciones de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, y 10 ppm. Posteriormente al tener los fármacos de manera individual se pasó a la preparación de la mezcla de naproxeno/diclofenaco con una concentración de 5:5 (mg/L) y para su análisis se realizó el mismo método para cada fármaco.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta sección se discutirán los resultados obtenidos. La Figura 1 muestra un aspecto de las plantas de *Cyperus papyrus* en condiciones de vivero, se puede observar como hay un crecimiento y desarrollo de nuevos brotes, lo cual me asegura que su adaptación en tezontle es favorable.



Figura 1. *Cyperus papyrus* adaptado a tezontle

La Figura 2 y la Tabla 1 muestran las concentraciones determinadas de naproxeno en función del tiempo de experimentación así como el total de fármaco removido en 10 días. La remoción de naproxeno es conforme a lo reportado por Cervantes (2015), quien reporta una eficiencia de remoción de 84% con *Cyperus papyrus* a una concentración de 2.7 mg/L en humedales construidos.

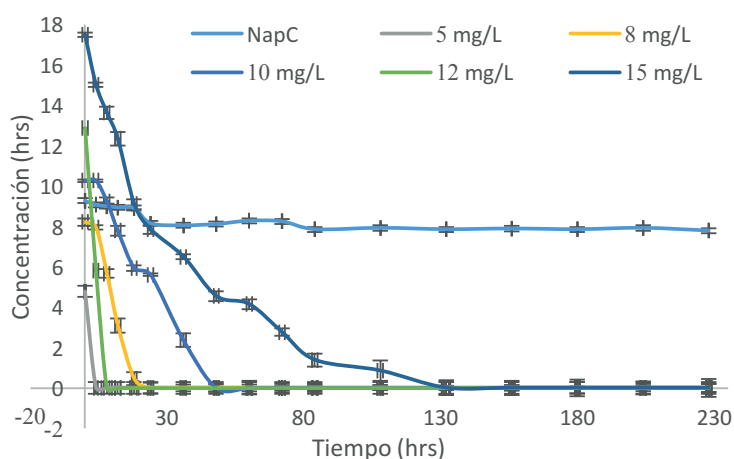


Figura 2. Comportamiento de las concentraciones de naproxeno

Tabla. 1. Porcentaje de remoción para naproxeno

Concentración	% Remoción
5 mg/L	99
8 mg/L	99
10 mg/L	99
12 mg/L	99
15 mg/L	99

Las figuras 3 y 4 ponen en evidencia el efecto que tuvo naproxeno sobre las plantas, su altura no se incrementa situación que prevalece en las altas concentraciones; para la raíz de la planta se puede observar como en la mayoría de las concentraciones ha favorecido su crecimiento.

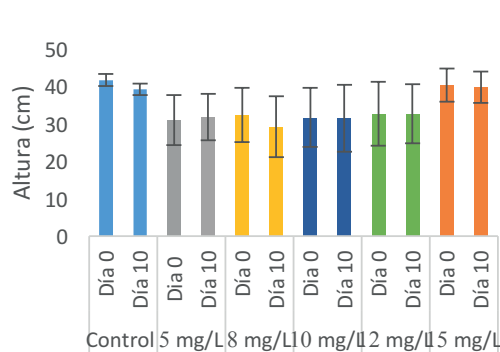


Figura 3. Efecto de naproxeno en altura de la planta durante la experimentación.

La figura 5 y Tabla 2 muestran el comportamiento de las diferentes concentraciones empleadas para la cinética de remoción de diclofenaco. Se pueden observar los porcentajes de remoción para las concentraciones 3, 5 y 10 mg/L siendo para 5 mg/L un mayor porcentaje de remoción, esto puede deberse a que el tamaño de raíz que presentaban las plantas elegidas para la experimentación era más abundante comparada con las plantas utilizadas en las otras concentraciones.

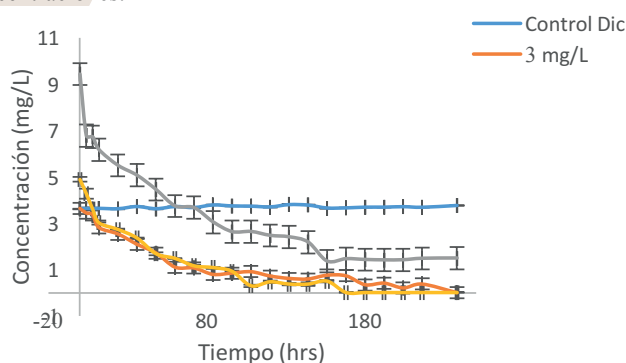


Figura 5. Comportamiento de las concentraciones de diclofenaco

Las figuras 6 y 7 ponen en evidencia el efecto que tuvo diclofenaco sobre la altura y la raíz de las plantas. Se observa como su altura incrementa situación que prevalece en las altas concentraciones; para la raíz de la planta se puede observar como en la mayoría de las concentraciones decrece.

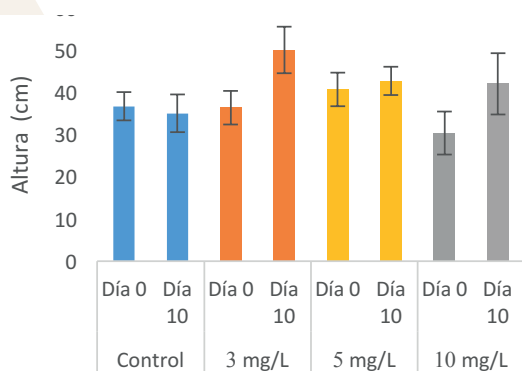


Figura 6. Efecto de diclofenaco en altura de la planta durante la experimentación

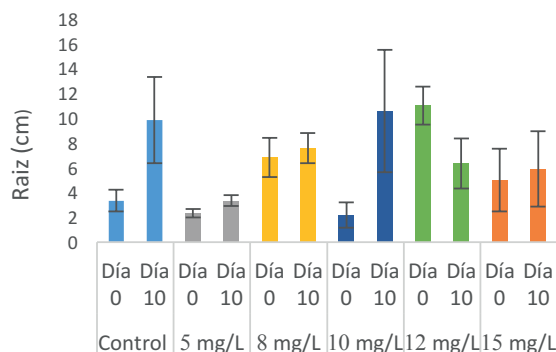


Figura 4. Efecto de naproxeno en raíz de la planta durante la experimentación.

Tabla. 2. Resultados de remoción para diclofenaco

Concentración	% Remoción
3 mg/L	88
5 mg/L	98
10 mg/L	84

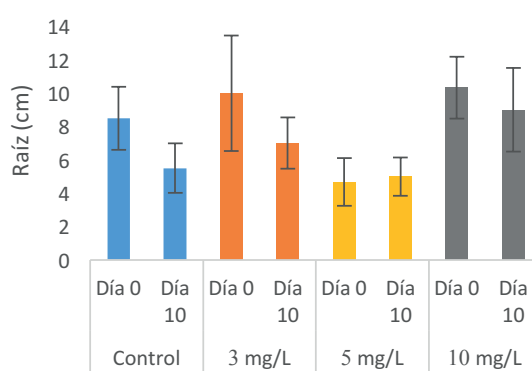


Figura 7. Efecto de diclofenaco en raíz de la planta durante la experimentación

En la figura 8 y Tabla 3 se observa que hubo una eficiente remoción de naproxeno en contraste a la que se observó para diclofenaco. La máxima eficiencia de remoción fue a las 50 horas de exposición de la planta al fármaco, a diferencia de diclofenaco que no presenta una disminución en la concentración durante la cinética. De esta manera la remoción de naproxeno fue de 99% mientras que para diclofenaco fue de 25%.

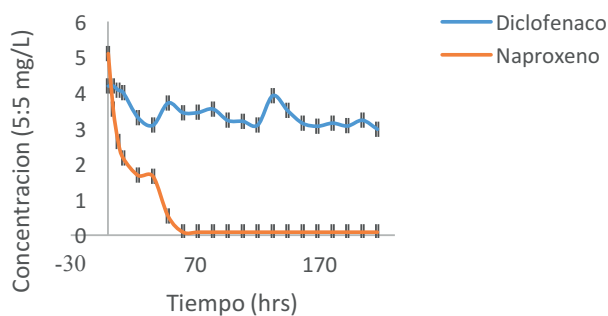


Tabla. 3. Porcentaje de remoción en mezcla

Fármaco	% Remoción
Diclofenaco	25
Naproxeno	99

Figura 8. Comportamiento de diclofenaco y naproxeno en mezcla de 5:5 mg/L.

En la figura 9 se evidencia que no existe un efecto negativo de la exposición de las plantas a la mezcla de fármacos en lo que se refiere al tamaño de la raíz pero si existe un efecto en el crecimiento de la planta (ver Figura 10).

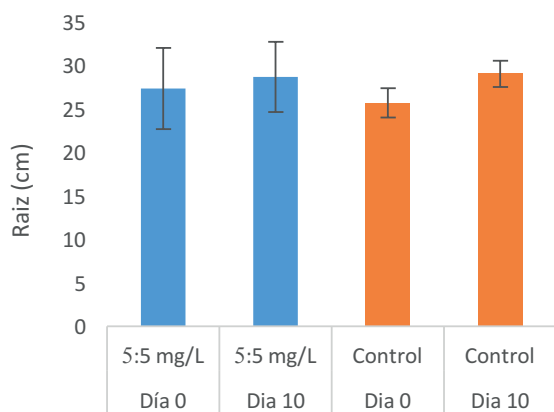


Figura 9. Efecto de concentración de 5:5 mg/L de fármacos en raíz.

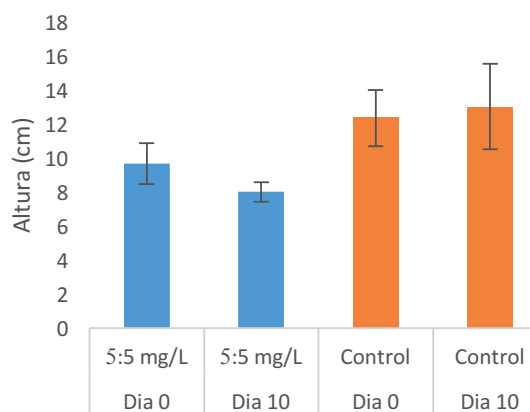


Figura 10. Efecto de concentración de 5:5 mg/L de fármacos en altura.

CONCLUSIONES

Se logró determinar la remoción de naproxeno, diclofenaco solos o en mezcla en función del tiempo de exposición al fármaco. La remoción de naproxeno fue de 99% tanto cuando esta solo como en mezcla con diclofenaco. Para diclofenaco la máxima remoción fue de 98% cuando está sólo; la remoción fue muy baja cuando está en mezcla con naproxeno (25%). La remoción de fármacos utilizando plantas es un tratamiento complementario posible y eficiente en las plantas de tratamiento de las aguas residuales. Como continuación de este trabajo se considera que debe analizarse si la remoción de los fármacos determinada en este trabajo corresponde a la sustancia en sí misma o se debe a que se forman metabolitos que no se detectan en el método de análisis de los fármacos empleados en este trabajo.

BIBLIOGRAFIA

Barceló, D. López de Alda M. J. (2008) Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales CSIC Barcelona. Panel Científico-Técnico de Seguimiento de la Política de Aguas, [pp. 17-23].

Cervantes, S. (2005) Evaluación de la remoción de ibuprofeno, mediante humedales de flujo subsuperficial horizontal. Instituto Tecnológico De Costa Rica, Cartago, [pp. 53-58].

Peña, A., Castillo A. (2015). Identificación y cuantificación de contaminantes emergentes en aguas residuales por (MEFS-CG-EM). Revista especializada en Ciencias Químico-Biológicas 18(1):40.

ANÁLISIS FITOQUÍMICO Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE GARAMBULLO Y CAPULÍN

Stephanie Fernández Avalos¹ y Dra. María Isabel García Vieyra²

RESUMEN

Diferentes estudios han mostrado que el consumo de frutas ricas en antioxidantes, es benéfico para la salud debido a su capacidad para prevenir diferentes enfermedades. En México existe una gran variedad de frutas que son subutilizadas como es el caso de Garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*) y el Capulín (*Prunus serotina*). El presente trabajo tiene como objetivo evaluar la actividad antioxidante diferentes extractos de Garambullo y Capulín mediante un análisis fitoquímico. En dicho estudio se trabajó con cuatro extractos (acuoso (A), metanólico (M), etanólico (E) y hexánico (H)). A los extractos obtenidos se les realizaron pruebas cualitativas y cuantitativas, referente a los resultados obtenidos al evaluar la actividad antioxidante en garambullo el extracto con mayor porcentaje fue el acuoso con un resultado de 23.63% y en capulín el extracto con mayor porcentaje fue el metanólico con un resultado de 55.71%. Al realizar las pruebas cualitativas se obtuvieron más resultados positivos que negativos observando la presencia de flavonoides, quinonas, glucósidos, terpenoides, coumarinas y fenoles para ambas frutas en la mayoría de los extractos evaluados. Por lo que se concluye que ambos frutos tienen una buena actividad antioxidante.

ABSTRACT:

Different studies have shown that consumption of antioxidant-rich fruits is beneficial to health because of their ability to prevent different illnesses. In Mexico there is a wide variety of fruits that are underutilized as is the case of Garambullo (*Myrtillocactus Geometrizans*) and Capulín (*Prunus Serotina*). This work aims to evaluate the antioxidant activity different extracts of Garambullo and Capulín through a phytochemicals analysis. This study worked with four extracts (aqueous (A), extract (M), extract (E) and Hexanico (H)). To the extracts obtained were carried out qualitative and quantitative tests, regarding the results obtained by evaluating the antioxidant activity in Garambullo the extract with the highest percentage was aqueous with a result of 23.63% and in Capulín the extract with the highest percentage was extract with a result of 55.71%. When performing the qualitative tests were obtained more positive results that negative observing the presence of flavonoids, Quinones, glycosides, Terpenoids, Coumarins and phenols for both fruits in most of the extracts evaluated. So it is concluded that both fruits have a good antioxidant activity.

Palabras clave: Antioxidante, garambullo, capulín.

INTRODUCCIÓN:

El Garambullo o *Myrtillocactus geometrizans*, es una cactácea del reino Plantae, la cual posee características que la diferencia de otras cactáceas, ya que requiere menos agua para su crecimiento, posee un periodo de vida de más de 50 años, el garambullo crece en condiciones de clima seco y se desarrolla bien sobre las laderas de los cerros y partes bajas donde hay suelos de mejor calidad. Las semillas de garambullo germinan muy fácilmente en casi cualquier tipo de suelo por mas rocoso y árido que se encuentre. El garambullo se encuentra con mayor distribución en los estados de Hidalgo, San Luis Potosí, Querétaro y Guanajuato, siendo estos además sus productores principales. La floración del Garambullo se lleva a cabo en la primavera, es susceptible al frío, siendo la temperatura más adecuada para esta especie durante el invierno de 10 °C como máximo. Una de las características importantes del fruto es su pigmentación, la cual está dada por su contenido en betalainas. [1]

Las betalainas se encuentran entre los pigmentos naturales de mayor interés para la industria alimentaria, además son reconocidas como moléculas nutraceuticas por poseer una potente actividad antioxidante. Siendo la propiedad antioxidante, una de las de mayor interés de las fitomoléculas ya que son capaces de proteger el cuerpo humano contra los daños provocados por radicales libres que atacan a macromoléculas tales como lípidos de membrana, proteínas e inclusive el ADN, conduciendo a trastornos de salud como cáncer, diabetes, envejecimiento y enfermedades neurodegenerativas. [2]

Hay algunos componentes en las plantas que tienen propiedades antioxidantes y antibacterianas. Este es el caso del Capulín (*Prunus serotina*), que ha sido utilizada con fines medicinales desde la época prehispánica para tratar diversas enfermedades, como la diarrea o las inflamaciones respiratorias asociadas con la tos. Esto es probablemente debido al hecho de que Capulín contiene una gran variedad de compuestos fenólicos tales como flavonoides y taninos, cuyas propiedades antioxidantes y antibacterianas están ampliamente documentadas. Un tipo de flavonoide presente en la piel de la fruta de Capulín contiene antocianinas. Numerosos estudios han demostrado que las antocianinas son depuradores efectivos de oxígeno reactivo fisiológicamente relevante y otros radicales. [3]

Numerosas pruebas antioxidantes se han desarrollado para evaluar la actividad antioxidante y para explicar la función de los antioxidantes. Los ensayos más comúnmente aceptados para evaluar la actividad antioxidante son los de la actividad antioxidante total, el poder reductor, el ensayo de DPPH, el barrido de aniones superóxido y el ensayo de barrido de radicales hidroxilo. [4]

MATERIALES Y METODOS

Obtención del fruto

El garambullo y el capulín se obtuvieron de una comunidad de la ciudad de Salvatierra Guanajuato siendo está una ciudad dentro del estado de Guanajuato donde se producen mayormente estos frutos.

Obtención de los extractos

Como primer paso se lavó perfectamente el fruto y se extrajo la semilla, se dejó secar a temperatura de 57°C en estufa hasta peso constante. Una vez seco el fruto se pesó y posteriormente se molió el fruto seco y se realizó otro pesado de la molienda obtenida.

Extracto acuoso: De ambas frutas los extractos fueron preparados por adición de agua destilada en una proporción 1:2 de fruta seca pulverizada-agua respectivamente, posteriormente se dejó reposar por 72hr. Una vez transcurrido el tiempo de reposo se filtró y el filtrado se concentró en un rotavapor a 55°C, por último se pasó la muestra a un vial perfectamente limpio.

Extractos metanólico, etanólico y hexánico: Los polvos pulverizados de garambullo y capulín fueron cubiertos completamente con cada solvente, posteriormente se dejaron en maceración por 72hr. Una vez transcurrido el tiempo de reposo se filtró y se concentró en un rotavapor a 55°C.

Screening fitoquímico

Para la realización de las pruebas cualitativas de los extractos concentrados, se prepararon las muestras, pesando 0.2g de cada extracto en un tubo eppendorf. Posteriormente se añadió 200µl de agua destilada a cada uno y 900µl de etanol absoluto, se agitaron los tubos con ayuda de un vortex durante 5min y se centrifugaron a 10,000rpm durante 10min.

Saponinas: para esta prueba se colocaron 200µl de la muestra anterior en un tubo eppendorf y se agregaron 200µl de agua destilada, se agitó vigorosamente durante 3min. La prueba se considera positiva con la aparición de una capa de espuma.

Flavonoides: se agregaron 200µl de cada muestra en un tubo eppendorf y se añadió a cada tubo 100µl de NaOH al 2N. La prueba se considera positiva si se torna un color amarillo.

Quinonas: se colocaron 100µl de cada muestra en un tubo eppendorf y se añadieron 100µl de H₂SO₄ a cada tubo. La prueba se considera un resultado positivo con la formación de un color rojo.

Glucósidos: se colocaron 200µl de cada muestra en un tubo eppendorf, se agregaron 300µl de cloroformo y 4 gotas de NH₄Cl al 10% a cada tubo. La prueba se considera positiva si se torna un color rosado.

Glucósidos Cardíacos: se agregaron 50µl de cada muestra en un tubo eppendorf, se añadieron 200µl de ácido acético glacial y 4 gotas de FeCl₃ al 5%, posteriormente se añadió 60 µl de H₂SO₄. La prueba se considera positiva con la aparición de un anillo de color marrón en la interfase.

Terpenoides: se agregaron 50µl de cada muestra en un tubo eppendorf, se añadieron 200µl de cloroformo y se agregaron 4 gotas de H₂SO₄ a cada tubo. Se considera una prueba positiva si se torna un color café.

Cumarinas: se agregaron 100µl de cada muestra en un tubo eppendorf y se adicionaron 100µl de NaOH al 10% en cada tubo. Se considera un resultado positivo si se torna una coloración amarilla.

Fenoles: se añadieron 100µl de cada muestra en un tubo eppendorf, se añadieron 200µl de agua destilada y 4 gotas de FeCl₃ al 10% a cada tubo. Se considera una prueba positiva con la formación de un color azul o verde.

Taninos: se colocaron 100µl de cada extracto en un tubo eppendorf, se añadieron 200µl de FeCl₃ al 5% en cada tubo. Se considera una prueba positiva si se torna un color azul o verde.

Alcaloides: se colocaron 0.5ml de cada extracto en un tubo eppendorf y se disolvieron en 1ml de HCl al 37.5%, posteriormente se filtraron y se añadió 300µl de reactivo mayer a cada uno de los filtrados. Se considera una prueba positiva si se presenta un precipitado.

Actividad antioxidante

Se realizó una solución de DPPH a una concentración de 150 µM. Se colocaron 150 µl de cada extracto, se puso por triplicado en una microplaca de 96 pozos, posteriormente se agregaron 150 µl de DPPH. Una vez mezclada la muestra con el reactivo se midió la absorbancia a una longitud de onda de 490 nm al tiempo 0, 30, 60 y 120 min en incubación a temperatura ambiente. Para expresar la actividad antioxidante se usó la siguiente fórmula que muestra el porcentaje de captación de radicales libres.

$$\% \text{ Inhibición del radical DPPH} = \frac{\text{Absorbancia muestra (0 min)} - \text{Absorbancia muestra (30 min)}}{\text{Absorbancia muestra (0 min)}} * 100 \quad (1)$$

Determinación de fenoles totales

Se pesaron 0.1 g de cada extracto se disolvieron en 1 ml de agua destilada, se centrifugó a 13,000 rpm durante 3 minutos. Se pusieron 30 µl de cada extracto por triplicado en una microplaca y se mezclaron con 150 µl del reactivo Folin-Ciocalteu durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 120 µl Na₂CO₃ al 0.075%. Se incubaron las muestras durante 2 horas a temperatura ambiente. La absorbancia se midió a una longitud de onda de 750 nm. Los resultados se expresan como mg de ácido gálico.

Determinación de taninos condensados: Se colocaron 10 µl del extracto diluido 1:6 por triplicado en una microplaca, se agregaron 197 µl de una solución etanol-vainillina al 4%. Se añadieron 99 µl de H₂SO₄ lentamente para cada uno de los extractos, se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia a 490 nm. Los resultados se expresan en µg de catequina.

RESULTADOS

Screening fitoquímico

Para las pruebas cualitativas se obtuvieron los siguientes resultados:

En la tabla 1 se muestran los resultados de las pruebas colorimétricas de los frutos de garambullo y capulín, como se puede observar que, para la prueba de saponinas en casi todos los extractos obtuvieron resultados negativos excepto para el extracto de Hexano-Garambullo (HG). Los flavonoides y las cumarinas estuvieron presentes en todos los extractos. Las pruebas de alcaloides dieron negativas para los extractos acuosos de garambullo y capulín. Los extractos hexánicos presentaron prueba negativa para quinonas glucósidos, fenoles y taninos. También se observa que los extractos en los que se obtuvieron más resultados positivos fueron el metanólico y el etanólico; y el extracto en donde se obtuvieron mayormente resultados negativos fue el hexánico.

Tabla 1: Screening fitoquímico de los extractos de Garambullo y Capulín.

Metabolito	AG	AC	MG	MC	EG	EC	HG	HC
Saponinas	-	-	-	-	-	-	+	-
Flavonoides	+	+	+	+	+	+	+	+
Quinonas	+	+	+	+	+	+	-	-
Glucosidos	+	-	+	+	+	-	-	-
Glucosidos cardiacos	-	-	+	+	+	+	-	+
Terpenoides	+	+	+	+	+	+	+	-
Cumarinas	+	+	+	+	+	+	+	+
Fenoles	+	+	+	+	+	+	-	-
Taninos	+	+	+	+	+	+	-	-
Alcaloides	-	-	+	+	+	+	+	+

Extractos; AG:acuoso-garambullo, AC:acuoso-capulin, MG: metanol-garambullo, MC: metanol-capulín, EG: etanol-garambullo, EC: etanol-capulín, HG: hexano-garambullo, HC: hexano-capulín.

En el caso del capulín los extractos con mayores resultados positivos fueron el metanólico y el etanólico, y el extracto con resultados menos favorables fue el hexánico.

Actividad antioxidante

En la tabla 2 podemos observar que el porcentaje más alto de actividad antioxidante fue de 23.63% que corresponde al extracto acuoso de garambullo y 55.71% para el extracto metanólico de capulín, y el valor más alto de fenoles totales fue en el extracto EG con un valor de 256 mg EAG 100g de muestra y para taninos el extracto hexánico (HG) fue mayor con un valor de 2755.4 mg EC/g de muestra.

Tabla 2: Resultados cuantitativos de los extractos de Garambullo y Capulín.

Determinación	AG	AC	MG	MC	EG	EC	HG	HC
% de captación de radicales libres DPPH	23.63%	46.07%	11.40%	55.71%	8.30%	47.13%	6.80%	11.34%
Contenido de fenoles totales (mg EAG)	100	106	96.8	175.6	256	115	193.8	124.2
Cuantificación de taninos condensación de (mg EC/g de muestra)	1622.2	4522.2	2111	1518.4	2259.2	3548	2755.4	3696.2

Extractos; AG:acuoso-garambullo, AC:acuoso-capulin, MG: metanol-garambullo, MC: metanol-capulín, EG: etanol-garambullo, EC: etanol-capulín, HG: hexano-garambullo, HC: hexano-capulín.

En el caso del capulín que el extracto con mayor con el de mayor contenido de fenoles totales también fue el metanólico con un valor de 175.6 mg EAG y por último para taninos el extracto acuoso fue el de mayor valor con un resultado de 4522.2 mg EC/g de muestra.

CONCLUSIONES

Los métodos de determinación de la actividad antioxidantes se basan en comprobar cómo un agente oxidante induce daño oxidativo a un sustrato oxidable, daño que es inhibido o reducido en presencia de un antioxidante. Esta inhibición es proporcional a la actividad antioxidante del compuesto o la muestra. Por otra parte, hay ensayos que se basan en la cuantificación de los productos formados tras el proceso oxidativo.

Referente a los resultados obtenidos al realizar las pruebas cualitativas comprobamos la presencia de ciertos metabolitos secundarios, en la cual los extractos en donde dio un resultado positivo a la mayoría de esos metabolitos fueron el metanólico y el etanólico en ambos frutos; al realizar las pruebas cuantitativas comparando los extractos hubo cierta variación dependiendo la prueba, los porcentajes de la actividad antioxidante al comparar los dos frutos el que tuvo un porcentaje mayor fue el de capulín, en todos los extractos presentó un porcentaje más alto a comparación con el garambullo; en la prueba de taninos obtuvimos resultados muy elevados en todos los extractos y en ambos frutos, a comparación con otros resultados reportados por diferentes investigadores. Por último al realizar todas las pruebas necesarias, podemos concluir que el garambullo y el capulín sí presentan una actividad antioxidante considerable, por lo tanto es necesario seguir estudiando estos dos frutos más a fondo para confirmar y descubrir las propiedades que presentan.

Bibliografía

1. Gómez. A, Lira Saade. A, Madrigal. E, García. B, Soto. E , Romo. M (2015). “Manejo y síndromes de domesticación del capulín (*Prunus serotina* Ehrh ssp. *capuli* (Cav.) Mc Vaugh) en comunidades del estado de Tlaxcala” en *Agrociencia*, Núm 2, Vol 49, [pp. 1405-3195].
2. Frankel E.N and Meyer, A.C. (2000). The problems of using one dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, 1925–1941.
3. INI (1994). *Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana* (Atlas of plants from the traditional Mexican medicine), vol. I. Instituto Indigenista Mexicano, Mexico.
4. Einbond L.S, Reynertson K.A., Luo X. D, Basile, M.J. and Kennelly E.J. (2004). Anthocyanin antioxidants from edible fruits. *Food Chemistry* 84, 23–28.

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE 7-METOXI-4-FENIL-3,4-DIHI-DRO-2H-BENZO[1,3]OXAZINA-2-THION.

¹Verónica Lizeth Venegas González y ²Gerardo González García.

RESUMEN

El presente trabajo pretende describir la metodología que se utilizó para la síntesis de 7-metoxi-4-fenil-3,4-dihidro-2H-benzo[1,3]oxazina-2-thion basada en métodos anteriormente no reportados así como su caracterización utilizando RMN de ¹H, ¹³C, ¹³C DEPT, COSY y ²⁹Si.

ABSTRACT

Benzoxazinonas y benzotioxazinonas han recibido considerable atención debido a sus atractivas propiedades farmacéuticas asociado con su andamio heterocíclico. Moléculas con este tipo de estructura han sido reportadas por exhibir propiedades biológicas como antiinflamatorias, antiulcerosas, antipiréticas, antihipertensivo y actividad antifúngica. Algunos derivados de 3,4-dihidro-2H-1,3-benzoxacina-2-thiona han sido reportados por presentar actividad anti depresiva [2].

PALABRAS CLAVE: Síntesis, silicio, ligante, reacción.

INTRODUCCION

En 1977 Arct *et al.* demostraron que la síntesis de 3,4-dihidro-2H-1,3- benzoxazina-2-thiona se puede lograr haciendo reaccionar sales de *o*-hidroxibenziltrimetilamonio con tiocianato de potasio. Sin embargo varios métodos de preparación de estos clásicos heterociclos han sido reportados desde entonces. Uno de estos métodos es la síntesis de 3,4-dihidro-2H-1,3-benzoxazina-2-thiona *vía* ciclación de fenoles 2-(1-isotiocianatoalquil). Aquí, los isotiocianatofenoles pueden ser generados desde 2-hidroxibenzaldehído y 2-hidroxifenilcetonas que están disponibles comercialmente utilizando una simple secuencia de pasos donde después estos se ciclan bajo condiciones suaves

METODOLOGÍA

Procedimientos generales. Toda la síntesis fue llevada a cabo bajo condiciones de vacío y gas nitrógeno.

Metildi(tiocianato-*N*)silano. Se añadió a 20°C, 22.1gr de dicloro(metil)silano a una suspensión de 28.9 gr de tiocianato de amonio en 100 ml de tolueno a temperatura ambiente y fue llevado a reflujo durante 4h. Después la mezcla fue recolectada y enfriada a 20°C. El precipitado resultante fue filtrado y descartado. El solvente del filtrado fue removido mediante destilación a presión normal y el residuo fue destilado al vacío.

Después de la destilación al vacío, este tuvo que ser sometido a destilación nuevamente, bajo las mismas condiciones en las que fue llevada a cabo la primera destilación debido a que el precursor no estaba totalmente puro. El producto fue recolectado y guardado en refrigeración.

Reacción 1 ligante 1. Se añadieron a 20°C, 0.64 gr de ligante (Lig 1) y se disolvieron en 10 ml de CH₃CN, después se le añadió 0.339gr de precursor HMeSi(NCS)₂ previamente sintetizado y se dejó reaccionar por 24 h a temperatura ambiente. El producto formado se llevó a evaporación y se formó un sólido polvoso color amarillo. El esquema general de la reacción se muestra en la figura 1.

Reacción 2 ligante 1. Se añadieron 0.5017gr del ligante 1 (Lig 1) en 20 ml de CH₃Cl a 20°C, después a esta mezcla se le añadieron 0.262gr del precursor HMeSi(NCS) anteriormente sintetizado. Esto se dejó reaccionar por 24 h a temperatura ambiente y en agitación constante. El esquema general de reacción se muestra en la figura 2.

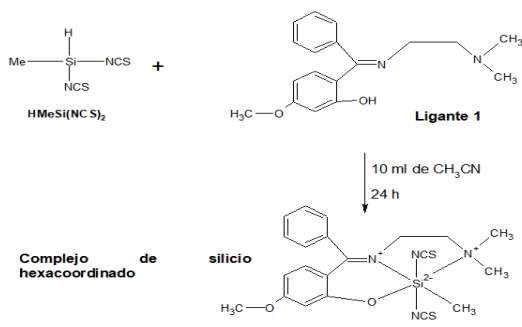


Figura 1. Esquema general de la reacción 1 con el ligante 1.

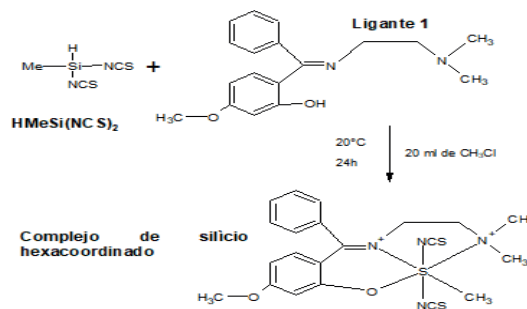


Figura 2. Esquema general de la reacción 1 con el ligante 1.

RESULTADOS y DISCUSION

En las figuras 3 y 4, se muestra la estructura y el espectro de ^{29}Si -RMN del precursor HMeSi(NCS) . Se puede observar en el espectro de la figura 4, que el precursor no está puro, es decir, se observan más señales que pudieran ser subproductos generados durante la destilación del precursor Metildi(tiocianato-*N*)silano, es por eso que fue sometido a destilación nuevamente a 60°C , con lo que se obtuvo un rendimiento de 8.717%.

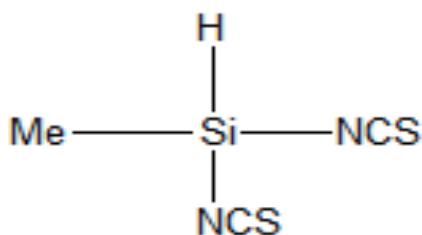


Figura 3. Se muestra el precursor Metildi(tiocianato-*N*)silano formado.

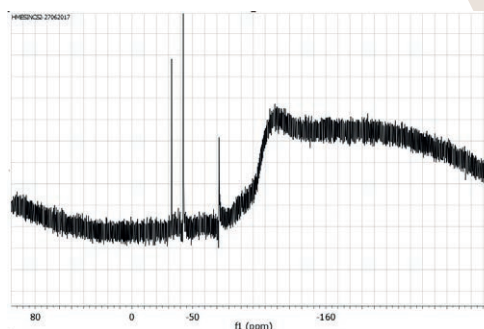


Figura 4. Espectro de ^{29}Si -RMN del precursor Metildi(tiocianato-*N*)silano. En la ilustración se observa el espectro obtenido del compuesto

En el espectro de la figura 4, se puede observar que la señal que aparece a -74.47 ppm nos indica que se trata de una especie de silice tetracoordinada, las señales restantes nos indican la presencia de subproductos formados durante la reacción. Después de la segunda destilación con el fin de eliminar las impurezas del compuesto, el precursor fue recolectado y guardado en refrigeración, mientras que los residuos sólidos producto de la destilación, se mantuvieron también en refrigeración, estos se disolvieron en cloroformo deuterado (CDCl_3).

Reacción 1 ligante 1. Realizando el análisis de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, ^{29}Si -RMN y COSY del complejo de sílice hexacoordinado formado utilizando CDCl_3 como solvente, se puede observar en la figura 5 que corresponde a ^1H -RMN, corresponde al espectro obtenido, en el cual, no solo se observan señales del compuesto sino que también aparecen señales de subproductos que se encuentran en la muestra debido a que el precursor no estaba puro al momento de hacer la reacción.

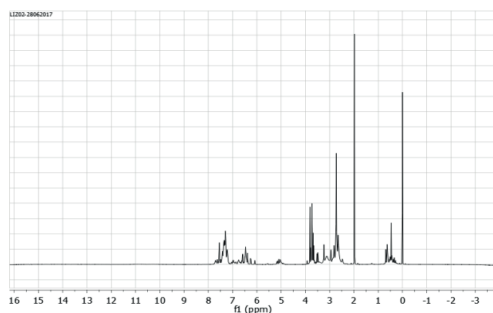


Figura 5. Espectro de ^1H -RMN del compuesto de silicio hexacoordinado.

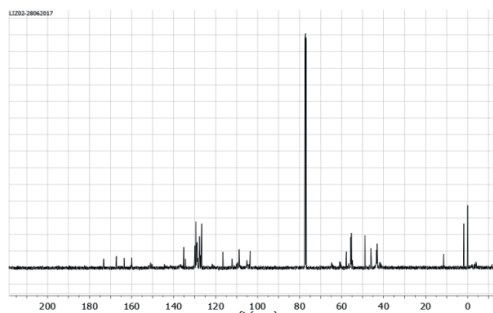


Figura 6. Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto de silicio hexacoordinado.

En la figura 6, se observa el espectro correspondiente a ^{13}C -RMN del complejo de silicio hexacoordinado. La señal que aparece a 11.46 ppm , corresponde al metilo unido al átomo de silicio. Las señales a 173.26 ppm , 167.22 ppm y 163.57 ppm que aparecen en el espectro, corresponden a los carbonos cuaternarios del complejo formado. Otra señal

que aparece a 135.14 ppm en ambos espectros, corresponde a la del metilo unido al átomo de oxígeno. Y las demás señales que aparecen corresponden a CH aromáticos y las otras señales que parecen además de las ya antes mencionadas, corresponden a subproductos formados durante la reacción.

Con base a estos resultados, se optó por realizar lavados por triplicado con éter etílico de 10 ml y el producto obtenido se filtró, el precipitado fue recolectado y secado mientras que el disolvente fue descartado. El producto restante fue llevado a analizar a RMN nuevamente.

Las siguientes imágenes corresponden al complejo de silicio-NCS hexacoordinado después de haberle retirado las impurezas con tres lavados con éter etílico de 10 ml.

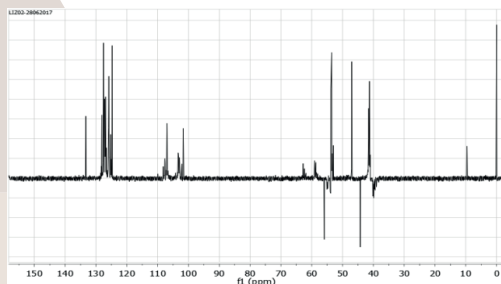


Figura 7. Espectro de $^{13}\text{CRMN}$ DEPT del compuesto de silicio hexacoordinado.

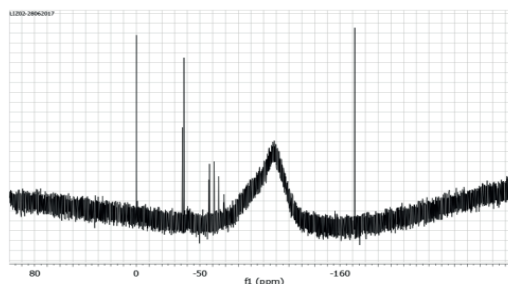


Figura 8. Espectros de $^{29}\text{SiRMN}$ del compuesto de silicio hexacoordinado.

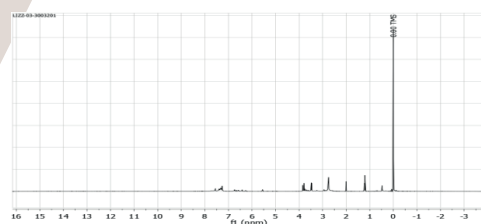


Figura 9. Espectro de $^1\text{HRMN}$ del complejo de silicio-NCS utilizando como solvente CDCl_3 , obtenido después de la extracción con éter etílico.



Figura 10. Espectro de $^{13}\text{CRMN}$ del complejo de silicio-NCS utilizando como solvente CDCl_3 , obtenido después de la extracción con éter etílico.

Figura 11. Espectro de $^{29}\text{SiRMN}$ del complejo de silicio-NCS utilizando como solvente CDCl_3 , obtenido después de la extracción con éter etílico.

Sin embargo en la figura 11 podemos observar que aparece una sola señal a -167ppm esto nos indica que se trata de un compuesto hexacoordinado en este caso de silicio, que es en realidad lo que se esperaba desde un inicio.

Reacción 2 ligante 1. A continuación se muestran los espectros de RMN ($^1\text{HRMN}$, $^{13}\text{CRMN}$, $^{13}\text{CRMN}$ y $^{29}\text{SiRMN}$) obtenidos de esta reacción.

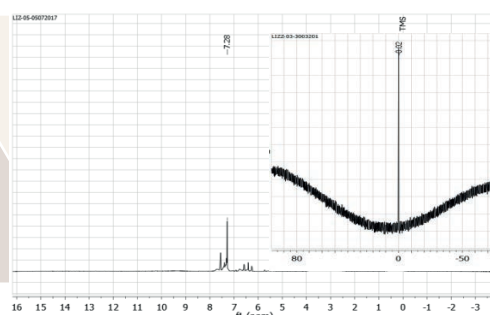


Figura 12. Espectro de $^1\text{HRMN}$ obtenido del complejo de silicio hexacoordinado como producto de la reacción 2 ligante1.

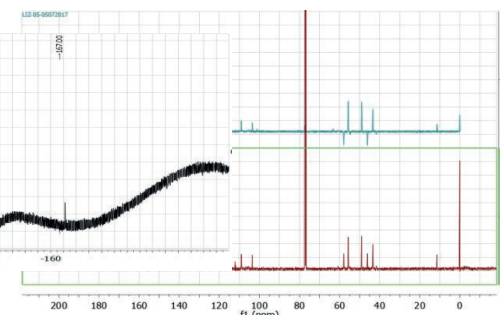


Figura 13. Espectro de $^{13}\text{CRMN}$ (abajo) y $^{13}\text{CRMN}$ DEPT (arriba), obtenido del complejo de silicio hexacoordinado como producto de la reacción 2 ligante 1.

En la figura 12, la señal a 0.47 ppm corresponde al metilo unido al átomo del silicio, la señal que aparece a 2.75 ppm corresponde a los metilos unidos al átomo del nitrógeno. La señal que aparece a 7.28 ppm corresponde al metilo unido al átomo del oxígeno. La señal que se observa a 3.84 ppm corresponde al cloroformo que fue el que se usó como solvente para llevar a cabo la reacción y también se usó cloroformo deuterado como solvente para el análisis de RMN. Los dos tripletes que aparecen a 2.95 ppm y 3.50 ppm corresponden a los metilenos del compuesto. Por último la señal que se observa a 0.00 ppm corresponde al TMS (trimetilsilano) que es la referencia.

En el espectro de ^{13}C RMN DEPT a comparación con el espectro de ^{13}C RMN, se puede observar que aparecen dos señales en la parte negativa, estas dos señales corresponden a los metilenos del compuesto, siendo que estas dos señales no aparecen en el espectro de ^{13}C RMN. La señal que aparece a 11.45 ppm en ambos espectros, corresponde al metilo unido al átomo de silicio. Las señales a 173.25 ppm, 167.31 ppm y 163.62 ppm que aparecen en el espectro de ^{13}C , corresponden a los carbonos cuaternarios del complejo formado, señales que en el espectro de ^{13}C DEPT no son posibles de observar. Otra señal que aparece a 135.10 ppm en ambos espectros, corresponde a la del metilo unido al átomo de oxígeno. Y las demás señales que aparecen en ambos espectros corresponden a CH aromáticos.

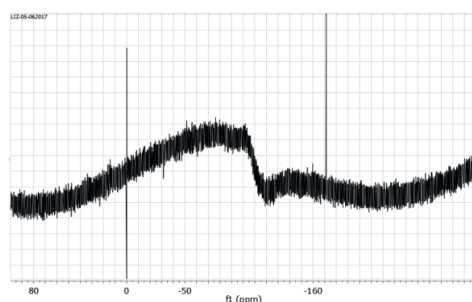


Figura 14. Espectro de ^{29}Si RMN del complejo de silicio hexacoordinado, como producto de la reacción 2 ligante 1.

En esta imagen podremos observar que ya en el espectro aparece una sola señal a -171.43 ppm, con lo cual nos confirma que el complejo además de estar puro, se muestra la presencia de la especie de silicio hexacoordinada de interés.

CONCLUSIÓN

Con base a la realización del presente trabajo, se busca crear un método para la síntesis de 7-metoxi-4-fenil-3,4-dihidro-2H-benzo[1,3]oxazina-2-thion, mediante un solo paso, sin la necesidad de realizar múltiples reacciones para llegar al producto final, dado que la reacciones realizadas son limpias, es decir no generan subproductos lo cual es otra ventaja con respecto a la metodología utilizada. Con los resultados obtenidos se pudo lograr la obtención del compuesto deseado aunque con bajos rendimientos

BIBLIOGRAFÍA

González Gracia G. et all.(2008) Syntesis and Structural Characterization of Novel Neutral Higher-Coordinate Silicon(IV) Complexes with SiON_3C and SiON_4C Skeletons. Anorg. Allg Chem. Vol 634. [pp.1281-1286].

Xiaoyan Z. and Yong Rok L.(2012) $\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_3$ -Catalyzed Facile One-Pot Synthesis of 1,2-Dihydro-1-arylnaphtho[1,2-e] [1,3]oxazine-3-ones and 1,2-Dihydro-1-arylnaphtho[1,2-e][1,3]oxazine-3-thiones Bull. Korean Chem. Soc. Vol. 33, No. 11.

Kobayashi K.; Inouchi H.; Matsumoto N.; Chikazawa Y. (2016) HETEROCYCLES, vol. 93, No. 1.

EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE PÉPTIDOS SINTÉTICOS DE VASOHINIBINAS EN UN MODELO FISIOLÓGICO DE RATONES BALB/C

Yolanda Monserrath Jacobo Delgado¹, Gabriela Navarro Tovar², Aarón Milo Álvarez^{2,3}, Sergio Rosales Mendoza^{2,3}, Juan Jesús Barrios Capuchino^{2,3} y María del Carmen González Castillo^{2,3}

RESUMEN

La gestación y lactancia, son eventos fisiológicos en la mujer que promueven una elevación de las concentraciones de prolactina (PRL) y sus derivados proteolíticos, vasoinhibinas (Vi), en diversos fluidos corporales. La contribución de éstas en el desarrollo y maduración intestinal ha sido poco estudiada. El objetivo del presente trabajo fue establecer y validar condiciones fisiológicas de tonicidad muscular en intestino delgado (ID) de ratones BALB/c, para posteriormente evaluar los efectos inducidos por tres Vi sintéticas y PRL. En dicho modelo las Vi generaron un efecto de relajación transitoria, regresando al estado contráctil previamente establecido, mientras que la PRL no ejerció ningún efecto aparente. A su vez se identificaron patrones característicos de producción de óxido nítrico (NO) en cada tratamiento.

ABSTRACT

Gestation and lactation are physiological events in women that promote elevation of prolactin concentrations (PRL) and proteolytic derivatives, vasoinhibins (Vi), in various body fluids. The contribution of these in intestinal development and maturation has been little studied. The objective of the present work was to establish and validate the physiological conditions of muscle tone in the small intestine (ID) of BALB / c mice, to evaluate the effects induced by three synthetic Vi and PRL. In this model the Vi generated a transient relaxation effect, returning to the previously established contractile state, while the PRL had no apparent effect. At the same time, characteristic patterns of nitric oxide (NO) production were identified in each treatment.

Palabras clave: Vasoinhibinas, prolactina, gestación, motilidad intestinal.

INTRODUCCIÓN

Las Vi comprenden una familia de hormonas conocidas por ejercer un efecto inhibitorio sobre la angiogénesis, vasopermeabilidad y vasodilatación (Clapp, et al., 2006). Se generan a partir de la fragmentación enzimática de las hormonas; PRL, lactógeno placentario (LP) y hormona del crecimiento (GH); sin embargo, la mayor información disponible es de las Vi generadas a partir de PRL. Dicha hormona, es una cadena polipeptídica formada por 199 aminoácidos con un peso molecular de 23 kDa, cuya estructura globular se encuentra estabilizada por tres enlaces disulfuro intramoleculares y cuatro α -hélices antiparalelas (Goffin et al., 1998). La PRL es secretada por células lactótropas ubicadas en la adenohipófisis de todos los vertebrados (Khurana, et al., 1999). Los productos de las reacciones enzimáticas, promovidas por la cathepsina D y metaloproteasas, son diversos péptidos de 16 kDa con el extremo bioactivo amino terminal de la PRL, o bien, con extremo carboxilo terminal, del cual no hay efecto biológico reconocido (Khurana, et al., 1999). La PRL posee actividad multifuncional debido a la amplia distribución de sus receptores celulares, una de sus propiedades más reconocidas es su influencia en el desarrollo morfológico y funcional de las glándulas mamarias, y por ende, el proceso de lactogénesis. La PRL se secreta de una forma pulsátil (Shin, et al., 1981) y sus niveles en la circulación varían a lo largo del ciclo vital. En el varón joven sano, los niveles plasmáticos de PRL oscilan alrededor de 5 μ g/L, mientras que en la mujer varían entre 5 y 15 μ g/L (Pérez, 2010). La gestación y la lactancia, son eventos fisiológicos en la mujer que desencadenan alzas en la concentración de PRL en líquido amniótico (Lolis, et al., 1977) y leche materna (Healy, et al., 1980), respectivamente. Dichos fluidos y sus correspondientes componentes, constituyen fuentes importantes de nutrientes y tienen contacto con el tracto digestivo del feto y neonato (Abramovich, et al., 1979), por lo que se sugiere que tanto la PRL como sus derivados enzimáticos, las Vi, contribuyen de manera relevante en su desarrollo y maduración intestinal. Particularmente, existen reportes que relacionan a las Vi con funciones antagónicas a las de su precursor, la PRL. Además, su generación dependerá de diversos controles fisiológicos, de la disponibilidad de PRL, de la actividad de las enzimas involucradas y del microambiente biológico (González, et al., 2007); (Triebel, et al., 2015). La relevancia de las Vi ha sido reportada en estudios donde cambios en la concentración de estos péptidos, se han asociado con diversas patologías. En este contexto, se han detectado altos niveles de Vi en orina, líquido amniótico, placenta y suero de pacientes con preeclampsia (González, et al., 2007; Leañós-Miranda, et al., 2008; Ohkuchi, et al., 2013), que es una condición patológica que se caracteriza por un aumento abrupto de la presión sanguínea y proteinuria en mujeres que cursan la última etapa del embarazo (Leañós-Miranda, et al., 2008) y que pone en riesgo la vida materno-infantil. De forma complementaria, las investigaciones en preeclampsia muestran que durante dicha condición, la expresión de la enzima cathepsina D se ve incrementada (Kim YN, et al., 2007), a su vez, hay una elevada presencia de Vi en líquido amniótico que está asociada con bajo peso del feto al nacer (González, et al., 2007). En conjunto, estas evidencias sugieren que las Vi se ven implicadas fuertemente en la fisiología materno-fetal. Sin embargo, las Vi quedan por investigar en referencia a la maduración y motilidad intestinal del recién nacido, cuyas alteraciones se pueden manifestar como los conocidos cólicos, definidos como dolores abdominales intensos y opresivos (M., et al., 2016). En este sentido, nuestro trabajo plantea el establecimiento de un modelo fisiológico de ID de ratones BALB/c para el estudio de Vi sintéticas. Los resultados obtenidos durante el Verano de la Ciencia, generarán las bases para establecer marcadores y/o parámetros experimentales óptimos para la evaluación de Vi a diferentes concentraciones. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue establecer y validar las condiciones fisiológicas de tonicidad muscular en ID de ratones BALB/c, para posteriormente evaluar los efectos inducidos por tres Vi sintéticas y PRL en este tejido y su participación en la motilidad del mismo, además, cuantificar NO en el sistema fisiológico, para sugerir la vía involucrada en el mecanismo de acción de las Vi en ID.

METODOLOGÍA

Animales de experimentación

Se utilizaron ratones BALB/c macho de 6-8 semanas de edad con un peso aproximado de 22-24 gramos. Los procedimientos experimentales se realizaron conforme a la normatividad institucional de uso y manejo adecuado de animales de experimentación. Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y posteriormente se disectó el ID, del cual se aisló y seccionó transversalmente un segmento de 10 cm de yeyuno proximal a ileon, se conservó en refrigeración en solución Krebs cuya composición fue (en mM): NaCl 135, KCl 4.7, MgSO₄ 1.17, KH₂PO₄ 1.1, CaCl₂ 1.1, NaHCO₃ 3, Dextrosa 12.86 y HEPES 20, a un pH de 7.4. Posteriormente, se segmentó en anillos de 0.5 cm de longitud que se montaron en baños fisiológicos, con la misma solución a 37 °C usando una pre-tensión de 0.5 g con un periodo de estabilización de 60 minutos, acoplados a transductores de fuerza que recibieron directamente el estímulo de tensión intestinal convirtiéndolo en una señal eléctrica proporcional que fue amplificada y presentada gráficamente en el dispositivo destinado para ello. Los cortes fueron pre-contráidos con cloruro de potasio (KCl) a 80 mM, una vez que la contracción fue sostenida, fueron relajados con norepinefrina (NE) a 55 µM para obtener los controles, posteriormente se administraron dosis de concentraciones crecientes individuales de cada Vi y PRL. Se tomaron muestras de 1 mL de los baños fisiológicos antes y después de cada tratamiento para la cuantificación de metabolitos de NO. Los datos obtenidos fueron recolectados en tiempo real y analizados en el software Polyview Data Acquisition and Analysis System.

Vasoinhibinas Sintéticas y Prolactina

Las Vi sintéticas empleadas en este estudio fueron adquiridas a través de GeneScript Inc. (EUA) y sus secuencias, con extremo amino terminal homólogas a las endógenas son; Vi2: RDLFDRAVVLSHYIHNLSSEMFSEFDKRYT, Vi3: LSSEMFSEFDKRYTHGRGFITKAINSCHTS y Vi4: GRGFITKAINSCHTSSLATPEDKEQAQQMN. Las soluciones empleadas, tanto de Vi como de PRL, se prepararon en agua destilada estéril en concentraciones de 10, 25, 50 y 100 nM y de 0.1, 1, 5 y 10 nM, respectivamente.

Análisis de datos

Los datos obtenidos fueron analizados mediante un ANOVA usando el software GraphPad Prism 5, con un nivel de significancia de $p < 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Previo a la evaluación de las diferentes Vi, la viabilidad del tejido se verificó mediante la administración de un agente contráctil conocido (KCl 80mM) y uno relajante (NE 55µM). Al administrar Vi2 en anillos precontraídos con KCl, ésta indujo relajaciones sostenidas, cuyo efecto fue independiente de la concentración ($n=4$) (Figura 1-A). En otros experimentos independientes, de Vi3 y Vi4, ($n=6$ y $n=5$, respectivamente) en anillos precontraídos se observaron efectos duales, inicialmente, en las concentraciones más bajas (15 y 25nM) se presentaron efectos contráctiles sostenidos, y en las siguientes concentraciones (50 y 100nM) hubo relajaciones no sostenidas aparentemente independientes de la concentración (Figura 1-B y 1-C). Con la finalidad de evaluar la viabilidad de los anillos de ID, al finalizar el tratamiento se utilizó NE, como control positivo de relajación del músculo liso, la cual tuvo una acción discreta que tendrá que confirmarse con un mayor número de experimentos.

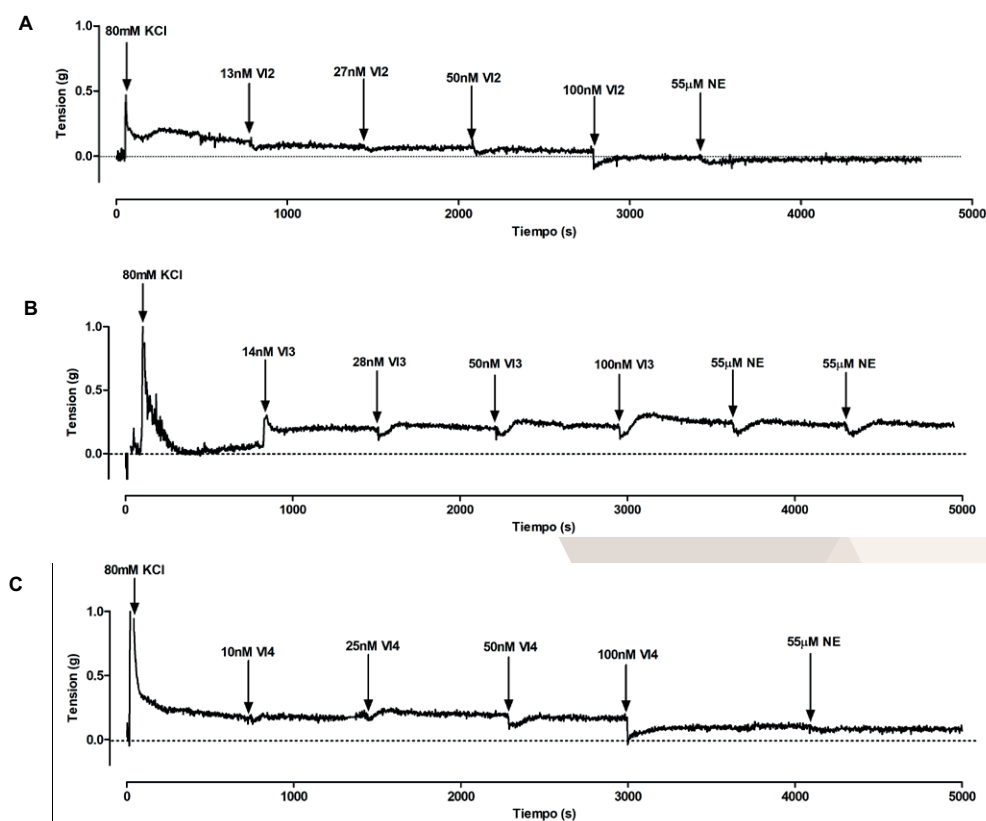


Figura 1. Registro representativo de dosis crecientes y acumulativas de Vi2 (A), Vi3 (B) y Vi4 (C).

Con el fin de obtener un dato comparativo, se evaluó la respuesta de dosis crecientes y acumulativas de PRL siguiendo el mismo protocolo utilizado para las Vi. Observamos que la PRL careció de efecto significativo, al menos en la ventana de tiempo y concentraciones evaluadas (Figura 2). Si bien estos resultados, aunque preliminares, establecen por primera vez que existen efectos diferenciales importantes entre la proteína completa (PRL) y sus derivados (Vi), que podrían dar luz a los efectos selectivos de las hormonas en la regulación de la motilidad intestinal y otros procesos de maduración del ID. Puesto que las Vi promovieron efectos de relajación muscular en el ID, se cuantificaron los niveles de NO (NO_2/NO_3) usando la reacción colorimétrica de Griess (Tenorio López, et al., 2005) con el fin de proponer el posible mecanismo de acción de los péptidos empleados. En este sentido, se determinaron menores concentraciones de NO en los tratamientos con las Vi2 y Vi3 (Figura 3-A y 3-B) que con la Vi4 (Figura 3-C), mientras que la exposición a PRL no produjo un cambio significativo en los niveles de NO (Figura 3-D). Cada tratamiento fue comparado con su control basal, es decir, segmentos de ID sin tratamiento.

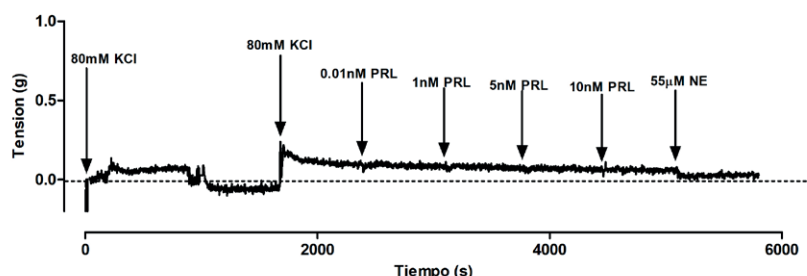


Figura 2. Registro representativo de dosis crecientes y acumulativas de PRL.

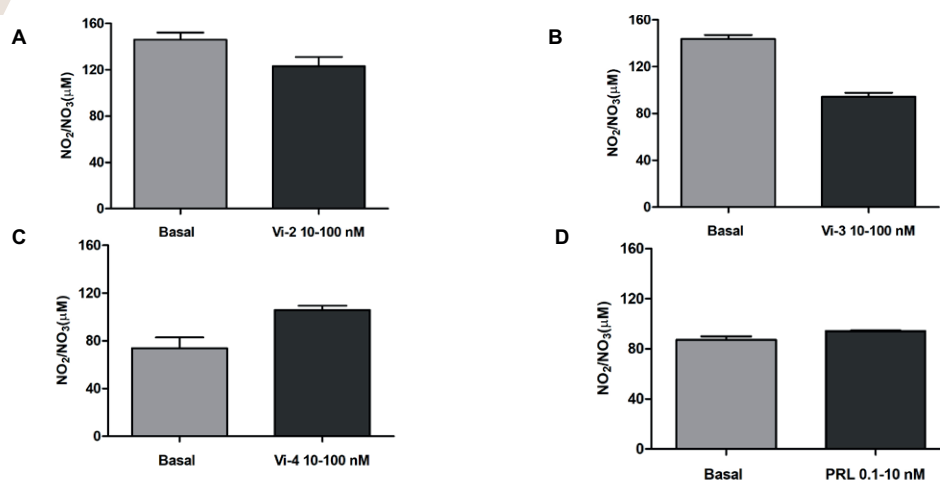


Figura 3. Registro representativo de producción NO (NO_2/NO_3) a partir del tratamiento con dosis crecientes y acumulativas de Vi2 (A), Vi3 (B), Vi4 (C) y PRL (D).

Las metas a corto plazo para continuar la investigación, incluyen el validar y estandarizar con mayor precisión el efecto de sustancias vasoactivas sobre los valores de la tensión de los anillos de ID, que a su vez reflejaran el grado de tonicidad muscular lisa, y con ello valorar tratamientos posteriores, incrementar el número de ensayos experimentales, el uso de bloqueadores de receptores de PRL, análisis de proteínas y estudios histológicos, para poder establecer una conclusión definitiva sobre el efecto y el papel que juegan las Vi en la motilidad y maduración intestinal.

CONCLUSIONES

Este estudio logró el establecimiento de las condiciones experimentales para el estudio fisiológico de Vi sintéticas en ID de ratones BALB/c. Los resultados preliminares del efecto sobre el músculo intestinal de las tres Vi empleadas muestran que el efecto biológico es aparentemente independiente de la concentración. El péptido Vi2 fue el único capaz de producir relajaciones sostenidas. Por otro lado, tanto Vi3 como Vi4, generaron ligeras contracciones en las primeras dosis administradas y relajaciones no sostenidas en las dosis siguientes. Asimismo, la hormona precursora, PRL, careció de efectos en la ventana de tiempo y concentraciones evaluada. Finalmente, los niveles de NO para las Vi sintéticas estudiadas, sugiere un mecanismo de acción independiente a la vía de NO para Vi2 y Vi3; en tanto que para Vi4, el incremento en la concentración de NO con respecto al nivel basal, apunta a un mecanismo dependiente de NO para dicho péptido. La continuación de estos estudios, permitirá confirmar dichas propuestas y plantear un mecanismo de acción específico al realizar el análisis de otros marcadores celulares. Los resultados de este, y futuros trabajos en el grupo de investigación, permitirán valorar las implicaciones clínica de las Vi.

BIBLIOGRAFÍA

ABRAMOVICH, D. R., GARDEN, A., JANDIAL, L., AND PAGE, K. R. (1979). Fetal swallowing and voiding in relation to hydramnios. *Obstet. Gynecol.*, 54, 15.

- CLAPP, C., ARANDA, J., GONZÁLEZ, C., JEZIORSKI, M. C., & DE LA ESCALERA, G. M. (2006). Vasoinhibins: endogenous regulators of angiogenesis and vascular function. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 17(8), 301–307.
- GARCÍA, C., ARANDA, J., ARNOLD, E., THÉBAULT, S., MACOTELA, Y., LÓPEZ-CASILLAS, F., ... CLAPP, C. (2008). Vasoinhibins prevent retinal vasopermeability associated with diabetic retinopathy in rats via protein phosphatase 2A-dependent eNOS inactivation. *Journal of Clinical Investigation*, 118(6), 2291–2300.
- GOFFIN, V., BOUCHARD, B., ORMANDY, C. J., WEIMANN, E., FERRAG, F., TOURAINE, P., ... KELLY, P. A. (1998). Prolactin: A hormone at the crossroads of neuroimmunoendocrinology. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 840, 498–509.
- GONZÁLEZ, C., PARRA, A., RAMÍREZ-PEREDO, J., GARCÍA, C., RIVERA, J. C., MACOTELA, Y., ... CLAPP, C. (2007). Elevated vasoinhibins may contribute to endothelial cell dysfunction and low birth weight in preeclampsia. *Laboratory Investigation*, 87(10), 1009–1017.
- HEALY, D. L., S. RATTIGAN. (1980). Prolactin in human milk: correlation with lactose, total protein, and alpha-lactalbumin levels.
- KHURANA, S., LIBY, K., BUCKLEY, A. R., & BEN-JONATHAN, N. (1999). Proteolysis of human prolactin: Resistance to cathepsin D and formation of a nonangiostatic, C-terminal 16K fragment by thrombin. *Endocrinology*, 140(9), 4127–4132.
- KIM YN, KIM HK, WARDA M, KIM N, P. W., & PRINCE ADB, JEONG DH, LEE DS, KIM KT, H. J. (2007). Toward a better understanding of preeclampsia: comparative proteomic analysis of preeclamptic placentas. *Proteomic Clin Appl*, 1, 1625–1636.
- LEAÑOS-MIRANDA, A., MÁRQUEZ-ACOSTA, J., CÁRDENAS-MONDRAGÓN, G. M., CHINOLLA-ARELLANO, Z. L., RIVERA-LEAÑOS, R., BERMEJO-HUERTA, S., ... ULLOA-AGUIRRE, A. (2008). Urinary prolactin as a reliable marker for preeclampsia, its severity, and the occurrence of adverse pregnancy outcomes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 93(7), 2492–2499.
- LOLIS, D., K. K. (1977). "Comparative study of amniotic fluid and maternal blood serum human placental lactogen in normal and prolonged pregnancies. *Am J Obstet Gynecol*, 128(7), 724–726.
- M., I., E., M., H., T., J., B., & P., G. (2016). Reducing the maternal dietary intake of indigestible and slowly absorbed short-chain carbohydrates is associated with improved infantile colic: A pilot study. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 62(4), 649.
- OHKUCHI, A., HIRASHIMA, C., TAKAHASHI, K., SUZUKI, H., MATSUBARA, S., & SUZUKI, M. (2013). Onset threshold of the plasma levels of soluble fms-like tyrosine kinase 1/placental growth factor ratio for predicting the imminent onset of preeclampsia within 4 weeks after blood sampling at 19–31 weeks of gestation. *Hypertension Research*, 36(12), 1073–1080.
- PÉREZ, J. (2010). Fisiología De La Prolactina. *Instituto de Investigaciones Biomédicas A. Sols, CSIC/UAM*, 2–14.
- SHIN S, H, REIFEL C, W. (1981). Adenohypophysis Has an Inherent Property for Pulsatile Prolactin Secretion. *Neuroendocrinology*, 32, 139–144.
- TENORIO LÓPEZ, F. A., DEL VALLE M, L., & PASTELÍN H, G. (2005). Validación de un método analítico espectrofotométrico para la cuantificación de metabolitos estables de óxido nítrico en fluidos biológicos. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, 36(1), 31–41.
- TRIEBEL, J., BERTSCH, T., BOLLHEIMER, C., RIOS-BARRERA, D., PEARCE, C. F., HÜFNER, M., ... CLAPP, C. (2015). Principles of the Prolactin/Vasoinhibin Axis. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, aipregu.00256.2015.

SINTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE CRISTALES TERMOLUMINISCENTES DE LiF DOPADOS CON TIERRAS RARAS POR EL MÉTODO DE PRECIPITACIÓN

Arizbeth Vianey Andrade Lobatón¹ y Miguel Ángel Vallejo Hernández²

RESUMEN

El LiF es un haluro alcalino ampliamente utilizado en la estimación de la dosis de la radiación. En varios estudios se encontró que al impurificar el LiF con Mg y Ti se mejoran sus propiedades como dosímetro termoluminiscente. Los estudios de este material culminaron en la síntesis del TLD 100, el cual se toma como referencia en la dosimetría termoluminiscente. Como aportación a estos estudios, en este trabajo se presenta la síntesis del LiF impurificado con Ce^{3+} por el método de precipitación. Las muestras de $\text{LiF}:\text{Ce}^{3+}$ fueron caracterizadas mediante las técnicas de UV-Vis, Fotoluminiscencia (PL) y se estudió la curva de brillo termoluminiscente. Como resultado se comprobó la presencia del ión en la matriz y se presentó una mayor respuesta termoluminiscente debida a la incorporación del Ce^{3+} comparada con el material intrínseco. Se presentó un comportamiento lineal en el intervalo comprendido entre 0.5 y 1.75 Gy.

ABSTRACT

LiF is an alkaline halide widely used in the estimation of radiation dose. In several studies it was found that by impurifying the LiF with Mg and Ti their properties are improved as a thermoluminescent dosimeter. Studies of this material culminated in the synthesis of TLD 100, which is taken as a reference in thermoluminescent dosimetry. As a contribution to these studies, this work presents the synthesis of LiF doped with Ce^{3+} by the precipitation method. The $\text{LiF}:\text{Ce}^{3+}$ samples were characterized by UV-Vis, Photoluminescence (PL) and the thermoluminescent brightness curve. As a result, the presence of the ion in the matrix was verified and a greater thermoluminescent response due to the incorporation of Ce^{3+} compared to the intrinsic material was observed. A linear behavior in the range between 0.5 and 1.75 Gy was present.

Palabras Clave: Termoluminiscencia, defectos cristalinos, centros de color, dosimetría, tierra rara.

INTRODUCCIÓN

En 1940 Daniells estudio y desarrolló LiF impurificado con Mg y Ti para la dosimetría de rayos-X sin atraer atención. Hasta años posteriores, Cameron *et. al* retoma el estudio e impulso su desarrollo comercial con ayuda de la compañía estadounidense Harshaw⁴. El TLD-100 es el nombre comercial elaborado por Harshaw, de fórmula química $\text{LiF}:\text{Ti},\text{Mg}$ el cual es empleado como dosímetro de radiación. Estos materiales trabajan bajo el fenómeno físico de termoluminiscencia, el cual se define como la emisión de luz de un aislante o semiconductor cuando es calentado debido a una irradiación previa¹ y como principal aplicación existen la detección de radiación y caracterización de materiales.

La respuesta termoluminiscente puede mejorarse al introducir impurezas, tales como las tierras raras, debido a que las tierras raras tienen capas internas ocupadas pero no llenas que introducen nuevos niveles discretos de excitación por debajo o arriba de las bandas normalmente llenas del cristal huésped³. Y es entonces cuando las transiciones electrónicas correspondientes a distintas configuraciones electrón-spin de los átomos de las tierras raras dan lugar a líneas similares a las obtenidas de átomos aislados.

Considerando lo anterior, el objetivo de este trabajo es sintetizar cristales de $\text{LiF}:\text{Ce}^{3+}$ mediante el método de precipitación para la estimación de dosis de una fuente de rayos X.

MÉTODOS Y MATERIALES

Se prepararon soluciones acuosas de LiCl y NH_4F en proporciones estequiométricas (1:1) para obtener 5 gramos de cristales de LiF puros y activados con Ce^{3+} . Los moles equivalentes a esa cantidad en peso para los reactivos precursores y las cantidades a adicionar de Ce^{3+} en peso para las distintas concentraciones de activador; 0.02%, 0.04%, 0.06%, 0.08% y 0.1%, se muestran en la tabla 1.

$$\text{NH}_4\text{F}_{(\text{ac})} + \text{LiCl}_{(\text{ac})} \rightarrow \text{LiF}_{(\text{s})} \downarrow + \text{NH}_4\text{Cl}_{(\text{ac})}$$
$$n\text{CeCl}_3 = \frac{((0.01)(\text{concentración Ce})(n \text{ LiF}))}{1 - ((0.01)(\text{concentración Ce}))} \quad (1)$$

Tabla 1. Resumen de las cantidades de reactivos utilizadas en la síntesis de los cristales de LiF

Masa (gramos)	Ce^{3+}	Li^+	F^-
Concentración Ce^{3+} (% mol)			
0 (puro)	0	8.1735	7.1332
0.02	0.00937		

0.04	0.0195		
0.06	0.029		
0.08	0.041		
0.1	0.043		

Se siguió el método de síntesis de precipitación, debido a su eficacia y bajo costo. Posterior a la disolución por separado, y constante agitación, en vasos de precipitados, de las cantidades de Cloruro de Litio granular (LiCl, J.T. Baker®), cristales de Fluoruro de amonio (NH₄F, J.T. Baker®) y Cloruro de Cerio trivalente (CeCl₃, Sigma Aldrich®) en 50 ml de agua tridestilada (uso de vaso de precipitado de plástico para el reactivo NH₄F), se mezcló por goteo el agente dopante al LiCl, al término del mezclado se mantuvo la agitación por 30 minutos más y un posterior reposo del mismo tiempo. Para la adición del NH₄F se realizó la misma operación. El precipitado obtenido se filtró y lavo repetidamente con agua tridestilada para evitar contaminantes no deseados, el proceso de secado fue por 4 horas a 70 °C en un horno modelo ED23 (Binder Inc., NY, USA).

Por último se hicieron pastillas de 0.0337 gr para la caracterización del material.

Los técnicas de caracterización usadas fueron: UV-Vis, Termoluminiscencia (TL) y Fotoluminiscencia (PL); los resultados se muestran en la siguiente sección. Para observar la respuesta TL a diferentes dosis de radiación, se hicieron varias disparos con tubo periapical de radiación X (25, 50, 75, 100 y 125), equivalentes a 0.5, 1, 1.25, 1.50 y 1.75 Gy, respectivamente.

RESULTADOS

El rendimiento de la reacción no fue del 100 %, la pérdida de material se atribuye principalmente a la cantidad de lavadas ya que se han reportado contaminaciones externas y éstas se eliminan incrementando la cantidad de ciclos en el proceso de lavado^{10,11}. En la tabla 2 se reporta la cantidad en gramos de producto obtenido.

Tabla 2 Cantidades de material obtenido.

Sustancia	Cantidad obtenida (g)
LiF puro	1.9694
LiF:Ce 0.02%	2.6677
LiF:Ce 0.04%	2.6798
LiF:Ce 0.06%	3.5509
LiF:Ce 0.08%	3.8499
LiF:Ce 0.1%	3.7152

En la ilustración 1, se muestra el espectro de UV-Vis de las distintas muestras y, en el mismo, observamos como la adición de Ce³⁺ a los cristales de LiF fue exitosa, al compararlo con el espectro del compuesto puro, ya que se observa una banda de absorción en los 280 nm, la cual es característica de la transición 4f¹ a 5d¹ del Ce³⁺.⁶

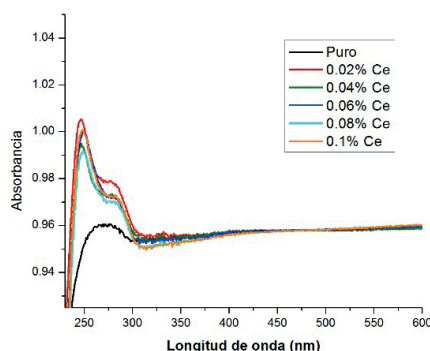


Ilustración 1. Espectro UV-Vis para todas las muestras.

Para la técnica de TL se utilizó el equipo HARSHAW TLD 3500 con una rampa de temperatura de 10°C/s y un precalentado a 50 °C por 10 s. Para asegurar que las pastillas estén libres de radiación se hace el borrado del material, el cual consiste en un tratamiento térmico a 400 °C por 2 horas y 100 °C por una hora en una mufla Terlab®; operación realizada antes de cada ciclo de irradiación y lectura. En la ilustración 2 se observa y comprueba la adición exitosa de Ce³⁺ en el anfitrión y comparada con la curva del mismo de forma pura, al existir una tendencia creciente de la respuesta termoluminiscente conforme el %mol Ce³⁺ aumenta, con un máximo en la mayor concentración Ce³⁺, i.e. 0.1% (T≈138°C). Esto es, la presencia de Ce³⁺ aumenta los sitios y/o trampas donde los electrones quedan atrapados después de la irradiación y al aplicarles calor, se les da la energía suficiente para liberarse y recombinarse a la banda de valencia emitiendo un fotón, el cual es medido para cuantificar la dosis absorbida del dosímetro.

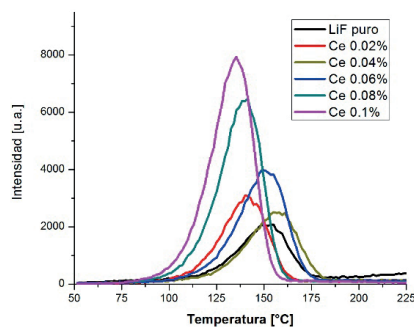


Ilustración 2. Espectro de TL para todas las muestras (Dosis: 50 disparos, 1Gy).

La respuesta termoluminiscente cuando se aplican distintas cantidades de dosis se muestra en la ilustración 3. Se observa un comportamiento lineal en la respuesta TL conforme aumenta la dosis aplicada de rayos X, comprobado con un valor de regresión lineal (R^2) de 0.9757. La linealidad dosis-respuesta es una propiedad deseada en dosimetría termoluminiscente cuando se desea cuantificar niveles de dosis en protección radiológica.

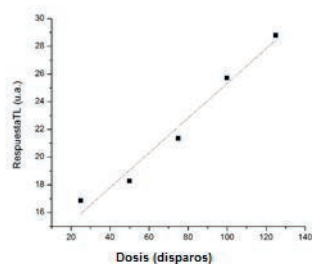


Ilustración 3. Respuesta TL vs diferentes dosis de radiación.

Al observar la curva de PL para todas las muestras (ilustración 4) se observa que, para una longitud de onda absorción característica de Ce^{3+} de 345nm⁶ con bandas de emisión sobre los 525 nm justificadas por una transición electrónica del orbital-spin $5d^1$ a $4f^1$ ^{6,7}. Es de suma importancia, resaltar que la matriz cristalina de LiF presenta una banda de emisión en los 525 nm debido a la formación de centros de color (F_3^+) por lo cual las bandas de emisión mostradas en los espectros PL podrían ser sean tanto de la transición electrónica $5d^1$ a $4f^1$, característica del Ce^{3+} , como a los centro de color (F_3^+) intrínsecos en la matriz cristalina de LiF.

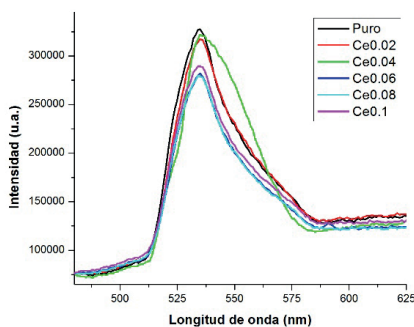


Ilustración 4 Espectro PL para todas las muestras con longitud de onda de excitación 345nm correspondiente al Ce^{3+} y centros de color F_3^+ de la matriz.

CONCLUSIONES

Se logró la síntesis del material deseado y de acuerdo a la evidencia demostrada, el material puro es un buen candidato para el uso de dosímetro termoluminiscente.

La respuesta TL del material se incrementa tras ser activado con iones de Ce^{3+} . Sin embargo, los espectros de emisión muestran bandas características similares lo que podría dar lugar a un efecto de reatrapamiento importante y minar con esto la respuesta TL.

Usando un rango de dosis comprendido entre 0.5 y 1.75 Gy presenta una alta linealidad por lo que es ideal para la detección de radiación X.

AGRADECIMIENTOS

A todos los miembros de la DCI que con su asesoramiento, equipo e instalaciones permitieron la elaboración efectiva del proyecto; de manera enfática, al Dr. Miguel Vallejo por la oportunidad y conocimiento sobre el tema, al Dr. Pablo Cerón y al M. en C. Esteban Rivera que de manera desinteresada y amable brindaron la amplitud de su conocimiento para el avance de mi conocimiento en los temas referentes. A los compañeros del proyecto paralelo, en

la modalidad de “ideas creativas” y al compañero de proyecto Víctor Hugo, que con sus risas y formas alegres de ser, hicieron los días de trabajo arduo, muy amenos e inolvidables. Al compañero tesista de Ingeniería en Física, Pedro Luis Márquez Aguilar, que brindó su apoyo en el uso de los softwares requeridos para este trabajo.

BIBLIOGRAFIA

Libros

1. Furetta-Shan Weng (1998). *Operational Thermoluminescence Dosimetry*, Singapore: World Scientific Editorial.
2. Amézquita López, Fernando (2004) *Fundamento de espectroscopia aplicada a la instrumentación química*, Guanajuato, Gto.: Universidad de Guanajuato.
3. Leverenz, H.W. (1950). *An introduction to luminescence of solids*. New York: Wiley Editorial

Artículos en línea

4. Manveer Singh, P.D. Sahare (2012) “Redox reactions in Cu-activated nanocrystalline LiF TLD phosphor” en *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*. Consultada en: <http://www.elsevier.com/locate/nimb>
5. P. Bilsy y B. Marzewska (2016). “Fluorescent detection of single tracks of alpha particles using lithium fluoride crystals” en *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*. Consultada en: <http://www.elsevier.com/locate/nimb>
6. Yuhang Zhang, Desheng Li, Edwin Yue Bun Pun, Xin Zhao , Hai Lin (2017). “Cerium and terbium ions doped strontium aluminosilicate polycrystalline phosphors” en *Journal of Luminescence* Consultada en: www.elsevier.com/locate/jlumin
7. M.S. Dhlamini, G.H. Mhlongo, H.C.Swart, K.T.Hillie, “Energy transfer between doubly doped RE³ in SiO₂ nanoparticles” *J. Lumin.* 131(2011)790–794. Consultada en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022231310005247?via%3Dihub>
8. R.A. Rodríguez-Rojas, E. De la Rosa-Cruz, L.A. Díaz-Torres, P. Salas, R. Meléndrez, M. Barboza-Flores, M.A. Meneses-Nava, O. Barbosa-García (2003) “Preparation, photo- and thermo-luminescence characterization of Tb³⁺ and Ce³⁺ doped nanocrystalline Y₃Al₅O₁₂ exposed to UV-irradiation” en *Optical Materials*. Consultada en: www.sciencedirect.com
9. Fangli Yuan, Hojin Ryu (2003) “Ce-doped YAG phosphor powders prepared by co-precipitation and heterogeneous precipitation” *Materials Science and Engineering*. Consultada en: www.elsevier.com
10. Numan Salah, Saeed S. Babkair, y Ameer Azam (2013) “Color Centers Formation in Lithium Fluoride Nanocubes Doped with Different Elements” *Hindaway*. Consultada en: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/872074>
11. Miguel A. Vallejo *et al* (2016) “Effect of Crystal Size and Ag Concentration on the Thermoluminescent Response of Pure and Ag-Doped LiF Cubes” *World Scientific Publishing Company*. Consultada en: <http://www.worldscientific.com/doi/abs/10.1142/S1793292016500417>

A FURTHER SEARCH FOR GALACTIC STARS WITH DOUBLE RADIO LOBES

Braulio Arredondo Padilla¹ and Heinz Andernach²

RESUMEN

Se sabe de más de mil estrellas en nuestra galaxia que emiten en ondas de radio, pero no se han encontrado estrellas normales que posean radiolóbulos similares a los de las radiogalaxias. Intentos recientes nuestros y de otros autores de encontrar tales objetos no han sido concluyentes. Aquí presentamos una nueva búsqueda de radioestrellas de doble lóbulo en dos muestras recientes de estrellas espectroscópicas: más de 20,000 enanas blancas del *Sloan Digital Sky Survey* (SDSS) DR12, y 2,540,000 estrellas del *Large Sky Area Multi-Object Fiber Spectroscopic Telescope* (LAMOST). Una búsqueda de pares de fuentes del rastreo *Faint Images of the Radio Sky at Twenty Centimeters* (FIRST) a 1.4 GHz con una simetría moderada respecto a dichas estrellas, resultó en sólo 4 candidatos, confirmando que deben ser extremadamente raras. Una comparación con el SDSS reveló que un 16 por ciento de los espectros LAMOST pueden ser afectados por clasificaciones erróneas. Redescubrimos la radiogalaxia gigante J0927+3510 y proponemos aquí un huésped diferente, más distante, sugiriendo que su tamaño en radio alcanza los 2.7 Mpc.

ABSTRACT

Over a thousand stars in our Galaxy have been detected as radio emitters, but no normal stars are known to possess radio-emitting lobes similar to radio galaxies. Several recent attempts by us and other authors to find such objects remained inconclusive. Here we present a further search for double-lobed radio stars in two large samples of spectroscopic stars: over 20,000 white dwarves from the *Sloan Digital Sky Survey* (SDSS) DR12, and 2.5 million stars from the *Large Sky Area Multi-Object Fiber Spectroscopic Telescope* (LAMOST). These were cross-matched with sources from the *Faint Images of the Radio Sky at Twenty Centimeters* (FIRST) survey at 1.4 GHz to look for source pairs straddling the stars with moderate symmetry about the star. We found only four promising candidates for double-lobed radio stars, confirming they must be extremely rare. By comparison with SDSS, we inferred that about 16 per cent of LAMOST spectra may have erroneous classifications. We also rediscovered the giant radio galaxy J0927+3510 and propose a different, more distant host, suggesting a much larger radio size of 2.7 Mpc.

Keywords: radio surveys, radio stars, giant radio galaxies.

INTRODUCTION

The first "discrete" radio sources found in the late 1940s were assumed to be "radio stars". By the early 1960s it was clear that virtually all are extragalactic. Apart from the detection of the Sun as a radio emitter, independently by Reber and Hey in 1944, it was not until 1970 that Galactic stars were detected in radio (Hjellming 1988). The latest compilation of radio-emitting stars (Wendker 2001) lists 1128 detected stars, half of which are located within 15° from the Galactic plane, and only 197 lie beyond 30° from it. An inspection by one of us (HA) of the ~ 120 of the latter stars that are covered in the FIRST survey revealed ~ 25 point sources, but not a single radio double.

The radio emission of all these stars must be due to rather violent processes, since the flux of the quiet Sun is well below the detection limit of even the next-generation radio telescopes. Moreover, the radio structure of the vast majority of these stars is unresolved, except for Herbig-Haro (HH) objects around newly born stars and the so-called microquasars (MQs, Mirabel and Rodríguez 1999), so far the only known stars with double lobes. Most HH host stars are not seen in the optical while MQs all have dark companions (black holes or neutron stars) causing an ejection of radio lobes via mass donation from the visible star to the dark companion, creating an accretion disk around the latter. Both, HHs and MQs, are close to the Galactic plane, and MQs are also copious X-ray emitters.

The search for further radio-emitting stars was motivated by the various data releases of the 1.4-GHz FIRST radio survey (1995–2015) eventually covering one quarter of the sky at an angular resolution of $5.4''$ (Helfand, White & Becker 2015). Helfand et al. (1999) searched for radio point sources in either bright or nearby stars, not finding any radio double sources. Kimball et al. (2009) searched for radio emission of fainter stars ($15 < i < 19.1$), only finding 112 unresolved sources, a number compatible with chance coincidence. These authors also reported another 76 stars with complex radio emission, but required the presence of a FIRST radio source within $1''$ from the star, thus excluding the possibility of the presence of double radio lobes with an extinct radio nucleus coincident with the star.

Soon after the launch (in late 2013) of the citizen science project "Radio Galaxy Zoo" (RGZ, radio.galaxyzoo.org) aimed at the identification of complex FIRST radio sources on images of the WISE mid-infrared survey (later followed by AllWISE; Cutri et al. 2013), its volunteers occasionally reported double radio sources straddling bright stars. One striking example was FBQS J170008.6+291904, the core of a $2.63''$ wide radio triple, identified by White et al. (2000) as a $r=16.5^m$ spectroscopic star. However, the active galaxy nucleus (AGN) reveals itself as an AllWISE source with non-stellar colors, typical for an AGN: $W12, W23, W34 = +0.58, +2.21, +1.5$, yet unreported in literature. Moreover, the AllWISE position is $\sim 0.2''$ from the FIRST position, while the star is $0.5''$ away from the FIRST position, suggesting that a background AGN within $0.5''$ of the star might be the real host.

One of us (Andernach 2015) cross-matched the SAO and UCAC4 stars catalogs to search for FIRST radio sources straddling the stars within $30''$ distance and with moderate symmetry, resulting in five stars brighter than $V=11$ mag. The suspected radio lobes are often slightly extended along the axis connecting the two radio sources, suggesting an ejection from the star. Unfortunately these stars are too bright to allow an AGN to outshine the stellar emission in the WISE mid-IR bands as for FBQS J170008.6+291904 above. All five objects have steep radio spectra and some have linear polarization detected, both rather typical features for distant radio galaxies. Moreover, the location of the stars near the axis of double radio sources of that size is entirely compatible with chance coincidence. Later Jimenez Valencia and Andernach (2015) searched for such double-lobed sources around stellar objects in the 2MASS Point Sources Catalog finding no convincing candidate. Ortiz Martínez and Andernach (2016) searched for radio doubles around 878,031 spectroscopic stars from SDSS DR12, but among their best three candidates, only a single one

(SDSS J132941.25+151021.8) has AllWISE colors compatible with a star. The vast majority of candidate alignments of stars and double radio sources can be explained by faint galaxy hosts seen in SDSS, very close to the stars. Moreover, none of the potential double-lobed radio stars found have been detected in X-rays, all lie at high Galactic latitude and most of them are of spectroscopic type F or later, properties all very different from microquasars. Here we extend this search to two large samples of spectroscopic stars, from Anguiano et al. (2017) and LAMOST DR2+DR3 (<http://dr3.lamost.org>). While SDSS generally only takes spectra of stars fainter than $\sim 18^{\text{th}}$ mag, LAMOST targets stars brighter than this, nicely complementing our previous searches for double-lobed radio stars.

METHODS AND MATERIALS

Our search for radio doubles aligned with stars made use of a FORTRAN code written by M. A. Jimenez Valencia (Univ. de Sonora, México) during a summer research project with one of us (HA) in 2015. The code (MJV in what follows) calculates for all pairs of radio sources in a given field: (a) the angular distances from the star, (b) the orientation (position angle PA) of the vector from the central object to the radio source (c) the "armlength ratio" (ALR) as the ratio of stronger-to-weaker lobe distance from the star, (d) the difference between the two position angles (the "misalignment" or bending angle, or DPA), and (e) the ratio of their integrated flux densities as listed in the FIRST catalog, i.e. the flux ratio, FLR, in the sense of longer-to-shorter lobe flux. In the present work we concentrated on the most symmetric and aligned objects, with ALR and FLR closest to unity and DPA closest to 0° . For our search we selected the compilation of 20247 confirmed white dwarf (WD) stars by Anguiano et al. (2015), as well as the 2.95 million spectra of spectroscopic stars contained in DR2 and DR3 of LAMOST (Cui et al. 2012). Using TOPCAT (Taylor 2013) we reduced the latter number to 2.54 million, by keeping only one of all duplicates within 2.5", assuming these to be repeat spectra. We then extracted FIRST radio sources around these stars, and considered only those stars with two or more matches within a radius of 60".

RESULTS

Serendipitous rediscovery of a giant radio galaxy

The WD catalog by Anguiano et al. (2015) has 151 WDs with two or more FIRST sources within 60". Applying the MJV code to these sources only a single WD (SDSS J092738.01+351126.4) survived our criteria for modest source symmetry with respect to the star position. This source pair consists of a compact FIRST source 13.5"W and a diffuse one 18"E of the WD. As the latter is listed in the FIRST catalog with a 28% probability of being a sidelobe, we inspected the surroundings of the pair, which turned out to be real, and in fact being the NW lobe of the giant radio galaxy (GRG) J0927+3510 as reported by Machalski et al. (2001) who proposed the $r'=21.12$ galaxy SDSS J092750.59+351050.7, undetected in AllWISE, as the GRG host. However, in our search for the most likely host we found SDSS J092749.75+351051.7, $r'=23.09$, with AllWISE colors of $W12, W23=+0.27, +3.4$. The previously proposed host has PanSTARRS PSFmags of $gri=22.23, 21.86, 21.55$ (Flewelling et al. 2016), and is undetected in z and y, while our proposed host has $rizy=21.94, 21.61, 20.91, 20.67$. We retrieved the 8.46-GHz VLA radio image of Machalski et al. (2006) from the VLA archive and found that our proposed host coincides with a 0.17-mJy radio core, at least 5 times the rms noise in the image (0.03 mJy/beam), while the host proposed earlier is undetected at 8.46 GHz. The radio core position quoted in their table 2 does not coincide with either of the two optical objects and is based on their 4.86-GHz image with only 17" resolution. Moreover, our proposed host (large cross in Fig. 1) falls decidedly closer to the geometric center of the two inner hotspots than that proposed earlier (small cross E of center). The estimated redshift of the previous host candidate is 0.55, while that of the one proposed here is 0.937 (Abolfathi et al. 2017). If the latter is correct, the projected radio size (5.8') of this giant is closer to 2.7 rather than 2.2 Mpc ($H_0 = 70 \text{ km s}^{-1} \text{ Mpc}^{-1}$, $\Omega_m=0.3$, $\Omega_\Lambda=0.7$). All images in this paper have north up and east to the left.

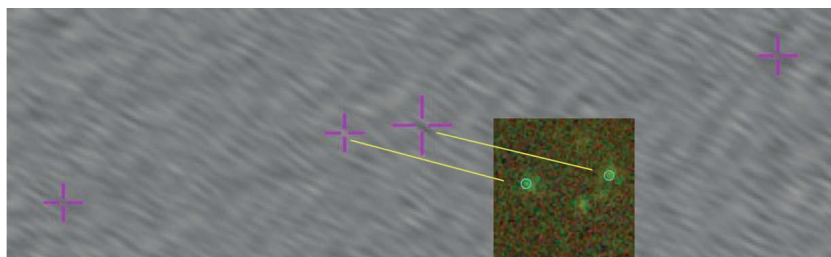


Figure 1. 8.46-GHz VLA image (112" x 34") of the inner lobes of GRG J0927+3510. The large cross at center marks our proposed host, the smaller cross left of it is that proposed by Machalski et al. (2006). Red crosses at far left and right are peak positions of the E and W inner lobes of the GRG. The inset shows a 20" x 20" yig color composite from PanSTARRS with the two proposed hosts marked with green circles.

Potential Double-lobed Radio Stars in LAMOST DR2+3

Of the 2.54 million spectroscopic stars in LAMOST DR2+3, 9052 stars have two or more (a total of 20410) FIRST sources within a radius of 60". Applying the MJV code to these we found 229 source pairs with reasonable source symmetry with respect to the stars, but we limited our visual inspection to the 78 most promising candidates with $DPA < 5^\circ$, armlength ratio between 0.5 and 2.0, and lobe flux ratio between 0.2 and 5. After inspection of SDSS images and AllWISE colors, our best candidates are shown in Figure 2. Any extragalactic host for these must be either fainter than the PanSTARRS detection limit, or located within $\sim 1''$ from the star and outshone by it.

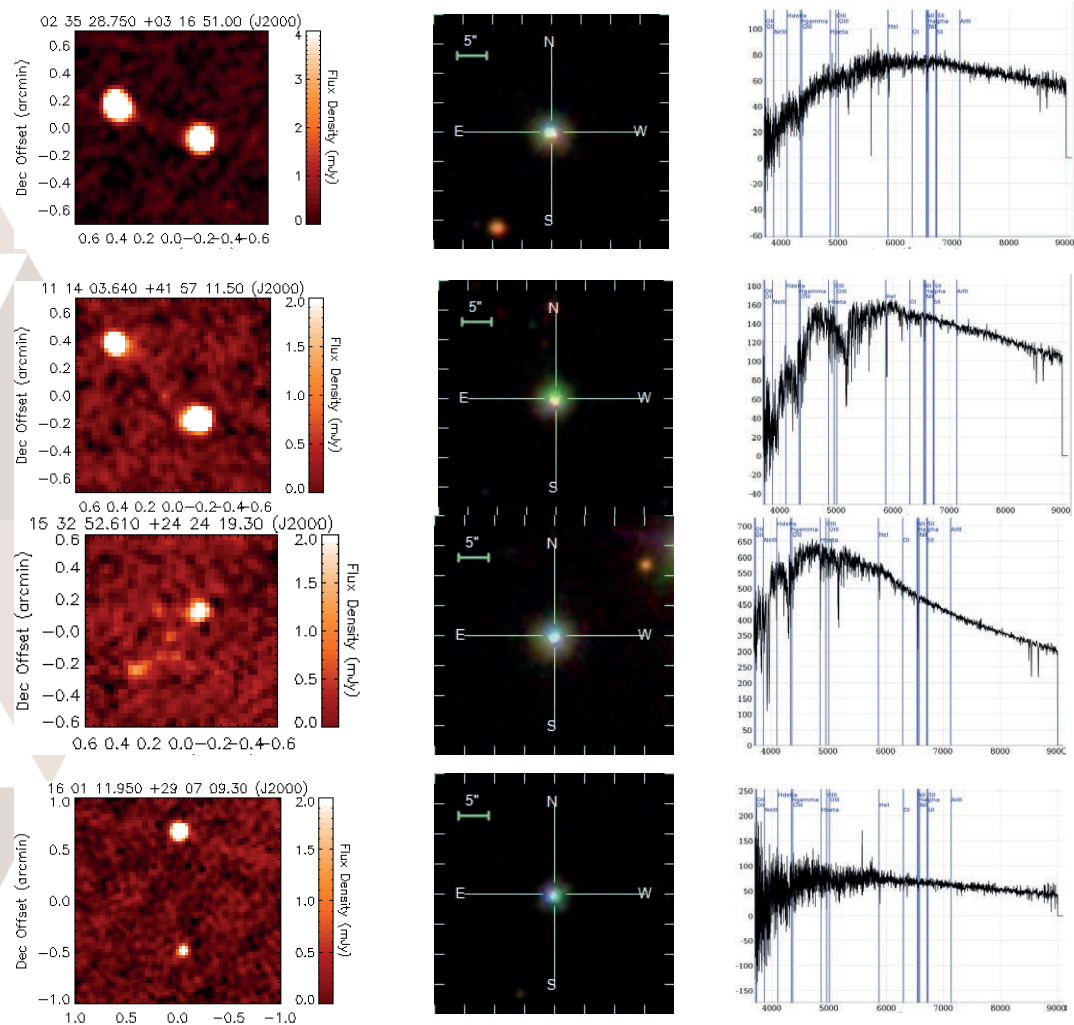


Figure 2. Our best candidates for potential double-lobed radio stars. From top to bottom we show SDSS J023528.75+031651.0, J111403.64+415711.5, J153252.61+242419.3, and J160111.95+290703.3. Each row has the FIRST image on the left, SDSS in the middle, and the LAMOST spectrum on the right.

Misclassified Objects in LAMOST and Comparison with SDSS

During our inspection of objects we found several wrongly classified spectra in LAMOST. Figure 3 shows three examples. The top row is the $z_p=1.127$ QSO FBQS J104556.8+271759, the middle and bottom rows are the galaxies SDSS J113902.61+322820.7 and SDSS J151554.31+344357.3. SDSS spectra confirm their nonstellar nature.

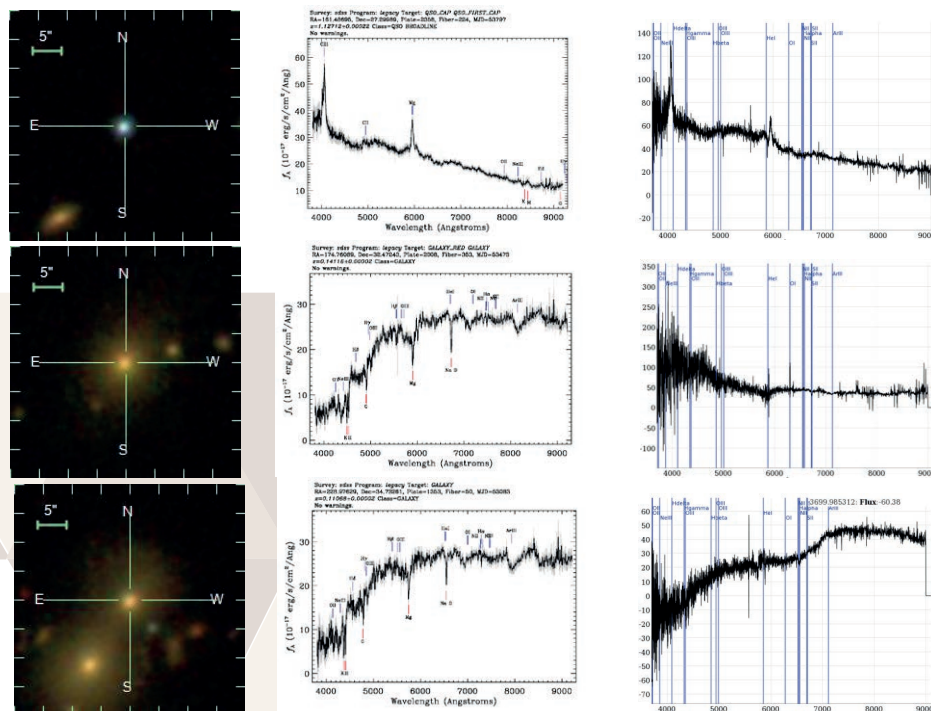


Figure 3. Misclassified objects in LAMOST. Left: SDSS image, middle & right: SDSS & LAMOST spectra.

This relatively high fraction of spectral type mismatches motivated us to crossmatch the 5,755,126 objects with spectra in LAMOST DR3 with the 4,851,200 objects with spectra in SDSS DR14, finding 46,627 matches within 3". Of these, 7875 (16.9 %) have LAMOST type *Star* and SDSS DR14 type *Galaxy* (7282) or *QSO* (593). Restricting the match radius to 1", the type mismatch remains at 16.8 % (7556/44,889), suggesting that the fraction of wrongly classified objects in the entire LAMOST survey may be similar. Of the 46,627 LAMOST-SDSS matches, 287 are classified as galaxies and 20 as QSOs in LAMOST, of which only 7 galaxies (2.2 %) are classified as stars in SDSS DR14: four are stars superimposed on galaxies and three are starforming galaxies with $cz \sim 500$ km/s.

CONCLUSIONS

In a cross-match of 2.5 million spectroscopic stars with almost one million radio sources from FIRST only very few candidates of stars with double radio lobes were found, confirming that such objects must be extremely rare. In fact, confirmation of the first such case is still pending, and requires more sensitive radio images, deeper and higher-resolution optical images, possibly from space, as well as precise proper motions and parallaxes (e.g. from GAIA) for the candidate stars. A statistical assessment of the chance probability of these alignments is hampered by the fact that many spectroscopic targets were chosen exactly because of the presence of a radio source.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to M. A. Jimenez Valencia (Univ. de Sonora, Mexico) for sharing his FORTRAN code to find radio source straddling arbitrary sky positions, and to R. Coziol and V. Gámez R. for useful comments.

BIBLIOGRAPHY

- ABOLFATHI, B., AGUADO, D.S., AGUILAR, G., ALLENDE PRIETO, C., and 323 coauthors (2017), "The 14th Data Release of the Sloan Digital Sky Survey", <https://arXiv.org/abs/1707.09322>
- ANDERNACH, H. (2015). "A new type of double-lobed radio-emitting stars?", oral pres. at 4th international TIGRE workshop. Guanajuato, see ftp://ftp.hs.uni-hamburg.de/pub/outgoing/uwolter/TIGRE-Slides_2015-16/2015-GTO
- ANGUIANO, B. REBASSA-MANSERGAS, A. GARCIA-BERRO, E., et al. (2017). "The kinematics of the white dwarf population from the SDSS DR12", *Mon. Not. Roy. astron. Soc.*, 469, 2102-2120
- CUI X.-Q., ZHAO, Y.-H., CHU, Y.-Q., LI, G.-P. and 73 coauthors (2012). "The Large Sky Area Multi-Object Fiber Spectroscopic Telescope (LAMOST)", in *Res. Astron. Astrophys.*, 12, 1197-1242
- CUTRI, R.M., SKRUTSKIE, M.F., VAN DYK, S., BEICHMAN, C.A., et al. (2003). "2MASS All-Sky Catalog of Point Sources", UMass/IPAC (<ftp://cdsarc.u-strasbg.fr/pub/cats/II/246/>)
- CUTRI, R.M., et al. (2013). "AllWISE Source Catalog", see http://wise2.ipac.caltech.edu/docs/release/allwise/expsup/sec2_1a.html
- FLEWELLING, H.A., MAGNIER, E.A., CHAMBERS, K.C., et al. (2016). "The Pan-STARRS1 Database and Data Products", <https://arxiv.org/abs/1612.05243>
- 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
- HJELLMING, R. M. (1988). "Radio Stars", in *Galactic and Extragalactic Radio Astronomy*, eds. G. L. Verschuur & K. I. Kellermann, Berlin: Springer, p. 381-438
- JIMENEZ VALENCIA, M.A., ANDERNACH, H. (2015). "Búsqueda de estrellas coincidentes con radiofuentes dobles", XX Verano de la Investigación Científica y Tecnológica del Pacífico (Delfin)
- KIMBALL, A.E., KNAPP, G.R., IVEZIC, Z., WEST, A.A., BOCHANSKI, J.J., et al., (2009). "A Sample of Candidate Radio Stars in FIRST and SDSS", *Astrophys. J.*, 701, 535-546
- MACHALSKI, J., JAMROZY, M., ZOLA, S. (2001). "The new sample of Giant radio sources I.", *Astron. Astrophys.* 371, 445-469
- MACHALSKI, J., JAMROZY, M., ZOLA, S., KOZIEL, D. (2006). "The new sample of Giant radio sources II.", *Astron. Astrophys.* 454, 85-94
- MIRABEL, I.F., RODRÍGUEZ, L.F., (1999). Sources of Relativistic Jets in the Galaxy, *Ann. Rev. Astron. & Astroph.* 37, 409-443
- ORTIZ MARTÍNEZ, A.F., ANDERNACH, H. (2016). "A Search for double-lobed radio emission from Galactic Stars and Spiral Galaxies", in *Memoria del 18º Verano de la Ciencia, Región Centro* ([arXiv.org/abs/1610.02572](https://arxiv.org/abs/1610.02572))
- TAYLOR, M., (2013). "TOPCAT: Tool for Operations on Catalogues and Tables", www.star.bris.ac.uk/~mbt/topcat
- WENDKER, H. (2001). "Catalogue of Radio Stars", available at <ftp://cdsarc.u-strasbg.fr/pub/cats/VIII/99>
- WHITE, R.L., BECKER, R.H., GREGG, M.D., et al. (2000). "The FIRST Bright Quasar Survey. II. 60 Nights and 1200 Spectra Later", in *Astrophys. J. Suppl.*, 126, 133-207

ACTIVIDAD ELECTROQUÍMICA DEL RODIO (III) EN EL LÍQUIDO IÓNICOTRIHEXIL(TETRADECIL)-FOSFONIO BIS (2-4-4 TRIMETILPENTIL)FOSFINATO (CYPHOS IL 104) SOBRE SUSTRATO DE ORO

Pacheco Díaz Diana Laura¹ y Silvia Gutiérrez Granados²

RESUMEN

Se utilizó la extracción líquido-líquido para la recuperación de iones Rh (III) a 200 y 400 mgL⁻¹ en HCl 0.1 molL⁻¹ usando soluciones de trihexil(tetradecil)-fosfonio bis (2-4-4 trimetilpentil)fosfinato (Cyphos IL 104) en queroseno con 10% de 1-decanol a 0.3, 0.4, 0.6 molL⁻¹. Después de la extracción fue determinado mediante voltametría cíclica sobre electrodo de carbón vítreo (CV) la reducción de rodio comienza a -1.5 V vs *QRE Pt* (electrodo de quasi referencia de platino) y sobre electrodo de Au que el potencial se reduce es -1.7 vs *QRE Pt* en Cyphos 104 0.6 molL⁻¹.

ABSTRACT

We used the liquid-liquid extraction for the recovery of Rh (III) ions to 200 and 400 mgL⁻¹ in HCl 0.1 molL⁻¹ using solutions of trihexil(tetradecil)-phosphonium bis (2-4-4 trimetilpentil)Phosphinate (Cyphos IL 104) in 10% of kerosene with 1-decanol to 0.3, 0.4, 0.6 molL⁻¹. After the removal was determined by cyclic voltammetry on glassy carbon electrode (CV) the reduction of rhodium begins to -1.5 V vs. *QRE Pt* (quasi-reference electrode of platinum) and on which the Au electrode potential is reduced is -1.4 vs *QRE Pt* 104 Cyphos 0.6 molL⁻¹.

Palabras Clave Rodio, líquido iónico, Cyphos IL 104.

INTRODUCCIÓN

El rodio es un metal noble de muy baja abundancia en la corteza terrestre del cual hay una gran demanda en diversos sectores industriales, particularmente en la producción de convertidores catalíticos debido a la actividad catalítica de este metal en la reducción de contaminantes atmosféricos. El complejo proceso para la extracción, purificación del rodio aunado a su escasez en la naturaleza ha incrementado notable su precio en los últimos años. Por lo que el intentar recuperar iones metálicos de alto valor comercial metales a partir de soluciones de desechos empleadas en las diversas industrias que los emplean [1].

Se han empleado varias técnicas para recuperar rodio como son: la adsorción y el intercambio iónico son las principales técnicas de recuperación/ extracción de Rodio. En el caso particular de la adsorción, esta suele realizarse sobre superficies metálicas (TiO₂, Pt) mediante electrosorción o electrodepositos [2]. El intercambio iónico es otra alternativa que ha sido explorada en la recuperación de rodio, dentro de ellas se encuentran la extracción líquido-líquido (ELL) y las técnicas electroquímicas [4,6]. En los sistemas de ELL, se ha propuesto el empleo de líquidos iónicos (LI) como alternativa a los disolventes convencionales [4,3], en base a sus propiedades particulares, como son baja presión de vapor, capacidad de coordinar libremente iones voluminosos, disolvente de diversos compuestos, tanto orgánicos e inorgánicos [3]. Específicamente, el trihexil(tetradecil)-fosfonio bis (2-4-4 trimetilpentil) fosfinato, denominado comercialmente Cyphos IL 104, ha mostrado tener buena capacidad de extracción de iones metálicos. Se ha reportado su uso en la extracción eficiente de Zn (II), Co(II), Fe(II) y Fe(III) y otros metales, en menor eficiencia como Ni(II), Cu(II), Pd(II), Rh (III) [2].

Además de las propiedades ya citadas, los líquidos iónicos presentan propiedades electroquímicas particulares, poseen alta conductividad iónica, estabilidad electroquímica, una amplia ventana electroquímica. Por lo que se es interesante aprovechar estas propiedades para promover la actividad electroquímica de medios orgánicos que tradicionalmente no son conductores [6], con la intención de obtener medios electroquímicos con amplias ventanas de trabajo, siendo posible encontrar las señales electroquímicas de los iones electroactivos presentes que no son posibles de exponer en medios acuosos [3].

El presente trabajo se centra en estudiar la factibilidad de utilizar soluciones de líquido iónico trihexil(tetradecil)-fosfonio bis (2-4-4 trimetilpentil)fosfinato (Cyphos IL 104) diluido en queroseno con 10% de 1-decanol como medio para la recuperación electroquímica de rodio en soluciones de cloruros. Primeramente, mediante la ELL del Rh (III) con Cyphos 104/H₂O, seguido por la respuesta electroquímica que presenta el Rh (III) en el medio de extracción, en electrodo de carbón vítreo (CV) como en electrodo de oro (Au).

MÉTODOS Y MATERIALES.

a) Preparación de la fase de Cyphos IL 104/H₂O

El Cyphos IL 104 posee un alta viscosidad a T=273K (800 mPa.S) a partir de esta viscosidad se puede emplear como medio electroquímico, por lo que se procede a saturar con H₂O en líquido iónico para formar la fase Cyphos IL 104/H₂O, la cual logra una viscosidad mucho menor de la de Cyphos IL 104 comercial 316.70 mPa.s y un valor experimental de conductividad de 45,55μS. Para llevar a cabo la preparación de Cyphos IL 104/H₂O. Se puso en contacto volúmenes iguales de agua desionizada y Cyphos IL 104 comercial sin purificar en agitación magnética y a calentamiento constante hasta 40°C por treinta minutos. La fase orgánica resultante se nombró Cyphos IL 104/H₂O, la cual fue retirada del agua desionizada mediante un embudo de separación, la fase Cyphos IL 104/H₂O es usada para preparar las soluciones de LI para extracción de Rh (III).

b) Preparación de fases de Cyphos IL 104|H₂O en queroseno con 10% de 1-decanol

Se prepararon tres fases orgánicas a 0.3, 0.4 y 0.6 mol L⁻¹ de Cyphos IL 104|H₂O en solución de queroseno con 10 % de 1-decanol, estas fases preparadas son analizadas electroquímicamente y posteriormente empleadas en el proceso de extracción de Rh (III).

c) Proceso de extracción y cuantificación de Rh (III).

Dos soluciones con diferentes concentraciones de Rh (III) (200 y 400 mg L⁻¹) fueron preparadas a partir de una solución estándar de 1000 mg dm⁻³ en HCl 0.1 mol L⁻¹. Estas soluciones de rodio fueron mezcladas con la fase Cyphos IL 104|H₂O en relación 1:1 de volumen en frascos de vidrio y se colocan en un agitador mecánico de ping pong (Eberbach modelo 6000) a 90 rpm durante treinta minutos. La fase orgánica y la fase acuosa fueron separados como se hizo en la preparación de la fase de Cyphos IL104|H₂O. Las fases acuosas resultantes poseen una concentración de Rh (III) agotada, mientras las fases orgánicas de Cyphos IL 104|H₂O en queroseno con 10% de 1-decanol están cargadas con Rh (III). Las fases acuosas fueron analizadas por espectroscopia de absorción atómica (AAAnalyst 200) para cuantificar la concentración restante de Rh (III), mientras que las fases orgánicas fueron usadas para el estudio electroquímico.

d) Sistema electroquímico

Los experimentos electroquímicos se realizaron en una celda de 3 mL de vidrio exclusiva para este fin, colocando 1.5 g de la fase orgánica a analizar. Con un arreglo respectivamente, utilizando como electrodos de trabajo (WE) un electrodo de carbón vítreo y el electrodo de trabajo de oro, un alambre de platino como pseudo referencia (*QRE Pt*), y como contraelectrodo otro alambre de platino. Esa celda se acopló a un potenciostato Autolab PGSTAT 101 de Metrohm.

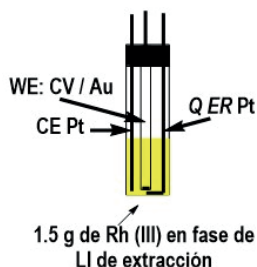


Figura 1. celda electroquímica usada en experimentación.

e) Análisis electroquímico.

Se utilizó la voltametría cíclica (VC) para evaluar las características electroquímicas tanto de las distintas fases de líquido iónico Cyphos IL 104|H₂O en queroseno con 10% de 1-decanol que se prepararon, así como el comportamiento del Rh (III) a velocidades de 10 mVs⁻¹ y 100 mVs⁻¹ presente en las mismas proveniente de la extracción líquido-líquido.

Los barridos de potencial para oro fueron: 0 V a -3.5 V, de -3.5 V a 0.8 V y finalmente de 0.8 a 0 V vs *QRE Pt*.

Para carbón vítreo (CV) se realizaron los siguientes de 0 V a -3.5 V, de -3.5 V a 3.5 V y finalmente de 3.5 a 0 V vs *QRE Pt*.

RESULTADOS

En la tabla 1 se presentan los resultados obtenidos de ELL de Rh (III) con Cyphos IL104|H₂O en queroseno con 10 % de 1-decanol. En la misma, se observan que los rendimientos de extracción a las tres concentraciones de Cyphos IL 104 seleccionadas son moderados, encontrándose mayores rendimientos de extracción cuando la concentración de rodio es de 400 mgL⁻¹.

[Rh (III)] mgL ⁻¹ inicial en HCl 0,1 molL ⁻¹	[Cyphos IL 104] queroseno con 10% de 1-decanol	[Rh (III) en Cyphos IL 104]	Rh (III) mgL ⁻¹ final en HCl 0.1 molL ⁻¹	% Ext de Rh (III) con Cyphos IL 104
200	0,3	113,32	86,68	43,34
400	0,3	111,4186	288,5814	72,14535
200	0,4	136,68	63,32	31,66
400	0,4	181,8773	218,1227	54,53067
200	0,6	152,78	47,22	23,61
400	0,6	204,79	195,21	48,8025

Tabla 1. Extracción de Rh (III) en Cyphos IL 104|H₂O en queroseno con 10% de 1-decanol.

Posterior a la ELL se procedió a analizar mediante VC los medios de extracción preparados cargados con Rh (III) en Cyphos IL 104|H₂O en queroseno con 10% de 1-decanol. En la figura 2 se presenta la VC de Rh (III) a 200 mg L⁻¹ en Cyphos IL 104 0.3 mol L⁻¹ a 10 y 100 mVs⁻¹ sobre carbón vítreo.

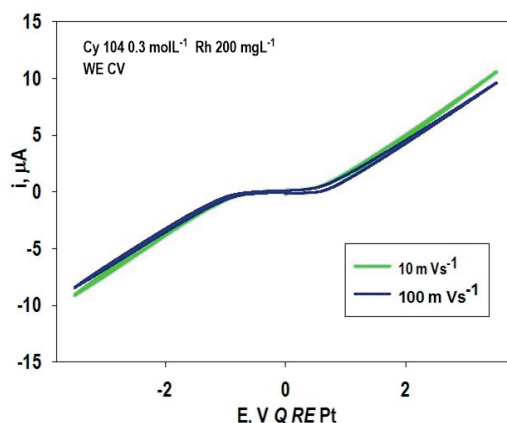


Figura 2. Voltametría cíclica de Rh (III) 200 mgL⁻¹ en 0.3 mol L⁻¹ de Cyphos IL 104|H₂O en queroseno con 10% de 1-decanol sobre electrodo de carbón vítreo a 10 y 100 mVs⁻¹ vs QRE Pt.

En la figura 3 se expone los voltamperogramas correspondientes a Rh (III) a 200 y 400 mgL⁻¹ en Cyphos IL 104|H₂O a 0.4 molL⁻¹ con una velocidad de 10 mVs⁻¹ sobre CV. Solo en el proceso de descomposición del LI se muestra respuesta electroquímica el Rh (III) a las concentraciones de estudio, esto quiere decir la concentración de 0.4 molL⁻¹ en queroseno con 10% de 1-decanol, no es suficiente para actuar como un conductor electroquímico eficiente para promover la reducción del Rh (III).

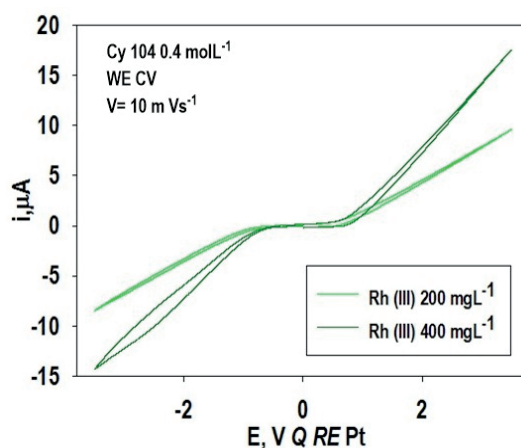


Figura 3. Voltametría cíclica de Rh (III) 200 y 400 mgL⁻¹ en 0.4 mol L⁻¹ de Cyphos IL 104|H₂O en queroseno con 10% de 1-decanol sobre electrodo de carbón vítreo a 10 mVs⁻¹ vs QRE Pt.

En la figura 4 los voltamperogramas de Rh (III) a 200 y 400 mgL⁻¹ en 0.6 molL⁻¹ de Cyphos IL 104|H₂O en queroseno con 10% de 1-decanol a 10 mVs⁻¹ en CV vs QRE Pt se aprecia que a esta concentración de líquido iónico si se puede observar la respuesta electroquímica del Rh (III) en Cyphos IL 104. Ocurriendo la reducción del rodio 1) a un potencial -1.5 V vs QRE Pt (E_{red} Rh = -1.4 vs QRE Pt). También a 0.6 molL⁻¹ de Cyphos IL 104| H₂O es posible observar la reducción del LI a -2 V vs QRE Pt y la oxidación del LI a 1.0 V vs QRE Pt.

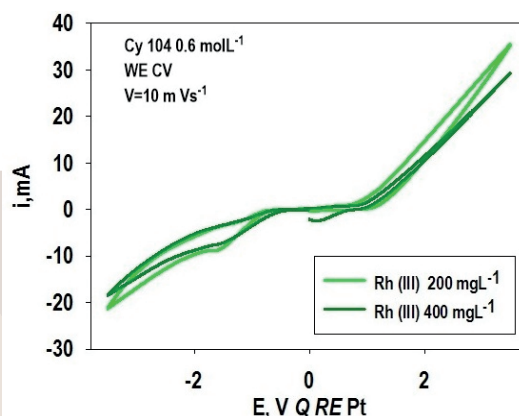
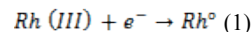


Figura 4.. Voltametría cíclica de Rh (III) 200 y 400 mgL⁻¹ en 0.6 mol L⁻¹ de Cyphos IL 104|H₂O en queroseno con 10% de 1-decanol sobre electrodo de carbón vítreo a 10 mVs⁻¹ vs QRE Pt.

Los medios de LI con Rh (III) extraído fueron analizados con CV en electrodo de trabajo de Au. En este electrodo la actividad electroquímica relevante ocurre cuando Cys 104 está a la concentración de 0.6 molL⁻¹.

En la figura 5 se muestra la VC de Rh (III) 200 y 400 mgL⁻¹ a 0.6 molL⁻¹ sobre electrodo de oro a 10 mVs⁻¹, en el cual se observa la reducción del Rh (III) a -1.7 a las dos concentraciones de Rh (III) seleccionadas. También fue posible analizar la reducción del LI a -2 V vs *QRE Pt*.

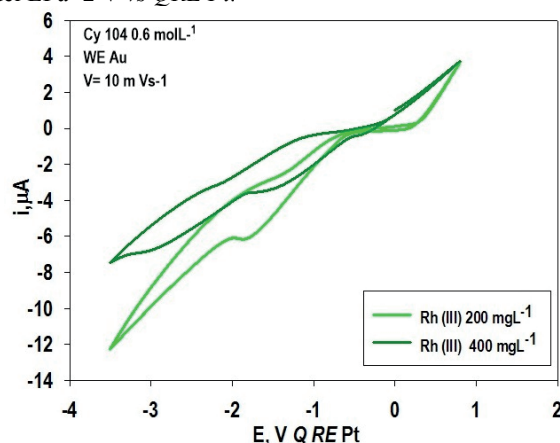


Figura 5. Voltametría cíclica de Rh (III) 200 y 400 mgL⁻¹ en 0.6 mol L⁻¹ de Cyphos IL 104|H₂O en queroseno con 10% de 1-decanol sobre electrodo de oro a 10 mVs⁻¹ vs *QRE Pt*.

Una vez que fue posible determinar la concentración a la cual se observó la actividad electroquímica de Rh (III) en Cyphos IL 104 se intentó hacer depósito de Rh (III) a potencial constante durante 60 minutos en el medio de Rh (III) 400 mgL⁻¹ en 0.6 molL⁻¹ de cyphos 104|H₂O sin obtener resultados favorables de electrodeposito sólo hasta el momento.

CONCLUSIONES

El Cyphos IL 104 ha mostrado actuar como un electrolito ion conductor eficiente a la concentración de 0.6 mol L⁻¹ para exhibir la respuesta electroquímica de Rh (III) en queroseno con 10% de 1-decanol, además se determina que a la velocidad de 10 mVs⁻¹ es posible observar tanto en CV como la reducción de Rh(III) al potencial $E = -1.5V$ vs *QRE Pt* a esta concentración de LI y en el Au.

De acuerdo con los potenciales de reducción observados, se intentó realizar el depósito de rodio a un potencial constante $E = -1.7$ vs *QRE Pt*, se muestran resultados satisfactorios de este proceso en lo que queda abierto a continuar este estudio a las condiciones óptimas para llevar a cabo el depósito de Rh (III) en el medio de Cyphos IL 104 | H₂O en queroseno con 10% de 1-decanol.

BIBLIOGRAFIA

Artículos de revista.

1. Kumari, A., Kumar Sinha, M., Kumar Sahu, S., & Dhar Pandey, B. (2015). Investigation of a novel ionic liquid, Cyphos IL 104 for the solvent extraction of mineral acids. *Hydrometallurgy*, 165, 159-165.
2. D. Cholico-González, A. Changes, G. Coté, M. Ávila-Rodríguez. 2015. *J. Molecular Liquids*, **209**, 203.
3. Latham, J., Howlett, P., MacFarlane, D., & Forsyth, M. (2011). Electrochemical reactivity of trihexyl(tetradecyl) phosphonium bis(2,4,4-trimethylpentyl)phosphinate ionic liquid on glassy carbon and AZ31 magnesium alloy. *Electrochimica Acta*, 56, 5328-5334.
4. Jayakumar, M., Venkatesan, K., & Srinivasan, T. (2008). Electrochemical behavior of rhodium (III) in 1-butyl-3-methylimidazolium chloride ionic liquid. *Electrochimica Acta*, 53, 2794-2801.
5. Kibler, L., Kleinert, M., & Kolb, D. (1999). The initial stages of rhodium deposition on Au(III). *Journal Of Electroanalytical Chemistry*, 467, 249-257.
5. Alam, M., Inoue, K., & Yoshizuka, K. (1998). Ion exchange/adsorption of rhodium (III) from chloride media on some anion exchangers. *Hydrometallurgy*, 49, 214.

EFFECTOS ANTINOCICEPTIVOS DE TILIFODIOLIDE UN COMPUESTO AISLADO DE *SALVIA TILIIFOLIA* VAH1 (LAMIACEAE)

Edgar Isaac Rojas Bedolla.¹ y Ángel Josabad Alonso Castro ².

¹ Universidad de Guanajuato, División de Ciencias Naturales y Exactas, Departamento de Farmacia, Noria Alta S/N, colonia Noria Alta, C.P: 36050, Guanajuato, Guanajuato, ei.rojasbedolla@ugto.mx

² Universidad de Guanajuato, División de Ciencias Naturales y Exactas, Departamento de Farmacia, Noria Alta S/N, colonia Noria Alta, C.P: 36050, Guanajuato, Guanajuato, angeljosabad@ugto.mx

RESUMEN

Se analizó el efecto antinociceptivo de tilifodiolide (TFD), un terpeno obtenido del extracto de acetona de las partes aéreas de *Salvia tiliifolia* Vahl. Este compuesto se evaluó a diferentes dosis (10 mg/kg, 50 mg/kg, 100 mg/kg y 200 mg/kg) en un modelo *in vivo* de dolor visceral. Su actividad antinociceptiva se comparó con la del fármaco de referencia naproxeno. Se observó un efecto dependiente de la dosis administrada para el TFD y el naproxeno. Se obtuvo la dosis efectiva 50 (DE₅₀) de 32 mg/ kg para TFD, mientras que la DE50 para el naproxeno fue de 33 mg/kg.

ABSTRACT

The antinociceptive effect of tilifodiolide (TFD), a terpene obtained from the acetone extract of the aerial parts of *Salvia tiliifolia* Vahl, was analyzed. This compound was evaluated at different doses (10 mg/kg, 50 mg/kg, 100 mg/kg and 200 mg/kg) on an *in vivo* model of visceral pain. Its antinociceptive activity was compared with that found in the reference drug naproxen. A dose-dependent effect was observed, for both, TFD and naproxen. The effective dose 50 (ED₅₀) for TFD was 32 mg/kg, whereas the ED₅₀ for naproxen was 33 mg/kg. To find a possible mechanism of action antinociceptive of the TFD it will be realized by means of the joint administration of the TFD by compounds used like inhibiting of different routes of signposting involved in the process of pain.

PALABRAS CLAVE

Salvia tiliifolia Vahl, TFD, antinocicepción, mecanismo de acción, DE₅₀.

INTRODUCCIÓN

Desde la antigüedad, varias sociedades han recurrido a la naturaleza, principalmente a plantas como fuentes médicas y de alimento. Actualmente un gran porcentaje de la población mundial, en particular países en vías de desarrollo, utilizan plantas medicinales para hacer frente a las necesidades primarias de salud. Según la OMS, el 80% de la población mundial hace uso de remedios naturales y medicinas tradicionales (Roy Chaudhury, 1992, OMS, 1993). Una de las plantas usadas en la medicina tradicional mexicana es *Salvia tiliifolia* Vahl. (Lamiaceae), la cual es conocida también con los siguientes nombres: alhelí, alhucema (Antioquia), flor de abejón, salvia, venturosa, yerba clara. Se trata de un subarbolito caracterizado por presentar una altura entre 30 y 70 cm; tallo leñoso y cuadrangular en la base con numerosas ramificaciones; hojas opuestas, enteras glandulares o rugosas, finamente dentadas. Su distribución se ha registrado en Chiapas, Chihuahua, Coahuila, Distrito Federal, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Querétaro, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz (Villaseñor y Espinosa, 1998). *Salvia tiliifolia* es empleada en la medicina veterinaria para eliminar las cataratas de los ojos en los caballos (García Cruz, 2007). Para enfermedades y padecimiento en humanos se usa para eliminar abscesos, y en el tratamiento de paperas, dolor de cabeza, para calmar los nervios (Molina-Mendoza, et al. 2012).

A pesar del incrementado enfoque en el uso de antidepresivos y otros agentes en el tratamiento de la ansiedad, las benzodiazepinas permanecen como los principales ansiolíticos en farmacoterapia debido a su eficacia, inicio rápido de acciones terapéuticas y el perfil más favorables de efectos colaterales. Algunas de las usadas como ansiolíticos son: alprazolam, clonazepam, clorazepate, diazepam, lorazepam, nordazepam, oxazepam y el prazepam. Entre estas, el clonazepam tiene un perfil muy eficaz en el tratamiento de trastornos de pánico o ansiedad generalizada, además del uso tradicional como anticonvulsivo. El hecho de que sus propiedades hipnóticas, miorrelajantes y amnésicas sean relativamente más débiles que entre las otras benzodiazepinas, le confiere un perfil de efectos secundarios mejor tolerado cuando se utiliza como ansiolítico o anticonvulsivo. (López, et., al. 2010).

METODOLOGÍA

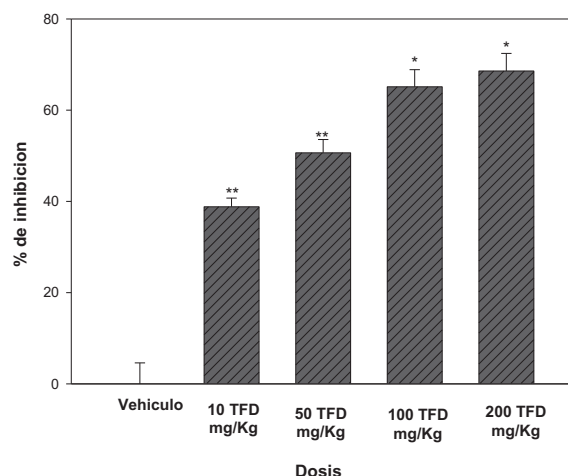
Se utilizaron distintos grupos de ratones (n=8, cada uno). En el primer grupo se les administró solución salina como vehículo (para control negativo) y a otro grupo se les administró naproxeno (control positivo) a distintas dosis (1mg/kg, 10mg/kg, 50mg/kg y 100mg/kg) por vía oral. A otros grupos de ratones se les administró distintas dosis del TFD, vía oral (10mg/kg, 50mg/kg, 100mg/kg y 200mg/kg). Una hora después se administró a cada grupo por vía intraperitoneal ácido acético al 1% (10 ml/kg) para inducir dolor visceral en los animales. Se procedió a contar el número de contorsiones de cada ratón de cada grupo. Cada contorsión es un estiramiento que tiene los ratones cuando sienten el dolor visceral. La dosis efectiva 50 se calculó mediante una regresión lineal con los datos obtenidos en los experimentos.

La prueba de evaluación del efecto sedante consiste inducir la sedación a los ratones mediante la administración con pentobarbital. Una hora antes del experimento, se usaron varios grupos de ratones a los cuales se les administró clonazepam (1.5 mg/kg p.o.) como control positivo, al segundo grupo de ratones recibieron solución

salina como vehículo que será el control negativo. A otros grupos se administró TFD a dosis de 10 mg/Kg, 50 mg/Kg y 100 mg/Kg (p.o.). Se administró pentobarbital (30 mg/kg i.p.) a todos los grupos de ratones y se contó el tiempo desde la administración del clonazepam hasta la pérdida de los reflejos y el tiempo desde la pérdida de los reflejos hasta la recuperación de los reflejos.

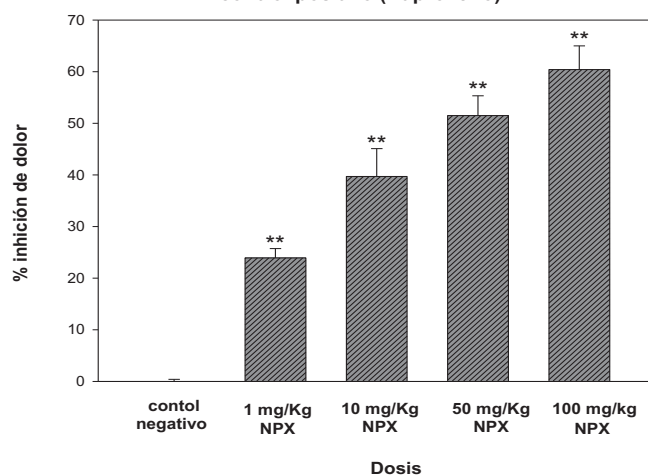
RESULTADOS

Gráfica 1. Porcentaje de inhibición de TFD



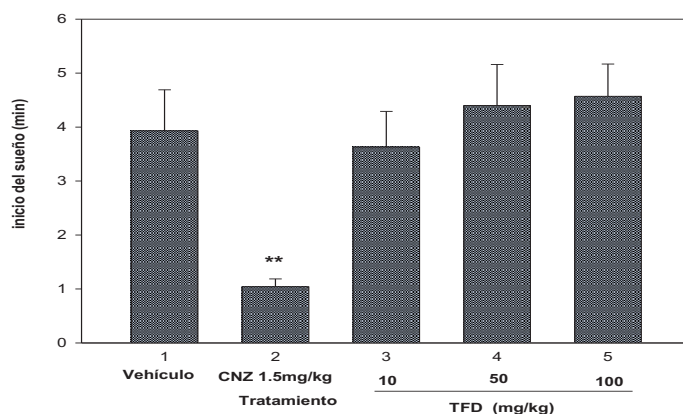
Los resultados obtenidos en la prueba de ácido acético mostraron un número promedio de 55 contorsiones para el control negativo (solución salina). Este efecto se vio disminuido conforme se aumentó la dosis de TFD administrada, como se observa en la Gráfica 1. A partir de los datos obtenidos se calculó la dosis efectiva 50 (DE₅₀) obteniendo 32mg/kg para el compuesto TFD.

Gráfica 2. % de inhibición de dolor, control positivo (Naproxeno)

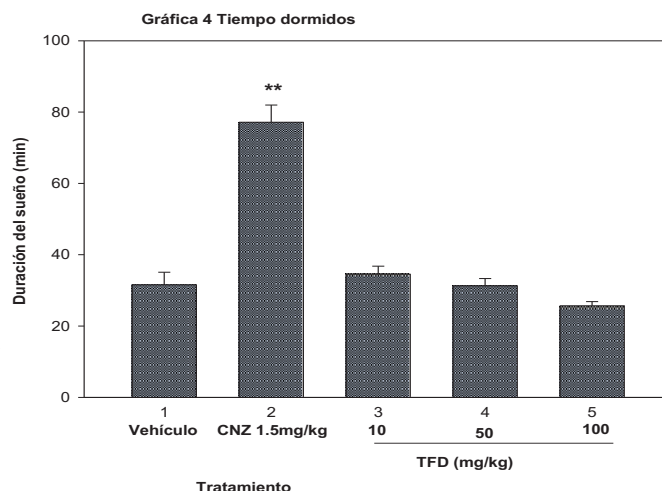


En el gráfico 2 se observa un efecto dependiente de la dosis para el naproxeno, donde se puede ver que el mejor efecto se logra en dosis de 200mg/kg. A partir de los datos obtenidos se calculó la dosis efectiva 50 (DE₅₀) del naproxeno que fue de 33 mg/kg.

Gráfico 3 Tiempo de inicio de sueño



En el gráfico 3 se muestran los resultados del compuesto TFD a las tres dosis 10 mg/kg 50mg/kg y 100mg/kg, además del control positivo (CNZ a 1.5mg/kg), donde se puede observar que TFD no induce sueño en los animales, teniendo un tiempo muy similar al empezar a dormir.



En el gráfico 4 se muestra que el compuesto TFD no tiene un efecto sedante. Caso contrario al clonazepam que si causa sueño en los roedores llegando casi a un promedio de 80 minutos.

DISCUSIÓN

La dosis efectiva del naproxeno (control positivo) fue de 33mg/kg, en el caso del compuesto TFD la DE₅₀ fue de 32mg/kg, siendo una potencia prácticamente igual y con este resultado se confirma la posible actividad antinociceptiva entre ambos compuestos. Se puede sugerir que TFD no indujo efectos sedantes.

CONCLUSIONES

El TFD mostro buena actividad antinociceptiva en un modelo de dolor visceral en ratones. Es importante señalar que la DE₅₀ del TFD resulto muy similar a la del naproxeno. El TFD no presenta efectos sedantes

BIBLIOGRAFÍA

Artículos de revista.

CRUZ GARCIA R.A. 2007. "Plantas medicinales de nueve comunidades en la frontera entre chignahuapan, ixtacamaxtitlán y aquixtla, puebla." tesis de licenciatura. universidad de chapingo. [pp. 351].

LÓPEZ VANTOUR A., AROCHE ARZUAGA A., ROMERO BESTARD J., OCAÑA FONTELA N., 2010, "Use and misuse of benzodiazepines", en medisan, Vol 14 num. 4, [pp. 555].

MOLINA MENDOZA J.L, GALVAN VILLANUEVA R., PATIÑO SICILIANO A., FERNANDEZ NAVA R., (2012). "Plantas medicinales y listado florístico preliminar del municipio de huasca de ocampo, hidalgo, méxico" en polibotanica, núm 34 [pp 239-271].

OMAR JARET ESPINOSA SOTO. (2014). "Determinación de la actividad antioxidante, antiinflamatoria y de la enzima Mieloperoxidasa con la aplicación de los extractos orgánicos de Cymbopogon citratus, Momordica charantia, Moussonia deppeana y Salvia tiliifolia en ratón. Facultad de Química Farmacéutica Biológica.: Universidad Veracruzana".

RAKSHSHANDEH H, SADEGHNIA HR, GHORBANI A. Sleep-prolonging effect of Coriandrum sativum hydro-alcoholic extract in mice. Nat. Prod. Rse. 2012;26[pp.2095–8]

VICENTE TENE., OMAR MALAGON., PAOLA VITA FINZI., GIOVANNI VIDARI., CHABACO ARMIJOS., TOMAS ZARAGOZA. (2006). "An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchipe, Ecuador. Journal of Ethnopharmacology" en Science Direct Base de datos. Vol. 111, Num. [pp. 63-81.]

Artículos en línea.

Inventario de recursos curativos en centros de expendio formales e informales: tumbes. Hugo E. Delgado Sumar. Serie: Apuntes de Medicina Tradicional N° 78 Ayacucho, marzo 1990.

VILLASEÑOR R., J. L. Y F. J. ESPINOSA G., 1998. Catálogo de malezas de México. Universidad Nacional Autónoma de México. Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario. Fondo de Cultura Económica. México, D.F.

LAS CUTÍCULAS DE NOPAL (*Opuntia ficus indica* var. *Atlixco*) Y SU ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA NATURAL

Elizabeth Flores Rodríguez¹, Lorena Vargas Rodríguez², Eva Edilia Ávila Muro³

RESUMEN

El propósito de este trabajo fue evaluar la actividad antimicrobiana de diferentes muestras de cutícula de nopal *Opuntia ficus indica* var. *Atlixco* en medio sólido LB con algunos microorganismos de interés en salud humana, alimentos y medio ambiente (*S. aureus*, *S. enteritidis* y *B. subtilis*). La técnica empleada fue difusión en agar, la cual consiste en inocular con la bacteria el medio de cultivo, posteriormente se colocaron las muestras 1) solución cuticular en discos de papel filtro esterilizados y 2) discos de cutícula, de acuerdo al ensayo a 37 °C de incubación durante 24 h. Los resultados mostraron la dificultad en la identificación de la actividad antibacteriana para la cutícula del nopal en las diferentes muestras. Por lo que, ahora se procedió a investigar sobre sus componentes grasos, extraídos con solventes de baja polaridad a) hexano y b) éter de petróleo (8 h en soxhlet). Estos componentes fueron evaluados para actividad microbiana ante *B. subtilis*. Opuesto al resultado esperado (halo de inhibición), apareció un halo de crecimiento del microorganismo en ambas muestras.

ABSTRACT

The purpose of this work was to evaluate the antimicrobial activity of different cuticle samples of *Opuntia ficus indica* var. *Atlixco* in solid medium LB with some microorganisms of interest in human health, food and environment (*S. aureus*, *S. enteritidis* and *B. subtilis*). The technique used was agar diffusion, which consists of inoculating the culture medium with the bacteria, then the samples were placed 1) cuticular solution in sterilized filter paper disks and 2) cuticle disks according to the test at 37°C incubation for 24 h. The results showed, the difficulty in identifying the antibacterial activity for the cuticle of the nopal in the different samples. Therefore, we now proceeded to investigate its fatty components, extracted with solvents of low polarity a) hexane and b) petroleum ether (8 h in soxhlet). These components were evaluated for microbial activity to *B. subtilis*. As opposed to the expected result (zone of inhibition), a growth halo of the microorganism appeared in both samples.

Palabras Clave: cutícula, actividad antimicrobiana, nopal.

INTRODUCCIÓN

La cutícula es una membrana continua lipídica extracelular en las plantas (Pighin *et al.*, 2004) la cual es sintetizada por células epidérmicas, constituye un elemento estructural esencial, de importancia funcional y ecológica debido a que es la capa más externa que interactúa con el medio ambiente (Kunst *et al.*, 2006). La cutícula, al ser una capa externa cerosa reduce la pérdida de agua y ayuda a bloquear la entrada de microorganismos patógenos como hongos y bacterias al interior de la planta; los principales constituyentes de la cutícula son cutina, suberina y ceras. La cutina se encuentra en la mayoría de las partes aéreas de la planta; la suberina está presente en las partes subterráneas, tallos leñosos y heridas cicatrizadas y, las ceras están asociadas con la cutina y la suberina (Taiz y Zeiger, 2006).

En las plantas la cutina se presenta en una proporción que varía desde 40-80% del peso, es un polímero constituido por ácidos grasos de cadena media unidos mediante enlaces tipo éster entre sí, resiste daños mecánicos y forma la estructura básica de la cutícula (Suh *et al.*, 2005). Está formada por ácidos grasos de 16 carbonos, entre los cuales el ácido 10,16-dihidroxihexadecanoico y su isómero posicional 9,16-dihidroxihexadecanoico, constituyen los principales componentes (Bessire *et al.*, 2007), una pequeña fracción de cutina está formada por ácidos grasos de 18 carbonos, entre ellos los ácidos 9,10 -epoxi-18-hidroxi-octadecanoico y 9,10,18-trihidroxi-octadecanoico (Heredia, 2003). Taiz y Zeiger (2006) reportaron que la cutina se compone de ácidos grasos de cadena larga de 16:0 y 18:1 con grupos hidroxilo o epóxido situados en la parte media o en el extremo opuesto al grupo carboxilo y, que forma una red tridimensional rígida.

Las ceras intracuticulares están intercaladas dentro del polímero de la cutina y tienen una composición química distinta de las ceras epicuticulares de la superficie exterior de la cutina, en forma de una capa más o menos uniforme y amorfa o como cristales discontinuos (Domínguez *et al.*, 2011). La cera cuticular constituye de 20 a 60% de la masa de la cutícula (Heredia, 2003), dicha cera es una mezcla de compuestos alifáticos de cadenas lineales que varían entre 20 y 40 átomos de carbono; sin embargo, también se han identificado ésteres de cadenas que van desde 36 a 70 carbonos (Reina y Yephremov, 2009). Los principales componentes de las ceras son ácidos grasos de cadena larga en las epicuticulares y ácidos de cadena corta en las intracuticulares (Kunst *et al.*, 2006).

Uno de los mecanismos de defensa de las plantas es producir sustancias antimicrobianas, así como barreras físicas que impiden, limitan o retardan la colonización por microorganismos patógenos, la cutícula es la primera capa que encuentran los patógenos foliares al contactar a un hospedante (Taiz y Zeiger, 2006). En cladodios viejos se presenta cutina más gruesa, que la hace indigestible, provocando una disminución del ataque microbiano (FAO, 2003). Es decir, plantas con cutícula más gruesa pueden resistir mejor la penetración, sobre todo si el mecanismo involucrado es la fuerza mecánica. La presencia de capas de suberina bajo la epidermis impide el desarrollo de ciertos patógenos, debido a que contribuyen a la cicatrización de heridas en la corteza de las plantas, lo que podría ser una posible puerta de entrada de patógenos (Taiz y Zeiger, 2006).

Las plantas producen gran variedad de metabolitos secundarios, muchos de ellos con propiedad antimicrobiana que existen de forma activa y otros como precursores (Taiz y Zeiger, 2006). Dentro de los compuestos antimicrobianos preformados se encuentran dienos, monoenos, compuestos fenólicos simples como resorcinolos, el catecol y el ácido protocatéquico, el ácido clorogénico, saponinas, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos (Taiz y Zeiger, 2006). Existe escasa información sobre la cutícula de nopal, en *Opuntia ficus indica* es una barrera poco porosa con un grosor promedio de entre 0.15 y 0.28 mm, una densidad estomatal de 28 estomas por mm² y densidad de 11 mg/cm³; su resistencia a climas secos es debido a su elevado punto de fusión registrado en 250°C, antes del punto de ignición (Vargas *et al.*, 2017). Debido a todo lo anterior, se estableció por objetivo de esta investigación evaluar la actividad antimicrobiana de la cutícula de los cladodios de nopal *Opuntia ficus-indica* variedad *Atlixco* provenientes del residuo agroindustrial de cultivos de grana cochinilla del poblado de Urireo, en Salvatierra, Guanajuato.

METODOLOGÍA

Las cutículas de cladodios del nopal *Opuntia ficus-indica* variedad *Atlixco*, obtenidas en laboratorio por un proceso en trámite de patentar por la Universidad de Guanajuato a través de Vargas Rodríguez L., fueron ensayadas para su actividad antimicrobiana por el método de difusión en agar (Acar y Goldstein, 1986; Piddock, 1990 citados por Davidson, M. *et al.*, 2005) utilizando microorganismos aeróbicos.

Actividad antimicrobiana por difusión en agar. Esta técnica consistió en inocular el medio sólido LB (agar) con la suspensión del microorganismo; posteriormente, se impregnaron discos de papel filtro con la solución de cutícula, los cuales fueron colocados en la superficie del agar. Las cajas Petri fueron incubadas a 37°C durante 24 horas. Se utilizaron tres cepas bacterianas de la colección del laboratorio de Parasitología e Inmunología del Departamento de Biología de la División de Ciencias Naturales y Exactas del campus Guanajuato de la Universidad de Guanajuato, lugar dónde se realizaron las pruebas. Una colonia de cada bacteria se diluyó en un tubo con medio LB líquido hasta obtener una densidad óptica de 0.5 a 0.7, determinada con un espectrofotómetro marca General Electric modelo Gene Quant 1300.

Elección de microorganismos. En una primera estrategia, los microorganismos utilizados para evaluación de la actividad antimicrobiana fueron *Salmonella enteritidis* y *Staphylococcus aureus* por ser altamente patógenos al humano y su alta recurrencia durante el procesamiento de los alimentos. Antagónicamente, y posterior a los resultados con los primeros microorganismos se consideró a *Bacillus subtilis* en una segunda estrategia, la selección fue basada esta vez por ser un microorganismo inocuo, lo que lo hace sensible al ataque por agentes antimicrobianos y, por su alta frecuencia en el ambiente.

Bio-Ensayos de inspección de actividad antimicrobiana en las cutículas de nopal. En cajas Petri con medio de cultivo LB sólido se inoculó el microorganismo en cuestión, luego se colocaron discos de papel filtro (0.5 cm de diámetro) en algunos casos adicionados de 4 µL de la solución a analizar; en otros, los discos de papel fueron sustituidos por discos de cutícula de cladodio de nopal, esterilizados y no esterilizados, de acuerdo con el ensayo. Las cajas Petri fueron incubadas a 37°C durante 24 horas. En la tabla 1, para mayor claridad, se muestra la estrategia de 5 ensayos para las muestras de cutícula analizadas, en presentación de recorte de disco cuticular (DC), preparaciones de solución acuosa cuticular (SAC) y extractos grasos cuticulares con hexano (Ehex) o éter de petróleo (EEte) y ante los diferentes microorganismos elegidos. Adicionalmente, en los ensayos se incluyó un disco de papel filtro con antibiótico de amplio espectro: carbenicilina de concentración 2µg/µL como control positivo de la actividad antimicrobiana (como fue empleada para *S. enteritidis* por Fonseca y Ávila, 2014), excepto en los ensayos 3, 4 y 5. En tanto, el control negativo en todos los casos fue asistido por 4 µL de agua estéril sobre un disco de papel filtro esterilizado.

Tabla 1 Estrategia de los ensayos de inspección de actividad antimicrobiana para la cutícula de cladodio de nopal (*Opuntia ficus indica* var. *Atlixco*) proveniente del desecho del cultivo de la grana cochinilla.

Micro-organismo	Núm. *	D ¹	Preparación de supuesto activo de la-cutícula de cladodio de nopal (solución acuosa cuticular: SAC/ disco cuticular: DC)
<i>S. enteritidis</i> y (<i>A</i> y <i>C</i>) <i>S. aureus</i> (<i>B</i> y <i>D</i>)	1(A y B)	D3	SAC obtenida por maceración durante 8 meses, no esterilizada.
		D4	SAC obtenida por maceración durante 8 meses, esterilizada.
		D5	DC esterilizado.
		D6	DC no esterilizado.
	2(C y D)	D4	Gota (4µL) de SAC obtenida por 5 lavados de cutícula (con agua estéril), a través de centrifugación (1500 rpm/10 min). Aplicada directamente en el agar.
		D6	DC lavado por centrifugación (1500 rpm/10 minutos). Usando agua estéril para los lavados.
<i>B. subtilis</i>	3 (A)	D2	SAC obtenida por maceración de cutícula durante 72 h, esterilizada por ultrafiltración en membrana de papel filtro endurecido de celulosa.
		D4	DC (cara interna) ² de cutícula recién desprendida mecánicamente del cladodio fresco, no esterilizado.
		D5	DC (cara externa) ² de cutícula recién desprendida mecánicamente del cladodio fresco, no esterilizado
	4 (B)	D2	SAC de cutícula previamente lavada con detergente Tween 20 al 0.05%, esterilizada por ultrafiltración en membrana de papel filtro endurecido de celulosa.
		D3	DC (cara interna) recién desprendida mecánicamente del cladodio fresco, esterilizado.
		D4	DC (cara externa) recién desprendido mecánicamente del cladodio fresco, esterilizado.
	5	D1	DC impregnado por ambas caras con extracto de cutícula de nopal (obtenido en reflujo constante en aparato soxhlet durante 8 h y solvente éter de petróleo).
		D2	DC impregnado por ambas caras con extracto de cutícula de nopal (obtenido en reflujo constante en aparato soxhlet durante 8 h y solvente hexano).

* Núm. es el número de ensayo; ¹ Disco; ² se refiere a la cara de cutícula en el nopal que hace contacto con el agar del cultivo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La actividad antimicrobiana está presente en la epidermis de todos los organismos superiores, se considera como un órgano inmunológico debido a que puede inducir inmunidad sistémica hacia antígenos exógenos (Fichtelius, K. E. *et al.*, 1971; Novak, N. y Bieber, T., 2000). No obstante, los resultados del presente trabajo por ahora de una sola exploración deberán ampliarse para ser concluyentes. En términos específicos son comentados a continuación. Para Reyes *et al.* (2014), un microorganismo es susceptible cuando el diámetro de la zona de inhibición varía entre 20 y 30 mm, y es resistente cuando mide de 15-20 mm. Tomando en cuenta lo anterior, en la figura 1 se revelan los resultados de los ensayos 1 y 2. Para los ensayos 1 y 2 utilizando *S. enteritidis* y/o *S. aureus*, ninguna muestra (en DC o SAC) reveló actividad antimicrobiana. Sin embargo, se destaca para la figura 1-A la aparición de un halo de consistencia algodonosa alrededor del DC no estéril en la posición D6. Esto se atribuye a posible contaminación de la muestra. Otro aspecto notorio se observa en la figura 1-B (*S. aureus*), en donde el microorganismo creció de manera homogénea, permitiendo la generación de un halo muy definido y específico de inhibición del antibiótico D2.

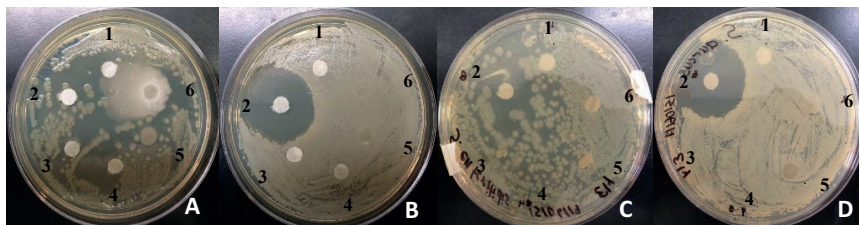


Figura 1 Antibiogramas para el supuesto activo de cutícula de nopal. Ensayo 1 (A: *S. enteritidis*/B: *S. aureus*) y 2 (C: *S. enteritidis*/B: *S. aureus*). El orden de las muestras comienza con el control negativo D1 (agua estéril) seguido del control positivo D2 (antibiótico carbenicilina) y continua de acuerdo con lo presentado en la tabla 1, para el caso del ensayo 2 se agregaron dos muestras como comparación en las posiciones D3 (4μL de solución acuosa cuticular de agave) y D5 (cutícula de agave).

Los resultados en las muestras para la inspección de actividad antimicrobiana dirigidos a *B. subtilis*, con base a la estrategia dos de la metodología aparecen como ensayos 3 y 4 (ver figura 2). Se presentaron halos de crecimiento de un color verdoso sobre las cutículas ensayadas recientemente desprendidas del nopal (figura 2-A y B); se especula, que la cutícula favoreció el crecimiento de solo *B. subtilis* exponiendo mayor diámetro en el D5 (figura 2-A) con cara externa haciendo contacto con el medio de cultivo.

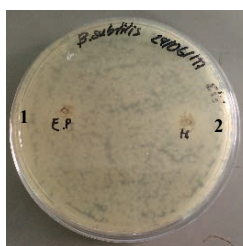


Figura 3 Antibiogramas de *B. subtilis* con extractos grasos de cutícula de nopal. La posición D1 corresponde a las ceras extraídas con el solvente éter de petróleo y D2 a las del hexano.

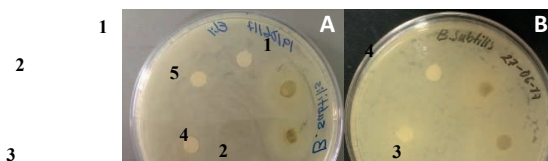


Figura 2 Antibiograma para el supuesto activo de la cutícula de nopal con *B. subtilis* en la estrategia 2, de los ensayos 3 (A) y 4 (B). Para ambos ensayos la posición D1 corresponde al control negativo (agua estéril) y las siguientes muestras atienden a la tabla 1; en A se agregó una muestra (D3) de solución acuosa cuticular de agave como comparación.

Una tercera estrategia para identificar la actividad antimicrobiana de las cutículas de nopal obtenidas en laboratorio por proceso en patentar, implicó realizar investigación documental para conocer los tipos de sustancias presentes a las que se les ha atribuido dicha actividad. Se encontró, que los ácidos grasos como el metabolismo de los carbohidratos juegan un papel importante en la defensa de las plantas y, están involucrados en la síntesis de varias fitohormonas entre ellas los ácidos jasmónico (JA), salicílico (SA) y absísico (ABA) (Torres-Zabala, *et al.*, 2007). Los ácidos grasos descritos para cutículas de plantas en general, incluyen a los saturados C18:0, los monoinsaturados C18:1, y los poliinsaturados C18:2, C18:3 (Chalon, 2006), todos presentes directa o indirectamente en las señales de defensa de las plantas (Xue, 2006). En tanto los de 16 carbonos incluyen a los siguientes: C16:0, C16:1, C16:2 y C16:3, de los cuales algunos de ellos afectan la resistencia basal a hongos y bacterias (Stentz y Kitabchi, 2006).

Tomando en cuenta que los ácidos grasos (C16 y C18) juegan una función importante en la cutícula como barrera microbiana (Kachroo y Kachroo, 2009), se hicieron extracciones con dos solventes orgánicos: hexano y éter de petróleo para investigarse ante *B. subtilis* de acuerdo con la metodología (ensayo 5). No obstante, la incompatibilidad debida a la naturaleza química con la técnica de difusión en agar (no difunde tratarse de sustancias ceras), se procedió a realizar dicha técnica. El resultado mostró que en ambas muestras (Ehex y EEte) de “supuestas ceras cuticulares y cutina extraídas”, no presentaron efecto inhibitorio de crecimiento para el *B. subtilis* (figura 3), pues la bacteria creció de manera uniforme.

Se ha descrito en general que algunos metabolitos secundarios de carácter céreo en cutículas de las plantas funcionan como sustancias antimicrobianas y de defensa para las plantas, tales como triterpenoides, compuestos fenólicos, polisacáridos, algunos polipéptidos (Kunst *et al.*, 2006); y saponinas (Taiz y Zeiger, 2006). Los ácidos grasos y sus derivados influyen sistemáticamente en las respuestas de defensa de las plantas (Ye *et al.*, 2009). Kachroo *et al.* (2008), mencionan que plantas que carecen de ácidos grasos poliinsaturados (C16:3), también pueden inducir señales de defensa cuando sus niveles de C18:1 se reducen, por lo que se enfatiza una vez más en la necesidad de ampliar la presente investigación para el caso de la cutícula de nopal, en su forma completa, y/o de los ácidos grasos que la conforman.

CONCLUSIÓN

La inspección de la actividad antimicrobiana para la “cutícula de nopal *Opuntia ficus-indica* var. *Atlixco* proveniente de desechos de la producción de la grana cochinilla”, obtenida por proceso de laboratorio en vías de patentarse y bajo las condiciones descritas en este trabajo exploratorio, demostró que es difícil la identificación de la actividad antibacteriana in vitro.

BIBLIOGRAFÍA

- BESSIRE, M., *et al.* (2007). "A permeable cuticle in *Arabidopsis* leads to a strong resistance to *Botrytis cinerea*" en *EMBOJ*, Núm. 26, [pp. 2158-2168].
- CARVER, T. L. W. y GURR, S. J. (2006). "Filamentous fungi on plant surfaces" en *Biology of the plant cuticle*. M. Riederer, C. Müller (eds). Julius-von-Sachs-Institute, für Biowissenschaften Universität Würzburg, Germany [pp. 368-392].
- CHALON, S. (2006). "Omega-3 fatty acids and monoamine neurotransmission" en *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* Núm. 75 [pp. 259-269].
- DAVIDSON, MICHAEL *et al.*, (2005). *Antimicrobials in food*. Boca Raton, FL. Taylor & Francis Group.
- DOMINGUEZ E., HEREDIA-GUERRERO, J. A., HEREDIA, A. (2011). "The biophysical design of plant cuticles". En *New Phytol* Núm. 189, [pp. 938-949].
- FAO. (2003). "El nopal (*Opuntia* spp.) como forraje" en Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, Italia.
- FONSECA I. J. V. y ÁVILA M. E. E. (2014). Efecto antibacteriano de la proteína antimicrobiana profenina 2. Memoria 7o Verano Estatal de Investigación. Guanajuato, Gto., Méx.
- FICHTELIUS, K. E., LIDEN, S., y GROTH, O. (1971). "The skin, a first level lymphoid organ?". En *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* Núm. 37, [pp. 607-620].
- HEREDIA, A. (2003). "Biophysical and biochemical characteristics of cutin, a plant barrier biopolymer". En *Biophys* Núm. 1620, [pp. 1-7].
- KACHROO, AARDRA y KACHROO, PRADEEP. (2009). "Fatty Acid-Derived Signals in Plant Defense". En *The Annual Review of Phytopathology* Núm. 47 [pp. 153-176].
- KACHROO, A. *et al.*, (2008). "An oleic acid-mediated pathway induces constitutive defense signaling and enhanced resistance to multiple pathogens in soybean" en *Mol. Plant-Microbe Interact* Núm. 21 [pp.564-575].
- KUNST, L., JETTER R., y SAMUELS L. (2006). "Biosynthesis and transport of plants cuticular waxes". En *Biology of the Plant Cuticle*. M. Riederer, C. Müller (eds). Julius-von-Sachs-Institute, für Biowissenschaften Universität Würzburg, Germany [pp. 182-207].
- NOVAK, N. y BIEBER T. (2000). "The skin as a target for allergic diseases" en *Allergy* Núm. 55 [pp. 103-107].
- PIGHIN, J. *et al.* (2004). "Plant cuticular lipid export requires an ABC transporter". En *Science* Núm. 306, [pp. 702-704].
- REINA, J. J. y YEPHREMOV, A. (2009). "Surface lipids and plant defenses" en *Plant Physiol. Biochem* Núm. 47 [pp. 540-549].
- REYES-AGÜERO, J. A. *et al.* (2009). *Catálogo de las principales variantes silvestres y cultivadas de Opuntia en la Altiplanicie Meridional de México*. México: SAGARPA y CONACYT.
- REYES *et al.* (2014). "Métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana y determinación de los componentes químicos de los aceites esenciales" en *Temas Selectos de Ingeniería en Alimentos* Núm. 8, Vol. I [pp. 68-78].
- RIEDER, M. y SCHEREIBER, M. (2001). "Protecting against water loss: analysis of the barrier properties of plant cuticle" en *J.exp. Bot.* Núm. 52, [pp. 2023-2032].
- SÁENZ, C. (2006) *Utilización agroindustrial del nopal*. Roma: Boletín de Servicios Agrícolas de la FAO.
- STENTZ, F. B. y KITABCHI, A. E. (2006) "Palmitic acid-induced activation of human T-lymphocytes and aortic endothelial cells with production of insulin receptors, reactive oxygen species, cytokines, and lipid peroxidation" en *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Núm. 346 [pp.721-726].
- SUH, M. C. *et al.* (2005). "Cuticular lipid composition, surface structure, and gene expression in *Arabidopsis* stem epidermis" en *Plant Physiol* Núm. 139, [pp. 1649-1665].
- TORRES, M., *et al.*(2007). "*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* hijacks the *Arabidopsis* abscisic acid signalling pathway to cause disease" en *EMBO J.* Núm. 26 [pp. 1434-1443].
- VARGAS-RODRIGUEZ, L. *et al.*, (2017, agosto). *Cuticle of prickly pear: structure and biological function*. Trabajo por presentarse en el XXVI International Materials Research Congress, Cancún, México. Estatus: aceptado.
- TAIZ, L, Y ZEIGER, E. (2006). *Fisiología vegetal Vol. I*. Castelló de la Plana: Universitat Jaume.
- WENIGER, D. (1979). *Cacti of the Southwest*. Austin: University of Texas Press.
- XUE, H. Q., *et al.* (2006). "Ergosterol as a quantifiable biomass marker for *Diaporthe phaseolorum* and *Cercospora kikuchii*" en *Plant Dis* Núm. 90 [pp. 1395-1398].
- YE, X. *et al.*, (2009). "An intact cuticle in distal tissues is essential for the induction of systemic acquired resistance in plants" en *Cell H. y M.* Núm. 5 [pp.151-165].

TOLERANCIA A ESTRÉS ABIÓTICO POR METALES PESADOS INDUCIDO POR HONGOS ENDÓFITOS

Valadez Becerra Fátima¹ y Morales Vargas Adan²

RESUMEN

Los hongos endófitos son organismos ubicuos encontrados en plantas, ya sea de forma intercelular o extracelular, al menos durante una parte de sus vidas sin causar síntomas aparentes de infección. En ambientes altamente contaminados por metales pesados, hongos endófitos han sido ampliamente encontrados reduciendo la fitotoxicidad y mejorando la eficiencia de la fitorremediación de la planta huésped. El propósito de este trabajo fue evaluar el efecto de hongos endófitos para inducir tolerancia a estrés por metales pesados en frijol cultivar Pinto Villa. Estudios recientes han demostrado que los hongos endófitos de la raíz pueden mejorar las adaptaciones ecológicas de las plantas que viven en ambientes severos: ayudan a tolerar el estrés a factores bióticos y abióticos. Incluyendo metales pesados, calor, sal, sequía, herbívoros y patógenos.

ABSTRACT

Endophytic fungi are ubiquitous organisms found in plants, either intercellular or extracellular, for at least a part of their life without causing apparent symptoms of infection. In heavy metal contaminated environments, endophytes are found widely, it has been found that some endophytes can reduce phytotoxicity, improve plant growth, and enhance the phytoremediation effectiveness of host plants. This paper reveals the importance of endophytic fungi as an enhancer heavy-metal stress tolerance in bean Cultivar Pinto Villa. Recent studies have shown that root fungal endophytes can improve ecological adaptations of plants living in severe environments: root fungal endophytes can enhance the stress tolerance of plants to abiotic and biotic factors.

Palabras Clave: Hongo endófito, estrés por metales pesados, cultivar Pinto Villa.

INTRODUCCIÓN

Los hongos endófitos son organismos ubicuos encontrados en plantas, residen de manera intercelular o extracelular, al menos durante una parte de sus vidas sin causar síntomas aparentes de infección. (Kaul, 2012). Los microorganismos, tales como los hongos, pueden promover el crecimiento de la planta mediante la transformación de nutrientes, producción de fitohormonas o el suministro de hierro para reducir los efectos negativos de los metales pesados (Raj-kumar et al. 2010). En ambientes altamente contaminados por metales pesados, hongos endófitos han sido ampliamente encontrados reduciendo la fitotoxicidad y mejorando la eficiencia de la fitorremediación de la planta huésped. (Zhang et al. 2012).

La contaminación por metales pesados se ha convertido en un problema importante en los campos de la agricultura debido a los recientes avances en las actividades industriales y urbanas. Metales como el cobre (Cu) se agregan en el suelo a través de agua de riego contaminada. Altas concentraciones de este metal son tóxicas para las células vivas de la planta, incluso a bajas concentraciones. El cobre (Cu) está naturalmente distribuido en el suelo, juega un papel esencial en el crecimiento de las plantas además es importante en para diferentes funciones de síntesis de enzimas y proteínas que son utilizados en varios procesos metabólicos de la planta. Sin embargo, una mayor concentración es tóxica para los cultivos, ya que interfiere con numerosos procesos fisiológicos (Abdul, 2013). Así, la remediación de suelos contaminados por metales pesados está ganando un papel importante, siendo la biorremediación uno de los métodos más prometedores debido a su sustentabilidad, rentabilidad y a que es amigable con el ambiente. (Wei, et al. 2014). El interés científico por la interacción de los hongos con los metales pesados se ha derivado inicialmente de la toxicidad de dichos elementos en preparaciones fungicidas utilizadas para el control de patógenos en plantas y para preservar productos naturales y sintéticos. También ha sido de importancia el estudio del efecto por metales tóxicos, metaloides, radionúcleos y compuestos organometálicos, ha motivado el interés hacia los hongos debido a: (1) su ubicua y algunas veces dominante presencia en hábitats contaminados; (2) la captación y traslocación de metales tóxicos y radionúcleos hacia los cuerpos fructíferos de algunos hongos, y (3) la protección que los hongos micorrízicos brindan a las plantas contra los metales tóxicos.

Estudios recientes han demostrado que los hongos endófitos de la raíz pueden mejorar las adaptaciones ecológicas de las plantas que viven en ambientes severos: ayudan a tolerar el estrés a factores bióticos y abióticos. Incluyendo metales pesados, calor, sal, sequía, herbívoros y patógenos. (Yamaji, 2016).

MÉTODOS Y MATERIALES

En el presente trabajo se evaluó el efecto de hongos endófitos para inducir tolerancia a estrés por metales pesados en frijol cultivar Pinto Villa. Los hongos fueron aislados en trabajos anteriores del Lirio acuático en el Canal "Ing. Antonio Coria" ubicado en la ciudad de Irapuato, Gto.

Cultivo de hongos y recolección de conidias

Se realizó un duplicado en medio PDA de los hongos. Posteriormente, se llevó a cabo un lavado con solución SDS al 0.1% para la recolección de conidias.

Germinación de semillas Frijol cultivar Pinto Villa.

Se seleccionaron 120 semillas las cuales fueron colocadas en charolas de plástico que contenían papel absorbente húmedo, estas permanecieron una semana en estas condiciones verificando la humedad del papel.

Inoculación de las plantas y trasplante

Una vez transcurrido el periodo de germinación y en presencia de los cotiledones las plantas fueron retiradas de las charolas y se colocaron en las soluciones de conidias previamente preparadas por un tiempo de 15 minutos para después ser trasplantadas en macetas de manera individual las cuales contenían tierra negra y peatmoss en una composición 1:3.

Aplicación del tratamiento.

Las plantas se mantuvieron en tratamiento por un periodo de 15 días, regándose cada tercer día con 100 ml de agua para los tratamientos y control (+) y 100 ml de solución de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 150 $\mu\text{g/ml}$ para los tratamientos y control (-). Después de este periodo se midieron la altura de cada una de las plantas y el largo de la raíz.

La distribución de los tratamientos se realizó de acuerdo a la siguiente figura teniendo un $n = 12$ para cada control y tratamiento.

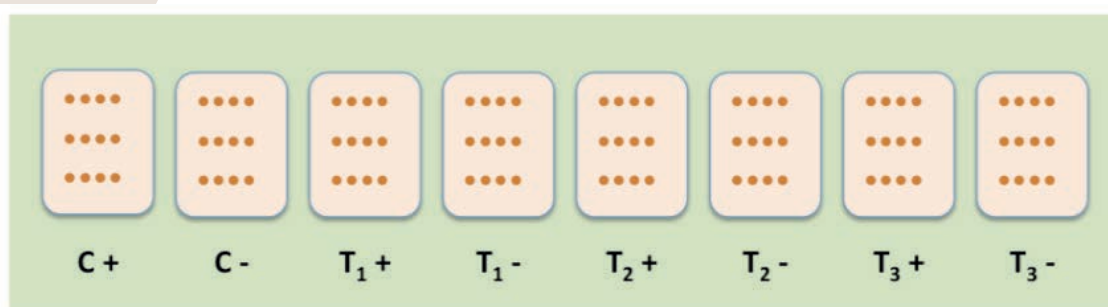


Figura 1. Distribución de tratamientos de hongos endófitos para inducir tolerancia a estrés por metales pesados.

C+ : Frijol + Agua
C- : Frijol + $[\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 150 $\mu\text{g/ml}$]
T₁+ : Frijol + Endófito H107 + Agua
T₁- : Frijol + Endófito H107 + $[\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 150 $\mu\text{g/ml}$]
T₂+ : Frijol + Endófito H5 + Agua
T₂- : Frijol + Endófito H5 + $[\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 150 $\mu\text{g/ml}$]
T₃+ : Frijol + Endófito H15 + Agua
T₃- : Frijol + Endófito H15 + $[\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 150 $\mu\text{g/ml}$]

Identificación de Hongos.

1. Macroscópica: Se observó la morfología del hongo en el medio PDA.
2. Microscópica: Se realizaron microcultivos de acuerdo al método de Riddell (Dasgupta, 1988), posteriormente se identificó los cuerpos fructíferos tiñendo con azul de Lactofenol y observación al microscopio, así mismo, se apoyó en el uso de la aplicación Micellium Touch para una identificación más precisa del hongo en cuestión.

Extracción de DNA

Se extrajo DNA con ayuda del kit de aislamiento de DNA genómico para Hongo/Levadura de la marca Norgen Biotek Corp, posteriormente se realizó una electroforesis del ADN para comprobar su integridad.

RESULTADOS

Los hongos endófitos poseen mecanismos de promoción de crecimiento mediante la capacidad metabólica que poseen y la utilización de los sustratos liberados por la planta. Es por eso por lo que se cree que los hongos endófitos poseen una gran importancia en la regulación del crecimiento vegetal, debido a los tiempos cortos de generación en la planta, la fijación biológica de nitrógeno, la capacidad para colonizar raíces y la producción de metabolitos secundarios, generando así una gran herramienta para el cultivo y la producción de plantas de interés agronómico. Se evaluó si los aislados de endófitos fúngicos son capaces de conferir tolerancia a estrés térmico en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) de acuerdo al diseño experimental antes mencionado. La evaluación del crecimiento de frijol cultivar Pinto Villa se llevó a cabo mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA), así mismo, se comprobó la hipótesis nula de igualdad entre los tratamientos usando el software JMPIN 4.03, SAS Institute Inc. Adicionalmente, para constatar las diferencias entre las medias de los tratamientos se utilizó el método de Tukey-Kramer HSD (Honestly Significant Difference) como prueba post hoc ($p < 0.05$).

Los resultados de crecimiento de las plántulas de frijol cultivar Pinto Villa se muestran en las figuras siguientes. En la figura 2 se muestra el crecimiento de altura y raíz para plántulas con el tratamiento 1 correspondiente al hongo 107, en esta se observa que no hay un efecto significativo en la raíz, sin embargo, la altura sí presenta efecto significativo en los tratamientos C- y T1- ($p < 0.05$). Para la figura 3, correspondiente al tratamiento 2 (hongo 5), la longitud en la raíz no presenta un efecto significativo, mientras que la altura sí presenta efecto significativo ($p < 0.05$).

Finalmente en la figura 4 se muestra el tratamiento 4 representando al hongo 15, en el que nuevamente la raíz no presenta un efecto significativo, mientras que la altura sí presenta efecto significativo ($p<0.05$).

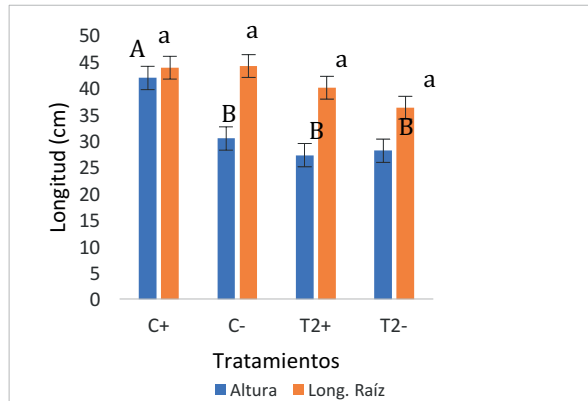
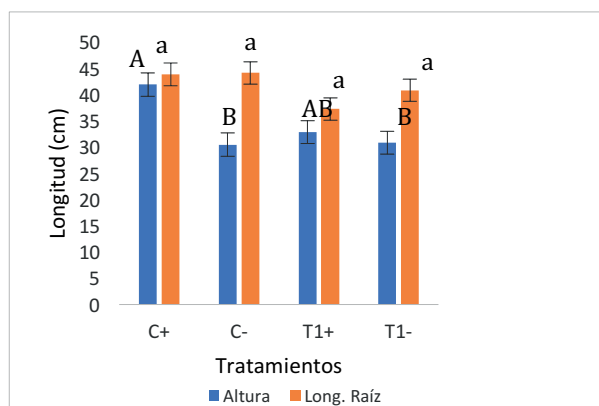


Figura 2. Tolerancia a estrés por Cu en la elongación de tallo y raíz de frijol cultivar Pinto Villa. Las barras representan el promedio de raíces y tallos en los diferentes tratamientos, las barras de error representan el error estándar ($n=12$). Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p<0.05$).

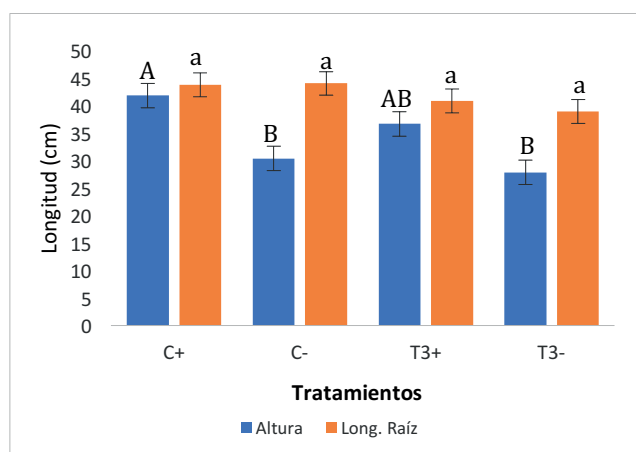
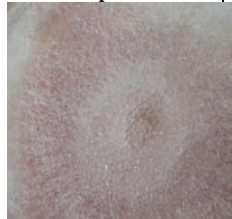
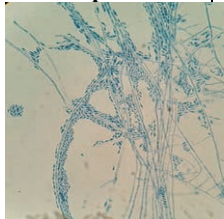
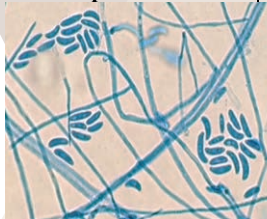


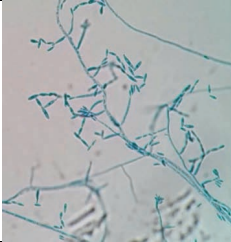
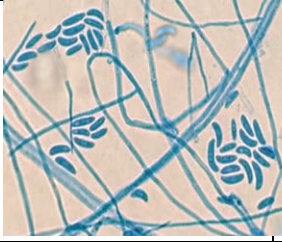
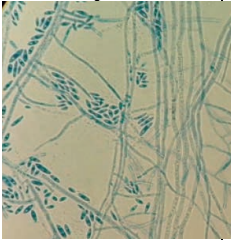
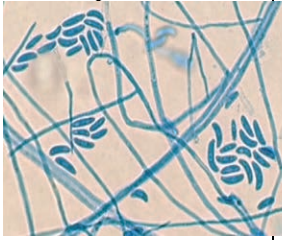
Figura 4. Tolerancia a estrés por Cu en la elongación de tallo y raíz de frijol cultivar Pinto Villa. Las barras representan el promedio de raíces y tallos en los diferentes tratamientos, las barras de error representan el error estándar ($n=12$). Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p<0.05$).

Para la identificación de los hongos macroscópicamente se llevó a cabo su observación directa, mientras que para la microscópica se realizaron microcultivos de acuerdo al método de Riddell y su posterior observación al microscopio, además del uso de la aplicación Micellium Touch para una mejor identificación del hongo, cabe señalar que mediante estos procedimientos se identificó el género de los hongos (*Fusarium*), en la tabla que a continuación se muestra, se realiza una comparación macroscópica y microscópica con la morfología reportada en literatura.

Figura 3. Tolerancia a estrés por Cu en la elongación de tallo y raíz de frijol cultivar Pinto Villa. Las barras representan el promedio de raíces y tallos en los diferentes tratamientos, las barras de error representan el error estándar ($n=12$). Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p<0.05$).

Tabla 1. Comparación macroscópica y microscópica de *Fusarium*

Aislado H107		Referencia		Fuente
Macroscópica	Microscópica 40x	Macroscópica	Microscópica	LABLOGA TORY
				
Aislado H5		Referencia		Fuente
Macroscópica	Microscópica 40x	Macroscópica	Microscópica	LABLOGA TORY

				
Aislado H15		Referencia		Fuente
Microscópica 40x	Microscópica 40x	Macroscópica	Microscópica	LABLOGA TORY
				

CONCLUSIONES

La tolerancia a estrés por cobre de las plantas de frijol no presentó efecto significativo en la raíz para ninguno de los tratamientos utilizados en este trabajo, por lo que puede decirse que el hongo puede ayudar el desarrollo de la misma aún y cuando esta se ve sometida a concentraciones anormales de cobre, sin embargo, esto no ocurrió en la longitud del tallo en la cual se observó que incluso cuando la planta estaba en asociación con el hongo, esta tuvo un menor crecimiento al ser tratada con la solución de cobre. Cabe señalar que otros estudios serían necesarios para identificar y cerciorar la presencia activa del hongo endófito en la planta, así como la presencia de algún otro organismo oportunista que pudo haber influenciado en los resultados obtenidos.

BIBLIOGRAFIA

Libros

DASGUPTA, M, (1988). *Principles of Plant Pathology*, Allied Publishers, [pp. 935, 936].

Artículos de revista

ABDUL, L.K., IN-JUNG, LEE. (2013). “Endophytic *Penicillium funiculosum* LHL06 secretes gibberellin that reprograms *Glycine max* L. Growth during copper stress” en *BMC Plant Biology*, Núm 86, Vol. 13,

RAJKUMAR M, AE N, PRASAD MNV, FREITAS H. (2010). “Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction en *Trends Biotechnol.* Núm 28.

ZHANG XC, LIN L, CHEN MY, ZHU ZQ, YANG WD, CHEN B, YANG XE, AN QL. (2012). “A nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain enhances phytoextraction of heavy metals by the hyperaccumulator *Sedum alfredii* Hance” en *J Hazard Mater.* Vol. 229–230, páginas 361–370.

WEI Y, HOU H, SHANGGUAN YX, LI JN, LI FS. (2014). “Genetic diversity of endophytic bacteria of the manganese-hyperaccumulating plant *Phytolacca americana* growing at a manganese mine” en *Eur J Soil Biol.* Vol. 62, páginas 15–21.

Artículos en línea

YAMAJI, K., WATANABE, Y., MASUYA, H., SHIGETO, A., YUI, H., HARUMA, T. (2016). “Root Fungal Endophytes Enhance Heavy-Metal Stress Tolerance of *Clethra barbinervis* Growing Naturally at Mining Sites Via Growth Enhancement, Promotion of Nutrient Uptake and Decrease of Heavy-Metal Concentration” en *PLoS ONE*, Núm. 12, Vol. 11. Consultada en <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169089> (10-07-2017)

KAUL, S., GUPTA S., AHMED, M., et al. (2012) “Endophytic fungi from medicinal plants: a treasure Hunt for bioactive metabolites” en *Phytochemistry Reviewa*, No. 4, Vol. 11. Consultada en <https://link.springer.com/article/10.1007/s11101-012-9260-6>

LABLOGATORY. (2015). “Microbiology Case Study: Immunocompromised Boy with Skin Nodules” en *LABLOGATORY*. Consultada en <https://labmedicineblog.com/2015/11/02/microbiology-case-study-immunocompromised-boy-with-skin-nodules/> (18-08-2017).

ANÁLISIS CINEMÁTICO DE LA MARCHA EN RATAS CON LESIÓN MEDULAR TRATADAS CON ACETATO DE LEUPROLIDA

Fátima Guadalupe Tapia Rodríguez¹ y José Luis Quintanar Stephano²

RESUMEN

La lesión de médula espinal puede causar parálisis debido a la interrupción de los circuitos neuronales. Aunque existe cierto grado de recuperación espontánea, las conexiones que se perdieron son difíciles de recuperar. Una opción es considerar el uso de factores neurotróficos que induzcan la regeneración nerviosa. Diversos estudios han mostrado que la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y su análogo sintético el acetato de leuprolida (AL) tienen efectos neurotróficos. El presente trabajo fue realizado para determinar la posible recuperación locomotora en la marcha de un modelo animal de lesión de médula espinal tratado con AL. Los resultados mostraron una recuperación significativa en algunas variables espacio-temporales en el grupo tratado con AL en comparación con el grupo control.

ABSTRACT

Spinal cord injury can cause paralysis due to neural circuit disruptions. Although there exist some degree of spontaneous recovery, lost connections are difficult to recuperate. One option is to consider the use of neurotrophic factors to induce nerve regeneration. Several researches have shown that gonadotrophin releasing hormone (GnRH) and its synthetic analog leuprolide acetate (AL) have neurotropic effects. The present study was performed to determine possible gait locomotor recovery in a spinal cord injury animal model treated with AL. The results showed a significant recovery of some spatiotemporal variables in the LA treated group compared to control group.

Palabras Clave: Lesión de médula espinal, acetato de leuprolida, regeneración neuronal, análisis cinemático, recuperación locomotora.

INTRODUCCIÓN

La médula espinal es la principal vía de información entre el cerebro, el tronco y el resto del cuerpo. Es un cilindro de tejido nervioso que comienza en el foramen magno y se extiende por todo el canal vertebral hasta la primera vértebra lumbar (L1). Contiene dos tipos de tejido nervioso llamado materia gris (cuerpos neuronales, dendritas y parte proximal de los axones neuronales) y blanca (axones mielinizados). De la médula espinal surgen pares de nervios espinales que se encargan de recibir información sensorial de piel, músculos, huesos, articulaciones y vísceras, así como enviar señales motoras a las células musculares y glandulares. La médula espinal tiene tres funciones principales: conducción, control de la locomoción y control de reflejos. La médula espinal contiene haces de fibras nerviosas que conducen información ascendente y descendente a lo largo de ella, conectando diferentes niveles del tronco con el cerebro. Los tractos ascendentes llevan información sensorial y los tractos descendentes conducen impulsos motores. En la médula espinal también se encuentran los generadores centrales de patrones, grupos de neuronas que coordinan las contracciones repetitivas de músculos flexores y extensores, que permiten el movimiento alternado de los miembros inferiores en la caminata (Saladin, 2012).

La lesión traumática de médula espinal (LME) puede causar la interrupción de axones sensoriales y motores; así como la pérdida de mielina, neuronas motoras inferiores, interneuronas y células gliales, causando una dramática pérdida funcional. Uno de los efectos más devastadores de la lesión de médula espinal es la interrupción de la capacidad para realizar un movimiento funcional (Couto et al., 2008).

Según la Organización Mundial de la Salud en el documento “International Perspectives on Spinal Cord Injury” se define a la lesión de médula espinal como una condición médicamente compleja y perturbadora para la vida. Aunque menos de 0.1% de la población mundial sufre de lesión de médula espinal (Bickenbach et al., 2013), esta condición es particularmente devastadora, por dos razones: frecuentemente es impredecible, y las consecuencias más comunes de la LME son mortalidad prematura y en el mejor de los casos exclusión social, según describe la Dra. Margaret Chan, anterior directora general de la OMS en Bickenbach et al. (2013). En la lesión traumática de médula espinal, los síntomas dependen de la extensión de la lesión, entre ellos se pueden incluir pérdida del control motor y sensorial de los miembros inferiores, tronco y miembros superiores, así como la regulación autónoma del cuerpo. Lo cual puede afectar la respiración, el ritmo cardíaco, la presión sanguínea, el control de temperatura, control de vejiga e intestino y la función sexual, y causar dolor crónico (Bickenbach et al., 2013). La lesión de médula espinal resulta en un agudo así como progresivo daño tisular, e inicia un número de respuestas regenerativas y de neuroprotección dentro del sistema nervioso dañado (Díaz-Galindo, 2015).

Existen diferentes aproximaciones experimentales para contrarrestar el efecto de LME, tal como el uso de factores neurotróficos, anticuerpos nogo-neutralizantes y moduladores del receptor de N-metil-D-aspartato (Thuret, Moon, & Gage, 2006). Se ha demostrado que la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y su análogo agonista sintético el acetato de leuprolida (AL) tienen propiedades neurotróficas en modelos experimentales de LME (Díaz-Galindo, 2015; Quintanar & Salinas, 2008). El receptor de este decapeptido ha sido identificado en neuronas de corteza cerebral, médula espinal y otros tejidos extrapituitarios (Quintanar, Salinas & González, 2007; 2009). Sin embargo, el acetato de leuprolida es menos susceptible a la proteólisis y tiene una mayor afinidad de unión a los receptores de GnRH que la hormona natural, incrementando así su actividad biológica (Periti, Mazzei & Mini, 2002). AL es usado en desórdenes del sistema reproductivo como el cáncer de próstata. Sin embargo, el tratamiento con AL ha demostrado un decremento de la severidad de los signos clínicos relacionados con la locomoción en ratas con encefalomiелitis autoinmune

experimental. También induce una significativa ganancia de peso junto con un incremento en la expresión de neurofilamentos y de la proteína básica de mielina, al igual que presenta un incremento en el diámetro axonal de la médula espinal (Guzmán-Soto, Salinas, Hernández-Jasso & Quintanar, 2012).

Algunas aproximaciones para el tratamiento de LME como la administración del factor de crecimiento de fibroblastos ácidos (aFGF) (Wu, Huang, Tsai, Chen & Cheng, 2008) que requieren de un procedimiento quirúrgico, o la administración de hormona liberadora de tirotropina (TRH) (Pitts, Ross, Chase & Faden, 1995) que se realiza vía intravenosa, resultan invasivas. La administración vía intramuscular del AL es un tratamiento no invasivo y es capaz de atravesar la barrera hemato-espinal. Es seguro de usar y con pocos efectos secundarios, siendo así una potencial alternativa para el tratamiento de LME (Quintanar, Díaz-Galindo, Calderón-Vallejo & Hernández-Jasso, 2016).

El objetivo de este estudio es realizar el análisis cinemático de la marcha en ratas con LME tratadas con AL, para dilucidar si el tratamiento con AL puede generar una mejora en el desempeño motor de la marcha en ratas con LME, que sea estadísticamente significativo en comparación con las no tratadas.

MÉTODOS Y MATERIALES

Animales

Dentro de este estudio se utilizaron 30 ratas Wistar hembras, de 8 meses de edad, con un peso entre 250-330 g. Los animales fueron tratados de acuerdo al Reglamento de Bienestar Institucional de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de Cuidado de Animales de Laboratorio de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. Los animales se mantuvieron bajo un ciclo luz/obscuridad de 12 horas a temperatura controlada. Se les proporcionó alimento y agua de grifo *ad libitum*.

Cirugía

Previo a la lesión de médula espinal, todas las ratas fueron ovariectomizadas, dado que estudios previos han reportado que el estrógeno y la progesterona pueden actuar como neuroprotectores (Samantaray, 2010; De Nicola, 2009). Los animales ovariectomizados fueron divididos aleatoriamente en tres grupos: cirugía falsa de LME (Sham; n=9), LME tratados con solución salina fisiológica (SS; n=11) y LME tratados con AL (AL; n=10). Si bien hay una amplia gama de eventos que resultan en una LME, más del 80% se debe a la contusión de la médula espinal y / o lesiones por compresión (Metz, Merkler, Dietz, Schwab & Fouad, 2000).

El modelo de rata de lesión medular por compresión fue establecido de acuerdo al método descrito anteriormente por Vanicky et al. (2001). Un catéter 2-French Fogarty (de 4mm de diámetro cuando el globo se encuentra inflado) fue insertado al nivel de T12 y se introdujo 1 cm en dirección craneal hasta el sitio donde se realizó la laminectomía. El balón del catéter fue inflado con 20 µL de cloruro de sodio al 0.9% por 5 minutos y después fue desinflado y removido. En el grupo Sham, el catéter fue introducido sin inflar la punta. Desde el día de la cirugía, se realizó vaciado manual de la vejiga al menos dos veces al día hasta que se reestableciera el control del reflejo vesical. Todos los animales fueron inyectados con penicilina una vez al día por 7 días y Neumelubrina una vez al día por tres días.

Tratamiento

A los animales del grupo AL se les administró acetato de leuprolida (Sigma, St. Louis, MO, USA; 10 µg/kg, i.m.) una vez al día por tres días consecutivos después de la LME. Después de eso, sólo una administración de la misma dosis cada cuatro días por 5 semanas. Las ratas del grupo de SS recibieron el mismo esquema de tratamiento pero con solución salina fisiológica al 0.9%.

Análisis cinemático de la marcha

El análisis cinemático dimensional es la técnica más popular de análisis de marcha en ratas. Este procedimiento es simple ya que sólo se requiere de una cámara para grabar el movimiento (Couto et al., 2008). El análisis cinemático se realizó al inicio (un día después de la cirugía de LME) y al final del tratamiento. Se identificaron cinco puntos anatómicos: cresta iliaca, el trocante mayor, la rodilla, el maléolo externo y el quinto metatarsiano. Para visualizarlos correctamente, las ratas fueron rapadas y marcadas en estos cinco puntos anatómicos con un marcador permanente en la pierna izquierda. El arreglo experimental, la frecuencia de muestreo y el análisis de video se realizaron de acuerdo a Díaz-Galindo et al. (2015). El ciclo de marcha es la unidad básica de medida en el análisis de marcha, este se divide en dos fases: soporte y balanceo. La fase de soporte se define desde el contacto inicial del talón con la superficie hasta que el pie deja de tener contacto con esta. La fase de balanceo se determina a partir de que el pie comienza su recorrido hacia adelante y termina cuando el talón toca de nuevo la superficie (Couto et al., 2008). Se tomaron tres ciclos de marcha de cada animal y se promediaron para obtener el valor reportado de las variables. En las ratas que contaban con un ciclo de marcha completo, la distancia entre dos contactos de talón consecutivos constituía la longitud de la zancada medida en centímetros. Para obtener la velocidad de zancada se utilizaron los valores de la longitud de zancada y la duración del ciclo de marcha. En algunas ratas, la lesión de médula espinal causó discapacidad motora restringiendo el desarrollo de caminata. El tiempo máximo de espera para que se llevará a cabo la marcha fue de 10 segundos. Las ratas que no se movieron antes de este periodo fueron retiradas y la duración del ciclo de marcha fue registrada como 10 segundos.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) con una prueba *post hoc* Dunnett utilizando el grupo LME + SS como grupo control. Se utilizó el software GraphPad Prism versión 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Los datos se expresan como la media ± SEM (error estándar de la media). Para ambas pruebas se consideró un nivel de confianza del 95%, esto es $P < 0,05$.

RESULTADOS

Todos los animales con lesión medular mostraban paraplejia en la primera prueba de análisis cinemático, sin embargo en la segunda evaluación se observó una diferencia significativa en la marcha del grupo AL y el grupo SS.

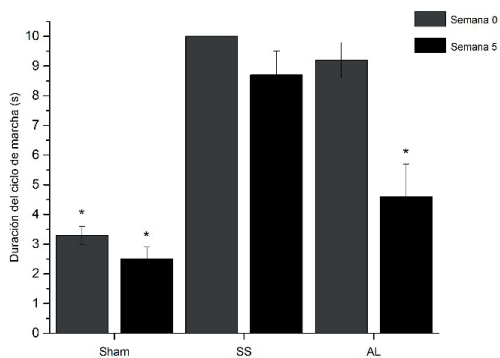


Figura 1. Duración del ciclo de marcha de tres grupos distintos de ratas con lesión de médula espinal.

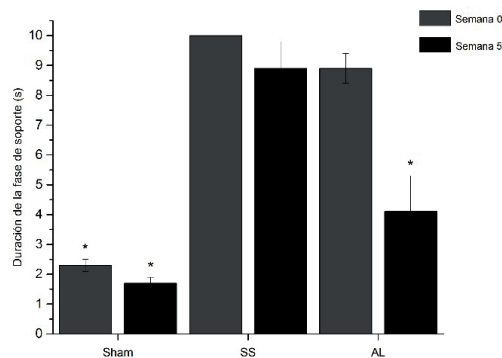


Figura 2. Duración de la fase de soporte de tres grupos distintos de ratas con lesión de médula espinal.

La duración del ciclo de marcha (figura 1) en el grupo AL decreció de 9.2 ± 0.6 s a 4.6 ± 1.1 s, mientras que en el grupo SS la duración del ciclo disminuyó de 10.0 ± 0.1 s a 8.7 ± 0.8 s. Esto describe una diferencia significativa entre ambos grupos durante la segunda evaluación. La duración de la fase de soporte (figura 2) disminuyó significativamente de la semana 0 a la semana 5 en el grupo AL, de 8.9 ± 0.5 cm a 4.1 ± 1.2 cm. Este mismo comportamiento se observó en la duración de la fase de balanceo (figura 3), en la que se tuvo un tiempo de 8.3 ± 0.1 s y 3.5 ± 1.4 s al inicio y al final del tratamiento, respectivamente. Este decremento significativo no se mostró en el resto de los grupos.

Las ratas que recibieron el tratamiento con AL tuvieron una longitud de zancada mayor en la evaluación final que al inicio de tratamiento (figura 4). La longitud de zancada aumentó de 1.9 ± 1.3 cm a 6.1 ± 1.4 cm. Aunque el grupo SS mostró un aumento en la longitud de la zancada, no se considera estadísticamente significativo. Esta recuperación espontánea puede deberse a que los axones que no se dañan después de la lesión son capaces de reorganizarse y recuperar parcialmente la función motora. Se ha estimado que si tan sólo 10 % de los tractos espinales descendentes son salvados durante una lesión, esto es suficiente para recuperar la función locomotora (Metz et al., 2000).

La velocidad de zancada en las ratas tratadas con AL aumentó de 1.7 ± 0.3 cm/s a 9.0 ± 2.3 cm/s. Esta variable fue significativamente distinta en el grupo AL en comparación con el grupo SS en la semana 5, comportamiento que no se observó en la semana 0. En el grupo Sham no hubo diferencia significativa tanto en la longitud como en la velocidad de la zancada, al inicio y al final del tratamiento. El decremento en las variables de duración de ciclo de marcha, fase de soporte y fase de balanceo, así como el aumento en la longitud y la velocidad de zancada, en las ratas con LME tratadas con LA, concuerda con los resultados previamente obtenidos por Díaz-Galindo et al. (2015) y Calderón-Vallejo et al. (2015), quienes utilizaron AL y GnRH en su tratamiento, respectivamente. Los animales tratados con AL tardaron menos tiempo en cada fase del ciclo de marcha, se desplazaron distancias más largas y viajaron a una mayor velocidad. Como menciona Díaz-Galindo (2015), todos estos resultados pueden interpretarse como un signo de recuperación de la actividad locomotora, comportamiento que no se observó en el grupo tratado con solución salina fisiológica.

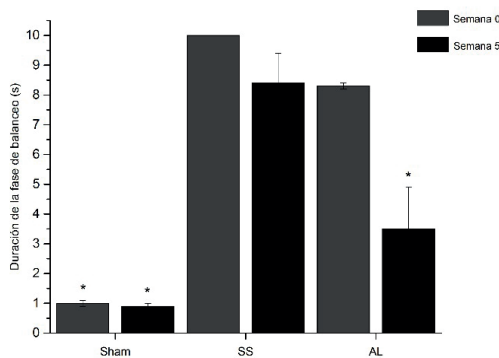


Figura 3. Duración de la fase de balanceo de tres grupos distintos de ratas con lesión de médula espinal.

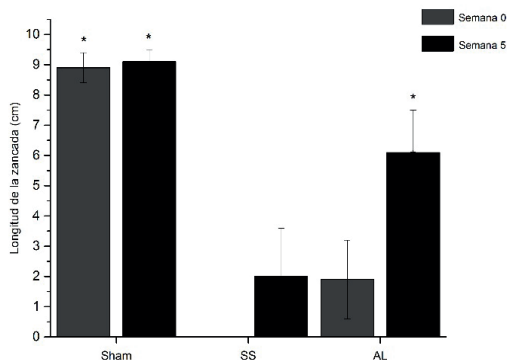


Figura 4. Longitud de zancada de tres grupos distintos de ratas con lesión de médula espinal.

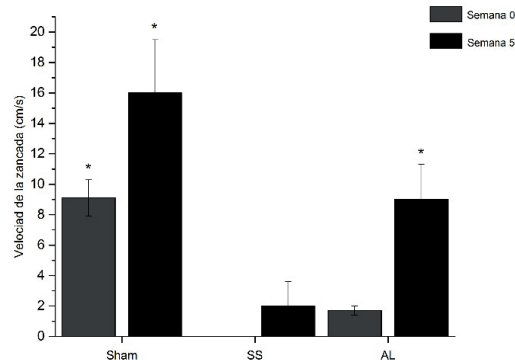


Figura 5. Velocidad de zancada de tres grupos distintos de ratas con lesión de médula espinal.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se pudo observar la recuperación locomotora en la marcha de un modelo animal de médula espinal lesionada tratado con acetato de leuprolida, significativamente diferente a la recuperación del grupo tratado

con solución salina fisiológica. Esta recuperación probablemente fue mediada a través de la activación de los receptores a GnRH, que se han descrito en la motoneuronas de la médula espinal; además de mecanismos como remielización, crecimiento de neuritas o incremento en la expresión de proteína de microfilamentos. Con los resultados de este estudio se reafirmaron las propiedades neurotrópicas del acetato de leuprolida.

Aunque los resultados obtenidos fueron satisfactorios, es necesario realizar un análisis cinemático más completo donde se consideren los patrones de ángulos en las articulaciones de cadera, rodilla y tobillo, para estudiar la calidad de la recuperación y descartar la ejecución de movimientos compensatorios durante la marcha que pudieran arrojar valores normales en las variables espacio-temporales.

BIBLIOGRAFÍA

- COUTO, P. A., FILIPE, V. M., MAGALHÃES, L. G., PEREIRA, J. E., COSTA, L. M., MELO-PINTO, P., BULAS-CRUZ, J., MAURÍCIO, A. C., GEUNA, S., VAREJÃO, A. S. (2008). "A comparison of two-dimensional and three-dimensional techniques for the determination of hindlimb kinematics during treadmill locomotion in rats following spinal cord injury" en *Journal of Neuroscience Methods*, Núm. 173, Vol. II, Agosto, [pp. 193–200].
- SALADIN, K. S. (2012). *Anatomía Fisiología. La unidad entre forma y función*, México, D.F.: Mc Graw Hill Education.
- BICKENBACH, J., BODINE, C., BROWN, D., BURNS, A., CAMPBELL, R., CARDENAS, D., CHARLIFUE, S.,... XIONG, X. (2013). *International Perspectives on Spinal Cord Injury*, Suiza: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data.
- QUINTANAR, J. L., DÍAZ-GALINDO, C., CALDERÓN-VALLEJO, D., HERNÁNDEZ-JASSO, I. (2016). "Clinical Effect of Leuprolide Acetate, an Agonist of GnRH, on Sensitive and Motor Function in a Patient with Chronic Spinal Cord Injury" en *Journal of Neurological Research*, Núm. 6, Vol. V-VI, [pp. 111-113].
- DÍAZ-GALINDO, C., GONZÁLEZ-GÓMEZ, B., SALINAS, E., CALDERÓN-VALLEJO, D., HERNÁNDEZ-JASSO, I., BAUTISTA, E., QUINTANAR, J. L. (2015). "Leuprolide acetate induces structural and functional recovery of injured spinal cord in rats" en *Neural Regeneration Research*, Núm. 10, Vol. XI, Agosto-Diciembre, [pp. 1819-1824].
- THURET, S., MOON, L. D., GAGE, F. H. (2006). "Therapeutic interventions after spinal cord injury" en *Nature Reviews Neuroscience*, Núm. 7, Vol. VIII, [pp. 628-643].
- QUINTANAR, J. L., SALINAS, E. (2008). "Neurotrophic effects of GnRH on neurite outgrowth and neurofilament protein expression in cultured cerebral cortical neurons of rat embryos" en *Neurochemical Research*, Núm. 33, Vol. VI, Junio [pp. 1051–1056].
- QUINTANAR, J. L., SALINAS, E., GONZÁLEZ, R. (2009) "Gonadotropin releasing hormone receptor in spinal cord neurons of embryos and adult rats" en *Neuroscience Letters*, Núm. 461, Vol. I, Septiembre [pp.21–24].
- QUINTANAR, J. L., SALINAS, E., GONZÁLEZ R. (2007) "Expression of gonadotropin-releasing hormone receptor in cerebral cortical neurons of embryos and adult rats" en *Neuroscience Letters*, Núm. 411, Vol. I, Enero, [pp. 22–25].
- CALDERÓN-VALLEJO, D., QUINTANAR-STEPHANO, A., HERNÁNDEZ-JASSO, I., JIMÉNEZ-HERNÁNDEZ, V., RUIZ-ORNELAS, J., JIMÉNEZ, I., QUINTANAR, J. L. (2015). "Functional and Structural Recovery of the Injured Spinal Cord in Rats Treated with Gonadotropin-Releasing Hormone" en *Neurochemical Research*, Núm. 40, Vol. III, Marzo, [pp. 455-462].
- GUZMÁN-SOTO, I., SALINAS, E., HERNÁNDEZ-JASSO, I., QUINTANAR, J. L. (2012). "Leuprolide acetate, a GnRH agonist, improves experimental autoimmune encephalomyelitis: a possible therapy for multiple sclerosis" en *Neurochemical Research*, Núm. 37, Vol. X, Octubre, [pp. 2190-2197].
- PERITI, P., MAZZEI, T., MINI, E. (2002). "Clinical pharmacokinetics of depot leuporelin" en *Clinical pharmacokinetics*, Núm. 41, Vol. VII, [pp. 485-504].
- SAMANTARAY, S., SRIBNICK, E. A., DAS, A., THAKORE, N. P., MATZELLE, D., YU, S. P., RAY, S. K.,... BANIK, N. L. (2010). "Neuroprotective efficacy of estrogen in experimental spinal cord injury in rats" en *Annals of the New York Academy of Science*, Núm. 1199, Junio, [pp. 90–94].
- DE NICOLA, A. F., LABOMBARDA, F., DENISELLE, M. C., GONZÁLEZ, S. L., GARAY, L., MEYER, M., GARGIULO, G.,... SCHUMACHER, M. (2009). "Progesterone neuroprotection in traumatic CNS injury and motoneuron degeneration" en *Frontiers in Neuroendocrinology*, Núm. 30, Vol. II, Julio, [pp. 173–187].
- WU, J. C., HUANG, W. C., TSAI, Y. A., CHEN, Y. C., CHENG H. (2008). "Nerve repair using acidic fibroblast growth factor in human cervical spinal cord injury: a preliminary Phase I clinical study" en *Journal of neurosurgery. Spine*, Núm. 8, Vol. III, Marzo, [pp. 208-214].
- PITTS, L. H., ROSS, A., CHASE, G. A., FADEN, A. I. (1995). "Treatment with thyrotropin-releasing hormone (TRH) in patients with traumatic spinal cord injuries" en *Journal of neurotrauma*, Núm. 12, Vol. III, Junio, [pp. 235-243].
- METZ, G. A., MERKLER, D., DIETZ, V., SCHWAB, M. E., FOUAD, K. (2000). "Efficient testing of motor function in spinal cord injured rats" en *Brain Research*, Núm. 883, Vol. II, Noviembre, [pp. 165–177].
- VANICKY, I., URDZÍKOVÁ, L., SAGANOVÁ, K., CÍZKOVÁ, D., GÁLIK, J. (2001) "A simple and reproducible model of spinal cord injury induced by epidural balloon inflation in the rat" en *Journal of Neurotrauma*, Núm. 18, Vol. XII, Diciembre, [pp. 1399-1407].

REDUCCIÓN DE CROMO HEXAVALENTE MEDIANTE CEPAS DE *YARROWIA LIPOLYTICA*

Guaní Sánchez Gloria Dhení¹ y Morales Vargas Adan Topiltzin²

RESUMEN

En los últimos años, *Yarrowia lipolytica* ha surgido como una importante levadura no convencional con relevancia biológica y aplicaciones biotecnológicas significativas. Esta levadura se ha utilizado en la remediación de diversos ambientes contaminados y también se aplica en la degradación de diferentes desechos. Las sales de cromo hexavalente Cr(VI) se utilizan ampliamente en procesos industriales del acero, pinturas, colorantes y cerámicas, la forma de eliminación de metales de los efluentes industriales suele ser por precipitación química en medio básico, para formar hidróxidos, sin embargo, el cromo (VI) no forma hidróxidos insolubles y es necesario recurrir a otros procedimientos. El presente trabajo pretende mostrar el uso de cepas de *Yarrowia lipolytica* como agente reductor del cromo (VI) a cromo (III), para ello se estudió el efecto del cromo hexavalente sobre el crecimiento de la levadura. El estudio fue realizado bajo un rango de concentraciones de 0 a 150 ppm de cromo hexavalente, se observó que las altas concentraciones del cromo no inhiben el crecimiento de algunas cepas de *Yarrowia lipolytica*.

ABSTRACT

In the recent years, *Yarrowia lipolytica* has emerged as an important non-conventional yeast with significant biological relevance and biotechnological applications. This yeast has been used in the remediation of various polluted environments and is also applied in the degradation of different wastes. The salts of hexavalent chromium are widely used in industrial processes of steel, paint, dyes and ceramics, the form of removal of metals from industrial effluents is usually by chemical precipitation in basic medium, to form hydroxides, however, chromium (VI) does not form insoluble hydroxides and it is necessary to resort to other procedures. The present work aims to show the use of *Yarrowia lipolytica* strains as a reducing agent of chromium (VI) to chromium (III), to do this was studied the effect of hexavalent chromium on the growth of yeast. The study was conducted under a concentration range of 0 to 150 ppm of hexavalent chromium, it was observed that high concentrations of chromium did not inhibit the growth of *Yarrowia lipolytica*.

Palabras clave: *Yarrowia Lipolytica*, Cromo (VI), crecimiento, biorremediación.

INTRODUCCIÓN

El cromo es un metal que está presente en un 0.035 % en la corteza terrestre y puede formar compuestos con distintos estados de oxidación, siendo el más alto el cromo (VI). Los estados de oxidación (IV) y (V) son poco frecuentes, mientras que los estados más estables son (II) y (III). El cromo (III) es un nutriente esencial para los seres humanos, en los que promueve la acción de la insulina (Albert, 2002) y participa en el metabolismo de los lípidos. El cromo (VI) es un elemento tóxico y tiene gran facilidad para atravesar las membranas biológicas. El cromo hexavalente inhalado se ha reconocido como carcinógeno humano, fácilmente produce sensibilización en la piel y en ojos expuestos de manera crónica se observa conjuntivitis, lagrimeo y dolor. En condiciones naturales, las formas trivalentes y hexavalentes son interconvertibles, siendo el cromo (VI) la forma más abundante en las aguas, puesto que el cromo (III) puede ser ocasionalmente absorbido o precipitado. El cromo hexavalente se utiliza para la producción de acero inoxidable, colorantes textiles, conservación de la madera, de cuero curtido, y como recubrimientos anticorrosión, la forma de eliminación de metales de los efluentes industriales suele ser por precipitación química en medio básico, para formar hidróxidos, sin embargo, el cromo (VI) no forma hidróxidos insolubles y es necesario recurrir a otros procedimientos (Boluda, 2013).

Yarrowia lipolytica es un hongo ascomiceto aerobio y dimórfico que se puede encontrar en forma de levadura, pseudomicelio y micelio verdadero, o una mezcla de estos (Barth y Gaillardin, 1996). Este hongo en su forma de levadura se puede aislar fácilmente de productos como queso, yogurt y una gran variedad de productos lácteos. Debido a su incapacidad de crecer en temperaturas superiores a 34°C se le considera no patógeno en humanos. *Yarrowia lipolytica* presenta una serie de características que le hacen un interesante objeto de estudio. Por ejemplo, se le puede manipular fácilmente en condiciones de laboratorio y su genoma está actualmente secuenciado. Su dimorfismo lo convierte en un buen modelo de diferenciación y su capacidad de crecer en sustratos inusuales como alcanos o ácidos grasos y la de secretar proteínas y ácidos orgánicos hacen de este organismo un modelo atractivo en la industria de la biotecnología (Beckerich y Gaillardin, 1998). Se caracteriza por degradar de manera muy eficiente los sustratos hidrófobos e inusuales (Bankar, 2009). Esta levadura tiene un buen potencial para secretar un conjunto de proteínas dentro del medio en cantidades interesantes para aplicaciones industriales tales

como la producción heteróloga de proteínas, bioconversiones de ácidos grasos o biorremediación de contaminantes ambientales. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar la tolerancia a Cr(VI) en una colección de cepas de *Y. lipolytica*.

MÉTODOLÓGÍA

Microorganismos y condiciones de cultivo

Con la finalidad de evaluar la tolerancia de una colección de cepas *Yarrowia lipolytica* la presencia de Cr(VI) se desarrolló el siguiente procedimiento. 31 cepas de *Y. lipolytica* fueron utilizadas en este proyecto, fueron aisladas en trabajos anteriores y fueron donadas por el laboratorio de diversidad e interacciones microbianas del Instituto Tecnológico Superior de Irapuato (ITESI). Las cepas fueron sembradas en medio sólido YPD 65g/L (Yeast Extract-Peptone-Dextrose, Agar difco) e incubadas a 28°C hasta que se observó crecimiento. Se sembraron las cepas identificadas como 01, 10 y 26 en medio líquido YPD e incubadas a 28°C y 150 rpm para la obtención de biomasa.

Cultivos provenientes de una sola colonia fueron incubados toda la noche con agitación constante a 28 °C en medio YPD. Las células fueron cosechadas por centrifugación y resuspendidas en el mismo volumen de agua destilada estéril, posteriormente las células se lavaron 2 veces con agua destilada estéril y por último resuspendidas en un pequeño volumen de agua destilada (1/4 del volumen original) y almacenadas a 4 °C durante toda la noche. Para determinar la concentración de células de los cultivos en medio líquido, se midió de la densidad óptica (OD_{600nm}), para lo cual se usó un espectrofotómetro marca HACH modelo DR 3900 Esta suspensión de células fue ajustada a una OD_{600nm} de 0.1

Evaluación cualitativa de tolerancia a Cr(VI)

Para determinar si las cepas de *Y. lipolytica* son capaces de tolerar Cr(VI) fueron sembradas en medio sólido YNB 0.67g/L (Yeast Nitrogen Base, difco); agar, 15 g/L adicionado con 0, 10, 20, 50 y 100 ppm de Cr(VI), inoculando con ayuda de un palillo estéril por ralladura a partir de una sola colonia e incubadas a 28°C por 5 días, monitoreando el crecimiento diariamente.

Curva dosis efecto de la tolerancia a Cr(VI)

Con la finalidad de evaluar el límite de tolerancia a Cr(VI) se probaron diferentes concentraciones de este ion. La suspensión de células colectadas y lavadas como se mencionó anteriormente fueron ajustadas a una OD_{600nm} de 0.1, lo que corresponde a 1×10^8 cel/mL, aproximadamente. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas decimales y 40 μ L de estas diluciones fueron colocadas sobre las placas de agar YNB adicionadas con 0, 25, 50, 75, 100 y 150 ppm de Cr(VI). Las placas fueron incubadas a 28°C y se monitoreo el crecimiento durante 2 semanas.

RESULTADOS

Inicialmente, el interés que se atribuyó a *Y. lipolytica* derivó de su capacidad fisiológica para utilizar polialcoholes, ácidos orgánicos, e hidrocarburos de cadena larga como sustrato. En la actualidad se sabe que esta levadura es capaz de producir diversos compuestos orgánicos de elevado valor industrial, entre los cuales se encuentran: ácidos orgánicos, enzimas y proteínas; por ello el estudio de este hemiascomiceto ha generado gran interés tanto en el campo de la biotecnología como en el científico. A la fecha no se ha reportado el uso de *Y. lipolytica* para la biosorción y reducción de iones Cr (VI), aunque este hongo puede sobrevivir al estrés metálico y acumular cobre, cobalto, cadmio, níquel, zinc y oro. En este estudio se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de cromo hexavalente (0, 25, 50, 75, 100 y 150 ppm) sobre el crecimiento de cepas de *Y. lipolytica*. Se evaluó de manera cualitativa la capacidad de tolerar Cr(VI) de 31 cepas de *Y. lipolytica*, la cepa 26 fue capaz de desarrollarse en el medio con Cr(VI) hasta con 150 ppm de este metal. Lo cual sugiere que esta cepa es capaz de tolerar altas concentraciones de este ion.

Bajas concentraciones de cromo hexavalente no afectaron el desarrollo de las levaduras, las células crecieron en el medio YNB/AGAR en ausencia (control) o presencia de diferentes concentraciones de cromo VI (0, 25, 50 y 75 ppm). Por el contrario, altas concentraciones de cromo VI (100 y 150 ppm) causaron una reducción en el desarrollo de las células, las cepas 01 y 10 fueron afectadas por la elevada concentración de cromo por lo tanto no mostraron ningún crecimiento sobre el medio, por otro lado, la cepa 26 mostró resistencia **Fig. 1**.

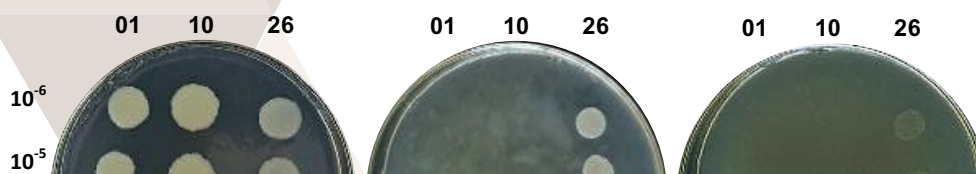


Figura 1. Respuesta de cepas de *Y. lipolytica* ante Cr (VI). De una suspensión de células con una alícuota de 1×10^8 cel/mL se realizaron diluciones seriadas decimales y 40 μ L de estas diluciones fueron colocadas sobre las placas de agar YNB adicionadas con 0 (A), 25 (B) y 50 (C) y ppm de Cr(VI).

DISCUSIÓN

El estudio realizado por Ashok y colaboradores (2009) se evaluó la capacidad de dos aislados marinos de *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 y 3590 las cuales se sometieron a condiciones de Ph ácido 1.0 y concentración inicial de 50 ppm de Cr (VI) en medio YPED (Yeast extract, 3.0; peptone, 5.0; agar,) se observó que NCIM 3589 y 3590 muestran una absorción específica de iones Cr (VI) de $63.73 \pm 1.3 \text{ mg g}^{-1}$ a una concentración de 950 ppm y $46.09 \pm 0.23 \text{ mg g}^{-1}$ a 955 ppm respectivamente. Cabe resaltar que se evaluó el uso de la biomasa como medio adsorbente en este estudio y se desconoce si estas cepas son capaces de reducir Cr(VI). De acuerdo con los resultados obtenidos se concluye que la cepa 26 *Y. lipolytica* podría ser utilizada como un eficiente adsorbente para la remoción de iones de Cromo (VI).

CONCLUSIONES

De las 31 cepas de *Y. lipolytica* que fueron utilizadas en este proyecto y de acuerdo con las condiciones experimentales llevadas a cabo, se observó que la respuesta de crecimiento de las cepas ante la presencia de Cr(VI) se ve afectada y la cepa 26 fue capaz de crecer en altas concentraciones 150 ppm, de acuerdo con los resultados el crecimiento de esta cepa se vio afectado ya que este fue disminuyendo conforme aumentó la concentración.

Por otro lado, las concentraciones bajas (25-75 ppm) de cromo (VI) no alteran el crecimiento de las cepas cuando se encuentra en un rango de concentración similar al de efluentes industriales.

BIBLIOGRAFÍA

- ALBERT A. L. (2002). *Toxicología ambiental*, Limusa.
- BANKAR A., KUMAR A., ZINJARDE S. (2009). *Environmental and industrial applications of Yarrowia lipolytica*, Biotechnological Applications p.p. 847-865.
- BARTH G. y GAILARDIN C. (1996). *The dimorphic fungus Yarrowia lipolytica*. In: *Genetics, Biochemistry, and Molecular Biology of Non-Conventional Yeasts*. K. Wolf (Ed.) Springer Verlag, Heidelberg, p.p. 313-388.
- BECKERICH J. M., BOISRAME-BBAUDEVIN A., y GAILLARDIN C. (1998). *Yarrowia lipolytica: a model organism for studies of protein secretion*, Int. J. of Microbiology. p.p. 123-130
- BOLUDA B. N. (2013). *Eliminación de cromo (VI) procedente de efluentes industriales*, Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Alicante.
- ASHOK V. B. AMEETA R. K. ZINJARDE S.S. (2009). *Removal of chromium (VI) ions from aqueous solutions by adsorption onto two marine isolates of Yarrowia lipolytica*. Vol.170 [p.p.487-494]
- FARSHAD D. H. (2014). *Biotechnological Applications of the Yeast Yarrowia Lipolytica*, Springer.
- FICKERS P., BENETTI P. H., WACHÉ Y., MARTY A., MAUERSBERGER S., SMIT M. S y NICAUD J. M. (2005). *Use of hydrophobic substrate by yeast Yarrowia lipolytica, and its potential applications*, FEMS Yeast Res. p.p. 527-543.
- NORMA MEXICANA (NMX-AA-044-SCFI-2014) Análisis de Agua. - Medición de Cromo Hexavalente en Aguas Naturales, Salinas, Residuales y Residuales Tratadas- Método de Prueba (Cancela a la NMX-AA-044-SCFI-2001).



AGRADECIMIENTOS

A mis padres por su amor, ejemplo y comprensión, que me guían a cada momento de mi vida.

A mi profesor Dr. Adan Topiltzin Morales Vargas por la paciencia con la que me guío a lo largo del proyecto, por compartir sus conocimientos y su amor a la ciencia.

A mi compañera Oatna Georgina García Salas su valiosa aportación al proyecto

A la Universidad de Guanajuato por que permitió en desarrollo de este trabajo

Efectos antinociceptivos de tilifodiolide un compuesto aislado de *Salvia tiliifolia Vahl* (Lamiaceae)

Jorge Luis Gutiérrez Pérez¹ y Ángel Josabad Alonso Castro²

¹(Universidad de Guanajuato, División de Ciencias Naturales y Exactas, departamento de farmacia, noria alta s/n, colonia noria alta, C.P. 36050, Guanajuato, Guanajuato, j.l.gutierrezperez@ugto.mx)

²(Universidad de Guanajuato, División de Ciencias Naturales y Exactas, departamento de farmacia, noria alta s/n, colonia noria alta, C.P. 36050, Guanajuato, Guanajuato, angeljosabad@ugto.mx)

RESUMEN

Se analizó el efecto antinociceptivo de tilifodiolide (TFD), un terpeno obtenido del extracto de acetona de las partes aéreas de *Salvia tiliifolia* Vahl. Este compuesto se evaluó a diferentes dosis (10 mg/kg, 50 mg/kg, 100 mg/kg y 200 mg/kg) en un modelo *in vivo* de dolor visceral. Los efectos del TFD sobre la coordinación motora se evaluaron con la prueba del rotarod. Se obtuvo la dosis efectiva 50 (DE₅₀) de 32 mg/kg para TFD. Con este valor se analizó el posible mecanismo de acción antinociceptiva del TFD, el cual se realizó mediante la administración conjunta del TFD con compuestos usados como inhibidores de diferentes vías de señalización involucradas en el proceso de dolor. La naloxona, un antagonista opiáceo, casi inhibió el efecto antinociceptivo del TFD, lo que sugiere que TFD podría usar los receptores opiáceos como un mecanismo de acción antinociceptiva en un modelo de dolor visceral. Esto sugiere a esta vía como posible mecanismo de acción antinociceptiva del TFD. Para el test del rotarod se demuestra que el TFD no afecta la coordinación motora en dosis de 10, 50 y 100 mg/Kg en comparación con el vehículo.

ABSTRACT

The antinociceptive effect of tilifodiolide (TFD), a terpene obtained from the acetone extract of the parts of *Salvia tiliifolia* Vahl, was analyzed. This compound was evaluated at different doses (10 mg/kg, 50 mg/kg, 100 mg/kg, and 200 mg/kg) in an *in vivo* model of visceral pain. The effects of TFD on the coordination motor were evaluated with the rotarod test. The effective dose 50 (ED₅₀) of 32 mg/kg was obtained for TFD. With this value, the possible antinociceptive mechanism of action of TFD was analyzed, which was carried out by the joint administration of TFD with compounds as inhibitors of different signaling pathways involved in the pain process. Naloxone, an opioid antagonist, almost inhibited the antinociceptive effect of TFD, suggesting that TFD could use opioid receptors as an antinociceptive mechanism of action in a visceral pain model. This suggests this pathway as a possible antinociceptive mechanism of action of TFD. For the rotarod test in the demonstration that PDT does not affect motor coordination in doses of 10, 50 and 100 mg/kg, compared to vehicle

PALABRAS CLAVE

Salvia tiliifolia Vahl, TFD, antinocicepción, mecanismo de acción, DE₅₀.

INTRODUCCIÓN

En México el uso de plantas con efectos medicinales se debe a la estrecha relación que existe entre la biodiversidad, la historia y la cultura (Osuna Torres et al., 2005). En nuestro país, las plantas medicinales constituyen uno de los principales recursos terapéuticos tanto en el medio en el suburbano como en el medio rural, donde la población carece de recursos de atención médica en muchas regiones de nuestro país (Osuna Torres et al. 2005; Ocegueda et al. 2005). A pesar del avance de la tecnología, el uso de las plantas medicinales es una alternativa para muchas familias, por ello la importancia del estudio continuo de nuevas especies herbólicas, que puedan presentar propiedades curativas que sea benéfico a la salud. Así mismo, los antiguos pobladores de nuestro territorio han desarrollado una de las herbolarias más complejas del mundo debido a la riqueza cultural y étnica (Ocegueda et al. 2005). Desde la antigüedad, varias sociedades han recurrido a la naturaleza, principalmente a plantas como fuentes médicas y de alimento. Actualmente un gran porcentaje de la población mundial, en particular países en vías de desarrollo, utilizan plantas medicinales para hacer frente a las necesidades primarias de salud. Según la OMS, el 80% de la población mundial hace uso de remedios naturales y medicinas tradicionales (Roy Chaudhury, 1992, OMS, 1993). Una de las plantas usadas en la medicina tradicional mexicana es *Salvia tiliifolia* Vahl. (Lamiaceae), la cual es conocida también con los siguientes nombres: alheli, alhucema (Antioquia), flor de abejón, salvia, venturosa, yerba clara. Se trata de un subarbousto caracterizado por presentar una altura entre 30 y 70 cm; tallo leñoso y cuadrangular en la base con numerosas ramificaciones; hojas opuestas, enteras glandulares o rugosas, finamente dentadas. Su distribución se ha registrado en Chiapas, Chihuahua, Coahuila, Distrito Federal, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Querétaro, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz (Villaseñor y Espinosa, 1998). *Salvia tiliifolia* es empleada en la medicina veterinaria para eliminar las cataratas de los ojos en los caballos (García Cruz, 2007). En humanos se usa para eliminar abscesos, y en el tratamiento de paperas, dolor de cabeza, para calmar los nervios, entre otros padecimientos (Molina-Mendoza, et al. 2012).

Los objetivos principales de este trabajo es evaluar el mecanismo por el cual actúa el TFD ejerce sus efectos antinociceptivos, mediante la administraron conjunta de TFD con diferentes inhibidores como yohimbina, glibenclamida, L-NAME y Naloxona. Además de evaluar si el TFD provoca daños en la coordinación motora.

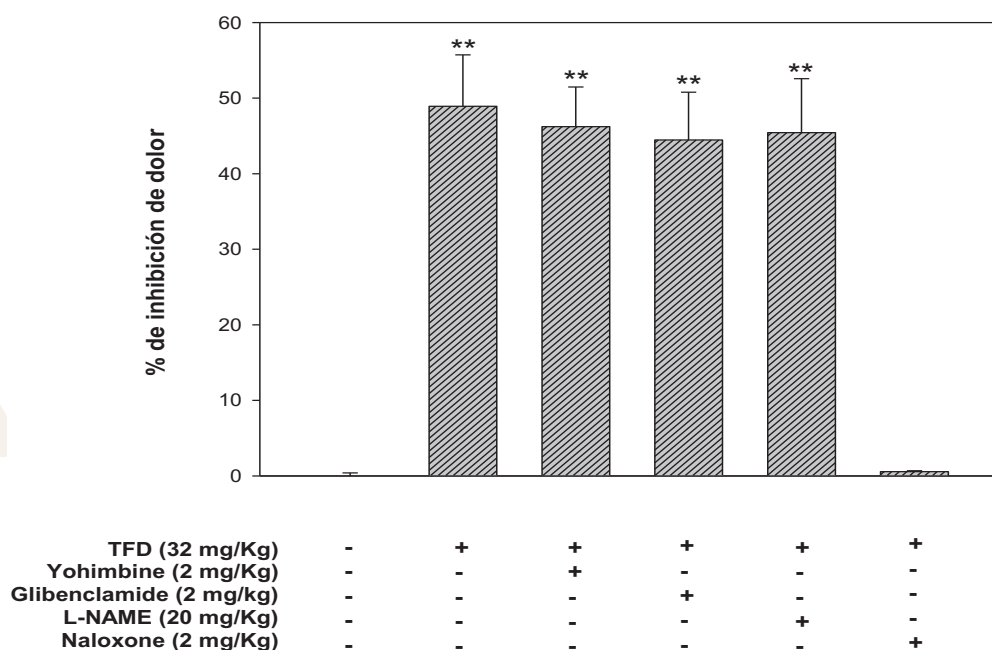
METODOLOGÍA

Se utilizaron distintos grupos de ratones ($n=8$, cada uno). Se calculó la dosis efectiva 50, obtenida por regresión lineal, mediante los datos obtenidos en los experimentos de la prueba del ácido acético. Para el experimento se administraron diferentes inhibidores (Yohimbine (2mg/kg), glibenclamida (2mg/kg), L-NAME (20mg/kg) y Naloxona (2mg/kg).) 15 minutos antes de la administración del compuesto TFD para determinar el posible mecanismo de acción antinociceptiva del TFD. La dosis usada de cada inhibidor se muestra en la gráfica 1. Posteriormente se realizó la prueba del ácido acético la cual consiste en administrar 4 ml/kg de una solución de ácido acético al 1% en el peritoneo de los ratones. Se cuenta el número de contorsiones abdominales durante 30 minutos. La prueba de rotarod consiste en evaluar la coordinación motora mediante el tiempo que el ratón es capaz de mantenerse sobre un cilindro que gira a una velocidad determinada (Melo et al, 2011). De dos a tres días antes de iniciar el test, se debe realizar una prueba de adaptación donde los ratones deben permanecer 4 minutos en el equipo rotarod para ser considerados en el experimento. Una hora antes del inicio del test, a distintos grupos de ratones se les administro clonazepam (1.5 mg/kg p.o.), como vehículo se le administro solución salina, o TFD a dosis de 10, 50 y 100 mg/Kg vía oral. Posteriormente, se contó el tiempo en segundos que se mantendrán los ratones en el cilindro giratorio a una velocidad de 5 rpm (Melo et al, 2011).

RESULTADOS.

A partir de los datos obtenidos se calculó la dosis efectiva 50 (DE_{50}) obteniendo 32mg/kg para el compuesto TFD. Para el posible mecanismo de acción antinociceptivo del TFD, se utilizó su DE_{50} . Esta dosis fue administrada de manera conjunta con 4 inhibidores diferentes, cada uno administrado individualmente, Yohimbine, glibenclamida, L-NAME y Naloxona. Se observó una inhibición del efecto antinociceptivo del TFD debido a la coadministración de naloxona. Por el contrario, la coadministración de TFD con yohimbina, glibenclamida o L-NAME no afectaron la actividad antinociceptiva del TFD (Grafica 1).

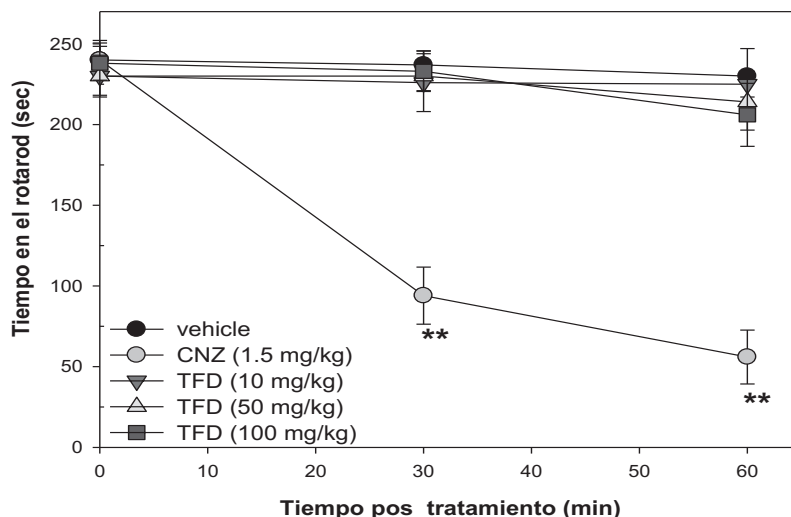
Gráfica 1. Mecanismo de acción ácido acetico TFD



Grafica 1. Administración de los cuatro inhibidores observando el efecto con TFD.

Mediante los datos obtenidos en el test de rotarod se demuestra que el TFD no afecta la coordinación motora, como se observa en el grafica 2, para las dosis de 10, 50 y 100 mg/Kg junto con el vehículo, las ratones mantienen una tendencia similar en el tiempo que se mantuvieron en el aparato rotarod. Con respecto al porcentaje entre el vehículo y el control positivo (clonazepam) se observa que en los tiempos de 30 y 60 min hay una inhibición del 60 % y 75.6 % respectivamente de inhibición del SNC.

Grafica 2. test del rotarod



Grafica 2. Test rotarod, evolución del daño de la coordinación motora de TFD.

DISCUSIÓN.

La Yohimbina actúa como un agonista competitivo selectivo para los receptores alfa-2-adrenérgicos potencializando la liberación de catecolaminas endógenas (Shannon et al., 2000). La glibenclamida actúa sobre canales de potasio dependiente de ATP (Valiollah et al., 2011), el L-NAME (Nitro-levogiro arginina metil ester) a dosis bajas (20mg/kg) se ha demostrado que es un inhibidor sobre la vía de la arginina-óxido nítrico-Guanosin Monofosfato cíclico (arginina-NOGMPc) (Duarte et al., 2000). La naloxona se ha utilizado para antagonizar los efectos opioides (Capuano et al., 2010). En el presente trabajo se comparó estos inhibidores con el compuesto TFD observando que la yohimbina, la glibenclamida y el L-NAME no inhiben el efecto antinociceptivo del TFD. Por el contrario, la administración de TFD con Naloxona inhibió el efecto antinociceptivo del TFD. Por lo cual, los receptores opioides podrían participar en el mecanismo de antinocicepción del TFD. Sin embargo, se sugiere realizar más experimentos para comprobar esta hipótesis. Asimismo, se sugieren más experimentos de tipo crónico para evaluar los efectos antinociceptivos del TFD a largo plazo. Para la prueba de la coordinación motora se demuestra que el TFD no provoca daño aparente en sistema nervioso central, ya que después de la administración del TFD a diferentes dosis los ratones permanecieron en el equipo de rotarod igual que el vehículo. Por el contrario, el clonazepam, una benzodiacepina que actúa como agonista de los receptores benzodiacepinicos potenciando el efecto del neurotransmisor inhibidor GABA, resultando un aumento de la inhibición del sistema nervioso central, si afecto la coordinación motora de los ratones.

CONCLUSIONES

Los receptores opioides podrían participar en el mecanismo de antinocicepción del TFD. Así mismo TFD no afecta la coordinación motora de los ratones.

BIBLIOGRAFÍA

- Capuano A., De Corato A., Treglia M., Tringali G., Currò D., Dello Russo C., Navarra P., (2010.) "Efectos antinociceptivos periféricos de dosis bajas de naloxona en un in vivo e in vitro modelo de nocicepción trigémino" en *Neurofarmacología*, Vol. 58, Núm. 4-5, [pp. 784-792].
- CRUZ GARCIA R.A. 2007. "Plantas medicinales de nueve comunidades en la frontera entre chignahuapan, ixtacamaxtitlán y aquixtla, Puebla." tesis de licenciatura. universidad de chapingo. [pp. 351].
- I. D. G. Duarte., S. H. Ferreira. (2000) "L-NAME causes antinociception by stimulation of the arginine-NO-cGMP pathway". En *Los mediadores inflam.* Vol. 9, Núm 1 [pp. 25-30].
- Inventario de recursos curativos en centros de expendio formales e informales: tumbes. Hugo E. Delgado Sumar. Serie: Apuntes de Medicina Tradicional N° 78 Ayacucho, Marzo 1990.
- Melo MS. Santana MT. Guimarães AG. Siqueira RS. Sousa DP. Santos MR. et al. Bioassay-guided evaluation of central nervous system effects of citronellal in rodents. *Braz J Pharmacogn.* 21:697-703.2011.
- Molina mendoza j.l, Galvan villanueva r., patíño siciliano a., fernandez nava r., (2012). "Plantas medicinales y listado florístico preliminar del municipio de huasca de ocampo, hidalgo, México" en *polibotanica*, núm 34 [pp 239-271].
- OCEGUEDA S., MORENO E, KOLEFF P. 2005. Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica. *CONABIO. Biodiversitas* 62:12-15.
- Omar Jaret Espinosa Soto. (2014). "Determinación de la actividad antioxidante, antiinflamatoria y de la enzima Mieloperoxidasa con la aplicación de los extractos orgánicos de *Cymbopogon citratus*, *Momordica charantia*,

Moussonia deppeana y Salvia tiliifolia en ratón. Facultad de Química Farmacéutica Biológica.: Universidad Veracruzana”.

OSUNA TORRES L., TAPIA PÉREZ M. E., AGUILAR CONTRERAS A (2005). Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales. Estudio etnobotánico, fotoquímico y farmacológico.

Shannon HE., Lutz EA., (2011) “Yohimbine produces antinociception in the formalin test in rats: involvement of serotonin(1A) receptors” en Psycholofarmacology., Vol 149, Núm, [pp. 93-97]

Valiollah Hajhashemi., Bahareh Amin., (2011). “Effect of glibenclamide on antinociceptive effects of antidepressants of different classes” en Clinics., Vol. 66, Núm. 6, [pp. 321-322].

Vicente Tene., Omar Malagon., Paola Vita Finzi., Giovanni Vidari., Chabaco Armijos., Tomas Zaragoza. (2006). “An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchipe, Ecuador. Journal of Ethnopharmacology” en Science Direct Base de datos. Vol. 111, Num. [pp. 63-81.]

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

EVALUACIÓN DE LA TOLERANCIA A CR VI EN CEPAS DE HONGOS ENDÓFITOS

González Bravo María Guadalupe¹ y Morales Vargas Adan Topiltzin²

RESUMEN

El término de metal pesado se refiere a cualquier elemento químico metálico que tenga una relativa alta densidad y sea tóxico o venenoso en concentraciones incluso muy bajas. Los ejemplos de metales pesados o algunos metaloides incluyen el mercurio (Hg), cadmio (Cd), arsénico (As), cromo (Cr), talio (Tl), y plomo (Pb), entre otros. No pueden ser degradados o destruidos fácilmente de forma natural o biológica ya que no tienen funciones metabólicas específicas para los seres vivos. Los metales pesados pueden incorporarse a un sistema de abastecimiento de agua por medio de residuos industriales que son vertidos sin previos tratamientos, los que posteriormente se depositan en lagos, ríos y distintos sistemas acuíferos. En la presente investigación, se evaluó la tolerancia a Cr VI en cepas de hongos endófitos por medio de su crecimiento, utilizando una solución base de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$). Con el objetivo de posteriormente poder utilizar las cepas tolerantes al Cromo para la biorremediación de hábitats contaminados con Cr VI.

Palabras clave: hongos endófitos, Cr VI, biorremediación.

ABSTRACT

The term heavy metal refers to any metallic chemical element that has a relatively high density and is toxic or poisonous in even very low concentrations. Examples of heavy metals or some metalloids include mercury (Hg), cadmium (Cd), arsenic (As), chromium (Cr), thallium (Tl) and lead (Pb), among others. They cannot be easily degraded or destroyed naturally or biologically since they do not have specific metabolic functions for living beings. Heavy metals can be incorporated into a water supply system by industrial waste that is discharged without previous treatments, which are then deposited in lakes, rivers and different aquifer systems. In the present investigation, the tolerance to Cr VI in strains of endophytes was evaluated by means of its growth, using a base solution of potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$) and four dilutions were made. To be able to use chrome tolerant strains for the bioremediation of Cr VI contaminated habitats.

Keywords: Endophytic fungi, Cr VI, bioremediation.

INTRODUCCIÓN

La existencia de hongos endófitos se conoce desde el siglo XIX y el término “endófito” fue propuesto por primera vez por de Bary en 1896 (Bary et al. 1866). Los endófitos son organismos que habitan los órganos de las plantas y su infección es generalmente discreta. Los tejidos infectados son al menos transitoriamente asintomáticos (Stone et al. 2000). En general, los endófitos colonizan el tejido vegetal a través de la zona de las raíces, flores, hojas, tallos y/o los cotiledones (Kobayashi y Palumbo 2000), pueden localizarse en el punto de entrada o extenderse por toda la planta de manera sistémica. Estudios recientes han demostrado que muchos endófitos son resistentes a los metales pesados; además, son capaces de aumentar el crecimiento de las plantas y/o de degradar los contaminantes orgánicos (Chen et al. 2010; Shin et al. 2011; Luo et al. 2011). Los endófitos resistentes a metales pesados reportados pertenecían a una amplia gama de taxones; *Microspheeropsis*, *Mucor*, *Phoma*, *Alternaria*, *Peyronellaea*, *Steganosporium* y *Aspergillus* (Li et al. 2011).

Debido a las actividades industriales, como la producción de acero, minería, cemento y curtido de pieles, ciertas zonas de la República Mexicana tienen altos niveles de cromo en suelo y agua (Armienta-Hernández y Rodríguez, 1995). En presencia de la materia orgánica, el Cr (VI) presente en aguas y suelos es reducido a Cr (III); sin embargo, las altas concentraciones del ion en estado hexavalente pueden sobrepasar esta capacidad de reducción, lo que impediría su adecuada eliminación (Cervantes et al., 2001). Pese a que el cromo no es un elemento esencial para hombres y animales, niveles elevados de este metal (15 mg en agua de ríos y 0.10 mg /L en agua potable) resultan tóxicos en estos seres vivos (Cárdenas et al. 2011).

En el contexto de la biorremediación, la capacidad de biosorción de los microorganismos resistentes al cromo podría combinarse con su capacidad para reducir el cromo. Las cepas resistentes al cromo de *Aspergillus spp.* (Paknikar et al. 1993) y *Candida spp.* (Ramírez et al. 2000), aisladas de ambientes contaminados con Cr, han mostrado actividad reductora de Cr (VI). En el presente trabajo se evaluó la capacidad para tolerar Cr VI en una colección de cepas de hongos endófitos aislados de lirio acuático (*Eichornia crassipes*).

MÉTODOS Y MATERIALES

Hongos endófitos

Las 20 cepas de hongos endófitos que se utilizaron en este proyecto fueron aisladas en trabajos anteriores del Lirio acuático (*Eichornia crassipes*) en el Canal “Ing. Antonio Coria” ubicado en la ciudad de Irapuato, Gto. Y fueron donadas por el laboratorio de diversidad e interacciones microbianas del Instituto Tecnológico Superior de Irapuato (ITESI). Las cepas fueron sembradas en medio PDA e incubadas a 28°C hasta que se observó crecimiento.

Evaluación de la tolerancia a Cr VI

Se preparó una solución de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) con una concentración de 1000 ppm, para lo cual se pesaron 2.8289 g de $K_2Cr_2O_7$ y se aforó a un litro. Se estableció un control y cuatro tratamientos 50, 150, 200 y 300 ppm de Cr VI. Se preparó medio PDA y utilizó la solución de dicromato de potasio de 1000 ppm para llevar el medio a las concentraciones de cada tratamiento. El medio estéril se vació en cajas Petri, después con ayuda de un horador se tomó micelio del hongo y se inoculó un disco de micelio de 7mm de diámetro. Posteriormente se rotularon las cajas y se llevaron a una incubadora a una temperatura de 28 °C. El crecimiento de los hongos se monitoreó midiendo el área de crecimiento mediante el programa imagetool (Dove et al. 1996).

RESULTADOS

Una gran variedad de microorganismos han sido identificados con la capacidad de remover Cr(VI), estos microorganismos se han aislado de una gran variedad de ambientes, tanto en ambientes contaminados como no contaminados. Algunos de los estudios relacionados con la remoción de Cr(VI) a partir de mecanismos de adsorción reportan el uso de biomasa muerta; el mecanismo mediante el cual se une el anión cromato es a través de la interacción de este, con grupos con carga negativa (por ejemplo: aminas) (Ghachtouli et al. 2005). Park y colaboradores (2005) reportan la reducción de Cr(VI) a Cr(III) por *Aspergillus niger* mediante un mecanismo no enzimático. Para evaluar la capacidad de tolerar distintas concentraciones de Cr(VI), se usó medio PDA adicionado con Cr(VI) a distintas concentraciones. Inicialmente se evaluaron 10 cepas de hongos endófitos, se sembraron en medio PDA y en los cuatro tratamientos medio PDA adicionado con 50, 150, 200 y 300 ppm de Cr VI, mientras que para las siguientes 10 cepas de hongos endófitos se sembraron en el medio control y en dos tratamientos 50 y 150 ppm de Cr(VI), debido a que, con las primeras cepas solo uno de los hongos creció. El crecimiento fue monitoreado diariamente, sin embargo, fue notorio hasta después de una semana de haber sido sembrados. Se tomaron fotos para posteriormente cuantificar el crecimiento del hongo, utilizando el software ImageTool para medir su área. De los 20 hongos evaluados el hongo H9 creció en medio que contenía hasta 300ppm, Fig 1.

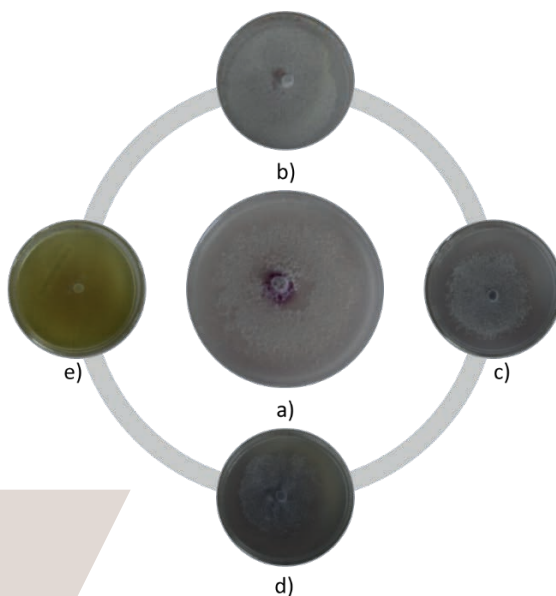


Figura 1 – Hongo H9 en Cr (VI). a) 0 ppm, b) 50 ppm, c) 150 ppm, d) 200 ppm, e) 300 ppm

En la figura 1 se puede apreciar el monitoreo de crecimiento del hongo H9. Como se puede observar en la figura a) el micelio del hongo es blanco y cubre la mayor parte de la caja Petri. En las figuras c) y d) se puede observar que el crecimiento del hongo tiene un área similar, mientras que en la figura e) se observa que el crecimiento fue muy pequeño en comparación con nuestra figura a) que corresponde al control. Después de monitorear el crecimiento del hongo por medio de fotografías se midió el área de crecimiento con ayuda del software ImageTool, obteniendo una mejor apreciación de cuanto fue el crecimiento de los hongos.

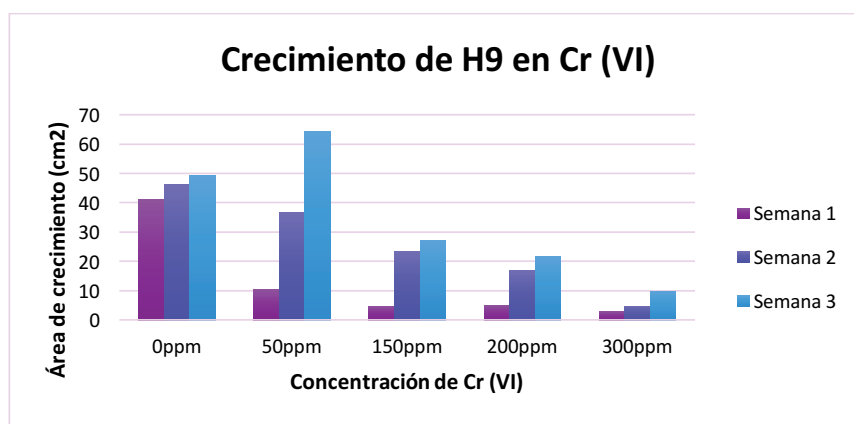


Figura 2. Gráfica de concentración de Cr (VI) y área de crecimiento.

En la figura 2 se observa el área de crecimiento del hongo endófito H9, durante las semanas que fue monitoreado. En 0 ppm tuvo el mayor crecimiento durante las primeras dos semanas. Mientras que en 50 ppm tuvo un buen crecimiento entre la segunda y tercera semana, siendo incluso mayor que el del control con respecto a la tercera semana. También en la gráfica se puede observar que el crecimiento en 150 ppm y 200 ppm fue similar, aunque después se observó que el hongo creció más en 150 ppm. En 300 ppm fue donde se obtuvo la menor área de crecimiento.

De las 10 cepas que se sembraron posteriormente, 5 de ellas crecieron en el medio PDA con Cr (VI), demostrando así su capacidad de tolerancia. Estas cepas fueron identificadas para mejor manejo de los datos como: H5, H15, H33, H112 y H120.

DISCUSIÓN

La mayoría de las especies microbianas son sensibles a Cr(VI), pero algunas de ellas son capaces de resistir o tolerar altos niveles del ion cromato. La capacidad de algunos hongos de interactuar de forma directa con diferentes formas de Cr, lo hace atractivos desde un punto de vista de la biotecnología ambiental. Como se puede observar en la figura 6 al comparar los tratamientos 150, 200 y 300 ppm se ve claramente como su crecimiento fue menor en comparación con el de 0 ppm. De manera interesante se observó que el tratamiento de 150 ppm en la tercera semana superó su crecimiento en comparación con el de 0 ppm. Aunque después de medir el área de crecimiento se concluye que tiene una mejor tolerancia en 50, 150, y 200 ppm, ya que en 300 ppm su crecimiento fue menor. Como se pudo apreciar en las figuras c) y d) se produjo un cambio en la coloración del agar, pasando de amarillo a café oscuro, esto podría ser debido a alguna sustancia que el hongo secreta por el estrés producido por el cromo. De acuerdo con un estudio realizado en la Universidad de San Luis Potosí en México, se aisló de una zona cerca de la universidad un hongo resistente y capaz de remover cromo hexavalente, la cepa fue identificada como *Paecilomyces* sp. La biomasa fúngica remueve eficientemente Cromo (VI) en solución y puede utilizarse para descontaminar nichos acuáticos contaminados (Cárdenas et al. 2011). Resultando importante este estudio ya que se podrían encontrar otras cepas que puedan realizar la remoción del Cromo (VI) en otros hábitats contaminados.

CONCLUSIONES

De las 20 cepas de hongos endófitos sembradas seis crecieron en Cr (VI): H5, H9, H15, H33, H112 y H120, siendo H9 la que presentó la mayor tolerancia al crecer en altas concentraciones de Cromo, aunque el área de crecimiento va disminuyendo conforme la concentración de Cromo aumenta.

Con respecto a las 5 cepas de hongos que también crecieron en el control y dos tratamientos, sería importante sembrarlos en los dos tratamientos restantes para ver si también presentan tolerancia a esas concentraciones de Cr.

BIBLIOGRAFIA

- I. Abollino, O., Aceto, M., Malandrino, M., Mentaste, E., Sarzanini, C. and Barberis, R. 2002. Distribution and Mobility of Metals in Contaminated Sites. Chemometric Investigation of Pollutant Profiles. Environmental Pollution, 119: 177.
- II. Armienta-Hernández, M. y R. Rodríguez Castillo, *Environmental exposure to Chromium compounds in the valley of León, México*, Environmental Health Perspectives: 103, 47- 51 (1995).
- III. Bary A. (1866). Morphologie und Physiologie der Pilze. Flechten und Myxomyceten. Engelman. Hofmeister's Handbook of physiological Botany, Vol. 2, Leipzig.
- IV. Cárdenas-González, Juan F, y Acosta-Rodríguez, Ismael. (2011). Remoción de Cromo Hexavalente por el Hongo *Paecilomyces* sp. Aislado del Medio Ambiente. *Información tecnológica*, 22(1), 9-16.
- V. Cervantes, C, J. y otros 6 autores, *Interactions of chromium with microorganisms and plants*, FEMS Microbiology Review 25, 333-347 (2001).
- VI. Chen Y, Peng Y, Dai C, Ju Q (2011) Biodegradation of 4-hydroxybenzoic acid by *Phomopsis liquidambari*. Appl Soil Ecol 51:102–110
- VII. Dove BS, Wilcox CD, McDavid WD, Greer DB (1996). ImageTool (Versión 3.0) [Aplicación portátil] Descargado de <http://compdent.uthscsa.edu/dig/itdesc.html>

- VIII. García, I. and Dorronsoro, C. 2005. Contaminación por Metales Pesados. En Tecnología de Suelos. Universidad de Granada. Departamento de Edafología y Química Agrícola. <http://edafologia.ugr.es>.
- IX. Joutey, N. T., Sayel, H., Bahafid, W., y El Ghachtouli, N. (2015). Mechanisms of hexavalent chromium resistance and removal by microorganisms. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 233* (pp. 45-69). Springer International Publishing.
- X. Kobayashi DY, Palumbo JD (2000) Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. In: Bacon CW, White JF (eds) *Microbial endophytes*. Marcel Dekker, New York, pp 199–236
- XI. Li HY, Li DW, He CM, Zhou ZP, Mei T, Xu HM (2011) Diversity and heavy metal tolerance of endophytic fungi from six dominant plant species in a Pb-Zn mine wasteland in China. *Fungal Ecol.* doi:10.1016/j.funeco.2011.06.002
- XII. Lucho, C.A., Álvarez, M., Beltrán, R.I., Prieto, F. and Poggi, H. 2005a. A multivariate analysis of the accumulation and fractionation of major and trace elements in agricultural soils in Hidalgo State, Mexico irrigated with raw wastewater. *Environmental International*, On Line: 0160-4120-D 2004 doi:10.1016/j.envint.2004.08.002.
- XIII. Luo S, Chen L, Chen J, Xiao X, Xu T, Wan Y, Rao C, Liu C, Liu Y, Lai C, Zeng G (2011) Analysis and characterization of cultivable heavy metal-resistant bacterial endophytes isolated from Cdhyperaccumulator *Solanum nigrum* L. and their potential use for phytoremediation. *Chemosphere* 85:1130–1138
- XIV. Paknikar, K.M. and Bhide, J.V. (1993) Aerobic reduction and biosorption of chromium by a chromate resistant *Aspergillus* sp. In: *Biohydrometallurgical Technologies* (Torma, A.E., Apel, M.L. and Brierley, C.L., Eds.), pp. 237-244. The Minerals, Metals and Materials Society, Warrendale, PA.
- XV. Ramírez-Ramírez, R., Calvo-Méndez, C., Avila-Rodríguez, M. and Gutiérrez-Corona, J.F. (2000) Chromate resistance and reduction in a yeast strain isolated from industrial waste discharges. In: *Environmental Engineering and Health Sciences, Section 4: Environmental Engineering Application* (Raynal, J.A., Nuckols, J.R., Reyes, R. and Ward M., Eds.), pp. 437-445. Water Resources Publication, LCC, Englewood, CO, USA.
- XVI. Shin M, Shim J, You Y, Myung H, Bang K, Cho M, Kamala-Kannan S, Oh B (2011) Characterization of lead resistant endophytic *Bacillus* sp. MN3-4 and its potential for promoting lead accumulation in metal hyperaccumulator *Alnus firma*. *J Hazard Mater.* doi:10.1016/j.jhazmat.2011.11.010
- XVII. Stone JK, Bacon CW, White JF (2000) An overview of endophytic microbes: endophytism defined. In: Bacon CW, White JF (eds) *Microbial endophytes*. Marcel Dekker, New York, pp 3–29.

CARACTERIZACION DE UN MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES EN RATA.

Mario Iván Arenas López¹ y Karla Susana Vera Delgado.²

Resumen.

La Diabetes Mellitus Tipo 2 (DMT2), es considerada actualmente una epidemia mundial, ocupando los primeros lugares de morbi-mortalidad. Los estudios sobre los mecanismos fisiopatológicos relacionados a la DMT2 se realizan en animales, siendo aún controversial la clasificación de la DM en dichos modelos. Se llevó a cabo un estudio experimental donde se caracterizó un modelo experimental de diabetes en ratas de cuatro semanas de edad, mediante la inducción con Estreptozotocina (STZ). Se formaron cuatro grupos experimentales separados por sexo, por dosis del fármaco y dieta alta en glucosa. En todos los grupos se evaluó la glucemia, peso y tolerancia a la glucosa en el grupo con dieta alta glucosa como parámetros del modelo.

Palabras clave: Diabetes mellitus, glicemia, células β , STZ.

Abstract.

Type 2 Diabetes Mellitus (DMT2) is considered a worldwide epidemic, occupying the first places of morbidity and mortality. Studies of the complications related to T2DM are performed in animals, however, there is still controversy about the classification of DM in such models. An experimental study was conducted in which a diabetic model in four-week-old rats was characterized by induction with Streptozotocin (STZ). Four experimental groups were formed by sex, drug dose and high glucose diet. Glucose, weight and glucose tolerance were evaluated in all groups with high glucose as parameters of the model.

Introducción.

La diabetes mellitus es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizado por hiperglucemia, resultante de defectos en la secreción y/o acción de la insulina, alterando el metabolismo de los hidratos de carbono, lípidos y proteínas en los órganos diana. Esta patología se asocia con daños a largo plazo, disfunción y fracaso de diversos órganos, especialmente en ojos, riñones, corazón y vasos sanguíneos (American Diabetes Association, 2015).

Clasificación de la diabetes

La diabetes se puede clasificar de forma general en las siguientes categorías:

1. Diabetes tipo 1: debido a la destrucción de las células β (conduce a la deficiencia absoluta de insulina).
2. Diabetes tipo 2: defecto progresivo de la secreción de la insulina y/o resistencia a la hormona.
3. Diabetes mellitus gestacional (DMG): diagnosticada en el segundo o tercer trimestre de embarazo.
4. Tipos específicos de diabetes debido a otras causas.

Para comprender los mecanismos que provocan las alteraciones en los diversos órganos se han desarrollado modelos de diabetes en animales, un breviarío de estos modelos se describe a continuación.

Tabla 1.- Resumen de la clasificación de los modelos animales de diabetes

1. Modelos espontáneos
1.1. Modelos análogos
- La rata Goto-Kakizaki (GK)
- El ratón obeso de Nueva Zelanda (NZO)
- El ratón KK
- <i>Psammomys obesus</i> (rata israelí de la arena)
- La rata OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rat)
1.2. Modelos intrínsecos
- El ratón <i>db/db</i>
- El ratón <i>ob/ob</i>
- El ratón <i>Agouti</i>
- La rata Zucker (<i>fa/fa</i>)
2. Modelos inducidos
2.1. Inducción hormonal
2.2. Administración de fármacos
2.3. Manipulación genética

*Modelos análogos. - Rata GK, desarrollo anormal de células β por exposición a altos niveles de azúcar; Ratón NZO elevado peso y aumento de masa corporal; ratón KK glicoproteína que predispone a obesidad y diabetes; rata israelí de la arena, aumento en niveles de proinsulina; rata OLETF mal funcionamiento de las vías de regulación. Modelos intrínsecos. - Ratón *ob/ob* resistentes a leptina; ratón *db/db* deficientes de leptina; Ratón *agouti* daño en el gen *agouti*; rata Zucker mutación "fatty" dándole fenotipo obeso.*

Entre los modelos de diabetes en roedores empleados para estudiar los eventos bioquímicos y morfológicos que ocurren durante y después de la inducción de un estado diabético, los utilizados con mayor frecuencia son aquellos generados por la administración de fármacos diabéticos; sin embargo, actualmente es controversial el tipo de diabetes que desarrolla el animal. Entre los agentes utilizados para la inducción de diabetes en los animales son la aloxona y la STZ, este último es un derivado de la nitrosourea aislada del *Streptomyces achromogenes* (Ariaz Dias & Balibrea, 2007). La acción de la estreptozotocina en las células β se acompaña por alteraciones características de las concentraciones de insulina y glucosa en sangre.

¹ Universidad de Guanajuato, División de Ciencias Naturales y Exactas, Departamento de Farmacia, Noria Alta S/N, colonia Noria Alta, C.P: 36050, Guanajuato, Guanajuato, mi.arenaslopez@ugto.mx

² Universidad de Guanajuato, Departamento de Ciencias Aplicadas al Trabajo, Eugenio Garza Sada 572, Lomas Campestre, Lomas del Campestre Sección 2, C.P: 37150, León, Guanajuato, ksvera@ugto.mx

Experimentos recientes han demostrado que la razón principal de la muerte de células β inducida por STZ es la alquilación de ADN. Dado que es un donante de óxido nítrico (NO), el cual se ha encontrado que provoca la destrucción de las células β del islote pancreático por daño en el ácido desoxirribonucleico (ADN). La participación del NO en el efecto citotóxico de STZ se ha confirmado en varios experimentos. Existe evidencia que la STZ genera especies reactivas de oxígeno, que contribuyen a la fragmentación del ADN y evoca otros cambios en las células. La formación de aniones superóxido es el resultado tanto de la acción sobre mitocondrias como actividad incrementada de xantina oxidasa (Szkuduelski, 2001).

Las células β del páncreas captan de forma rápida a la haloxona, esta absorción rápida se ha propuesto como una de las características que determinan la diabetogenicidad de este fármaco. Otro mecanismo es la formación de especies reactivas de oxígeno fragmentando el ADN de las células β expuestas al fármaco.

El objetivo del presente proyecto fue caracterizar un modelo experimental de diabetes inducida por STZ en ratas Wistar de cuatro semanas de edad, para posteriormente compararlo con modelos ya reportados.

Materiales y Métodos

Animales de experimentación

Se utilizaron ratas Wistar de cuatro semanas de edad, las cuales se mantuvieron en condiciones controladas en cuanto a dieta, ambiente ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) y ciclos de luz y oscuridad (12 horas).

Inducción de diabetes con Estreptozotocina.

Previo a la inducción se obtuvieron los pesos y las glucosas basales de los roedores con un glucómetro digital (Accu - Check Softclix, Roche Diagnostics), posterior a doce horas de ayuno. Los animales se separaron en cuatro grupos:

Grupo 1. Seis hembras, aplicación de 100 mg/Kg de STZ vía i.p.

Grupo 2. Seis machos, administración de 100 mg/ Kg de STZ vía i.p.

Grupo 3. Seis machos, aplicación de 60 mg/Kg de STZ vía i.p.

Grupo 4. Seis machos, administración de 60 mg/Kg de STZ vía i.p en combinación con una dieta alta en azúcar (cambio del agua potable normal por agua con una concentración del 30% de azúcar comercial) (Asie Sadeghi, 2017).

La STZ (Sigma Aldrich, S030, Saint Luis, MO, USA), se diluyó en solución buffer fosfato salino (PBS, Dulbecco's, (Sigma Aldrich, D1408, Saint Luis, MO, USA) ajustando el pH a 4.5 con ácido cítrico 0.5 M, esta solución se administró por vía intraperitoneal. El desarrollo de la diabetes se verificó 24 hr. posterior a la administración 100 mg/kg de STZ, cuando la glucemia capilar fue ≥ 250 mg/dl.

Prueba de tolerancia a la glucosa oral. (CTGO)

Esta prueba se llevó a cabo en los grupos tratados con la dosis 60 mg/kg de STZ. Después de un ayuno nocturno de 12 horas se realizó una toma de muestra de glucemia basal, como se describió anteriormente, posteriormente se administró a la rata 2 g/kg de peso de glucosa a través de una sonda orogástrica. La cuantificación de glucosa se determinó en tiempos definidos: 30 minutos, 60 minutos y 120 minutos posteriores a la administración.

Resultados.

Se evaluaron en total 22 animales, Los niveles de glucosa fueron monitoreados de manera constante, después de la inducción con STZ, las mediciones se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Promedio de glucosa $\pm$ desviación estándar.

Grupo	Glc basal (mg/dl)	Glc 24 hora (mg/dl)	Glc 7 días (mg/dl)	Glc 14 días (mg/dl)	Glc 21 días(mg/dl)
G1	103.5 $\pm$ 20.97	432.83 $\pm$ 217.40	488 $\pm$ 111.54	445.16 $\pm$ 132.95	472.5 $\pm$ 108.48
G2	92.17 $\pm$ 4.62	314.67 $\pm$ 196.20	383.17 $\pm$ 125.98	361.5 $\pm$ 202.38	393.67 $\pm$ 186.07
G3	163.6 $\pm$ 13.96	135 $\pm$ 12.79	130.4 $\pm$ 5.03	121 $\pm$ 9.17	126.33 $\pm$ 12.10
G4	85.4 $\pm$ 4.98	127.2 $\pm$ 4.15	128.8 $\pm$ 9.04	118.4 $\pm$ 5.32	118.8 $\pm$ 8.61

G1: seis hembras tratadas con 100 mg/Kg de STZ, G2: seis machos tratados con la misma dosis que el grupo anterior. G3: cinco machos tratados con 60 mg/ Kg y G4: cinco machos tratados con 60 mg/ Kg y dieta alta en glucosa.

Se llevó a cabo el registro del peso de cada una de las ratas, con la finalidad de evaluar la pérdida de peso observada en la patología (Tabla 3).

Tabla 3.- Porcentaje de ganancia de peso $\pm$ desviación estándar.

Grupo	Peso inicial	% Ganancia 7 días	% Ganancia 14 días	% Ganancia 21 días
G1	64.62 $\pm$ 10.63	24.93 $\pm$ 10.50	38.68 $\pm$ 10.36	2.74 $\pm$ 7.64
G2	60.38 $\pm$ 3.44	44.83 $\pm$ 15.86	49.21 $\pm$ 17.38	18.45 $\pm$ 9.67
G3	68.36 $\pm$ 7.62	74.16 $\pm$ 4.37	26.71 $\pm$ 2.05	25.89 $\pm$ 1.35

G4

$\frac{10.24 \pm 2.99}{2.99}$

65.92 ± 7.20

17.73 ± 1.30

23.32 ± 2.10

G1: seis hembras tratadas con 100 mg/Kg de STZ, G2: seis machos tratados con la misma dosis que el grupo anterior, G3: cinco machos tratados con 60 mg/ Kg y G4: cinco machos tratados con 60 mg/ Kg y dieta alta en glucosa.

En los grupos 1 y dos se observa una menor ganancia en el peso al compararla con los grupos 3 y 4, lo anterior se puede asociar a las glucemias capilares mostradas en la tabla dos, en los grupos con menor incremento de peso son aquellos que tienen cifras altas en la glucemia capilar.

A continuación, se muestran las curvas de tolerancia a la glucosa oral realizadas a los grupos que no desarrollaron diabetes después del tratamiento respectivo con STZ. Cada punto de la curva viene representado por el promedio de las mediciones de glucosa, 3 (Grupo machos + 60 mg/ Kg de STZ) y 5 (Grupo machos + 60 mg/Kg de STZ y dieta alta en azúcar) respectivamente. (Ver figura 2).

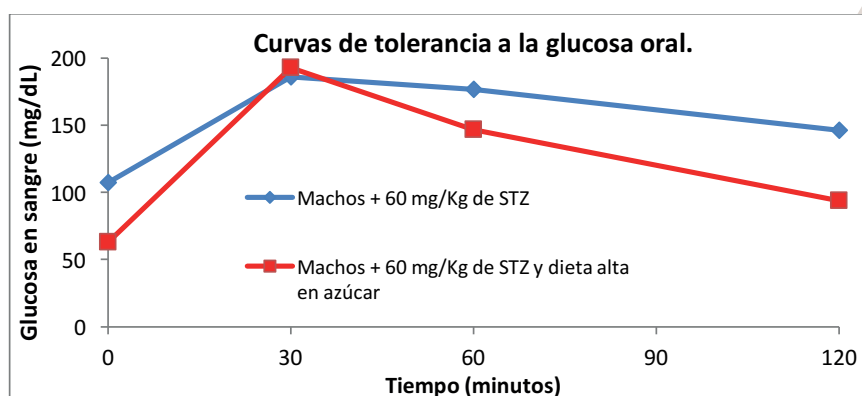


Figura 2. Resultados de dos CTGO en los grupos con administración de STZ a una dosis de 60 mg/ Kg, además uno de ellos complementado con dieta alta en azúcar. Las CTGO fueron realizadas 10 días después de la administración del fármaco.

Discusión.

El desarrollo de un modelo que refleje las características metabólicas y la historia de la diabetes humana ha sido siempre un reto. Este proyecto tuvo como objetivo caracterizar el modelo animal de diabetes, y evaluar las posibles interacciones entre el sexo, la dosis de fármaco administrado y la ingesta de alta glucosa. La estreptozotocina ha sido ampliamente utilizada para inducir la diabetes en modelos animales y depende de la dosis y la vía de administración (Hayashi K, 2006), coincidiendo con nuestros resultados, ya que se observó que en los dos grupos tratados con una dosis intraperitoneal de 100 mg/ kg de STZ vía intraperitoneal, todos los roedores desarrollaron diabetes, mientras que en los grupos tratados con 60 mg/kg, no hubo desarrollo de la enfermedad. En este estudio el porcentaje de mortalidad estuvo por debajo de lo reportado por otros investigadores (10-30%) (Bonner-Weir S., 1981), no reportándose decesos debidos a la patología.

La resistencia a la insulina en el modelo mediante la administración de una solución glucosada al 30%, requiere de 14 semanas, por lo que se continua su evaluación. Cabe señalar que los animales no presentaron aumento de peso (comparando con el grupo control), después de 21 días de monitoreo. Además, al comparar los resultados en la curva de tolerancia a la glucosa oral (CTGO), se observa una disminución de la glucosa mayor en los animales que consumían la solución alta glucosa, lo anterior puede relacionarse a estados hiper-insulinémicos, condicionados por el consumo de bebidas azucaradas. Con base a los hallazgos, se consideró alargar el monitoreo para corroborar los datos.

Conclusiones.

Con base en los resultados obtenidos, podemos concluir lo siguiente, acerca de la inducción del modelo diabético en ratas Wistar jóvenes:

1. Las ratas hembras tienen glucemias capilares mayores que los machos.
2. El modelo no corresponde con la diabetes tipo uno, los animales sobreviven sin necesidad de insulina.
3. Como se ha mencionado en el presente reporte, la inducción diabética se demostró que es dependiente de la dosis, al demostrar diferencias muy claras en los grupos tratados con la dosis de 100 mg/Kg respecto a aquellos a los que se les administro 60 mg/Kg.
4. Después de 21 días de monitoreo, la ingesta de una solución glucosada del 30% no condujo en primera instancia a la ganancia de peso, pero si tiene efecto en la prueba de tolerancia a la glucosa.

Bibliografía.

1. American Diabetes Association. (Enero de 2015). Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes Care*, Volumen 38, S8-S16.

2. Ariaz Dias, J., & Balibrea, J. (2007). Modelos animales de intolerancia a la glucosa y diabetes tipo 2. *Nutricion Hospitalaria*, 22(2), 160-168.
3. Asie Sadeghi, M. B. (2017). Synergistic Effects of Ad-Libitum Low-Dose Fructose Drinking and Low-Dose. *Acta Medica Iranica*, 304-310.
4. Bonner-Weir S., T. D. (1981). Responses of neonatal rat islets to streptozotocin limited B-cell regeneration and hyperglycemia. *Diabetes*, 64-69.
5. Hayashi K, K. R. (2006). Strain differences in the diabetogenic activity of streptozotocin in mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 1110-1119.
6. Szkudelski, T. (2001). The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in. *Physiological Research, Volumen 50*, 5336-546.
7. A. Akbarzadeh, D. N. (2007). Induction of diabetes by streptozotocin in rats. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 60-64.
8. Abeeleh, M. A. (2009). Induction of Diabetes Mellitus in Rats Using Intraperitoneal. *European Journal of Scientific Research*, 398-402.
9. Marathe, R. P. (2006). A split dose regimen of streptozotocin to induce diabetes. *Indian Journal of Pharmacology*, 432-433.

A continuación, se representan los datos mostrados en la tabla 1.

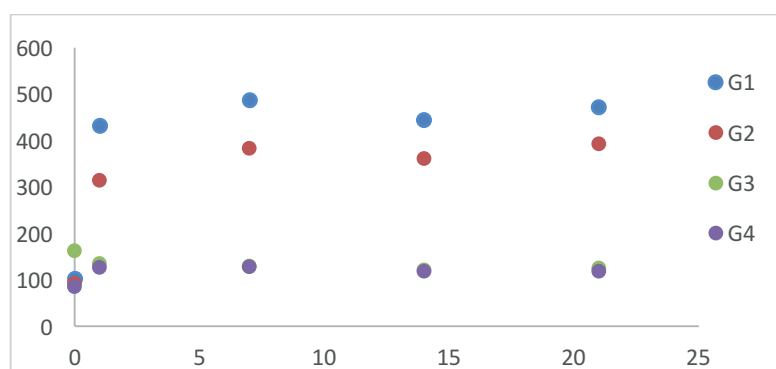


Figura 1. Resultados de las mediciones de glucosa posteriores a la inducción con STZ.

COMPLEJOS DE Cu(I) CON LIGANTES SACNAC EN CATÁLISIS

Acevedo González Reynaldo (1), López Jiménez Jorge Albino (2)

1 Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato. r.acevedogonzalez@ugto.mx

2 Departamento de Química, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato. albinol@ugto.mx

RESUMEN

En este trabajo se describe la aplicación de compuestos de Cu(I), dos complejos triméricos, en la catálisis de la benzilazida con fenilacetileno, química clic, obteniéndose buenos resultados. De igual manera, se probaron estos compuestos en la reacción de Heck.

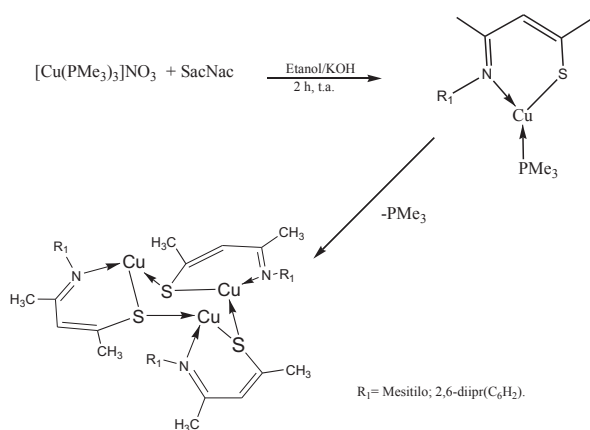
ABSTRACT

Two trimeric Cu(I) complexes has been applied at the catalysis of benzylazide with phenylacetylene, click chemistry, with good results. Also, these compounds were tested in the Heck reaction.

Palabras Clave: Cobre, trimeros, catálisis, química, clic.

INTRODUCCIÓN

La catálisis de los elementos de transición es una de las herramientas más poderosas que disponen los químicos para el desarrollo de procesos más limpios y sustentables. El uso de diferentes familias o grupos de ligantes para proteger el centro metálico o para modular su reactividad ha sido objeto de estudio durante más de 40 años y muy importante para el desarrollo de la catálisis. Las especies catalíticamente activas pueden ser ya sea generados in situ sobre la reacción del propio metal con precursores de ligantes, o alternativamente, de complejos bien definidos. Mientras que las estrategias in situ son usualmente consideradas como más amigables, las últimas logran mejores controles de las especies presentes en el medio de la reacción, y generalmente evitan la necesidad de exceso de ligantes o reactivos para optimizar la catálisis [1]. Las reacciones de cicloadición 1,3-dipolares, han atraído mucho la atención de los investigadores en los últimos 20 años. Éstas reacciones generan una gran variedad de heterociclos de cinco miembros de una manera rápida, reproducible y eficiente [2,3]. Las reacciones entre una azida y un alquino terminal es una de las cicloadiciones más populares, y producen 1,2,3-triazoles los cuales tienen una gran importancia como agentes antivirales y antimicrobianos [4]. Hace algunos años iniciamos es estudio de nuevos ligantes conteniendo al menos un átomo de azufre donador. Estos ligantes son derivados de los muy ampliamente conocidos acac (acetilacetatos), los SacNac (N-acetil-tioacetatos)[5]. Recientemente, en nuestro grupo de trabajo, hemos desarrollado una serie de complejos de Cu(I) conteniendo ligantes SacNac [6]. En este trabajo, se propone



Esquema 1. Ruta de síntesis del trimero $[Cu(SacNac)_3]_3$.

MÉTODOS Y MATERIALES

Los reactivos y disolventes utilizados fueron marca Sigma–Aldrich y KEM, y fueron usados sin previa purificación. El diclorometano se secó con hidruro de calcio. Para todas las reacciones que implicaron el uso de un metal, se utilizó la técnica Schlenck. La espectroscopia IR se realizó con un equipo de transformada de Fourier marca Bruker, modelo Tensor 27 con óptica sellada y desecada; cada muestra se analizó en forma de pastilla de bromuro de potasio, IR de Fisher Scientific Inc., con 8 repeticiones, de resolución de 4 cm^{-1} , en un rango de frecuencia de $(4000\text{ a }400)\text{ cm}^{-1}$. La espectroscopia de RMN de ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, ^{13}C , $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$, ^{31}P , así como los espectros bidimensionales COSY, NOESY, HMBG y HSQC, se obtuvieron en un equipo Bruker de 500 MHz y 400 MHz empleando CDCl_3 como disolvente con TMS como estándar interno. El análisis elemental fue obtenido en un equipo Perkin Elmer Series II CHNS/O Analyzer.

SÍNTESIS DE LIGANTES Y COMPLEJOS

Síntesis de 4-(2,6-diisopropilfenil) amin-3-penten-2-ona (L_1H).

En un matraz balón bajo un sistema de reflujo se colocaron 48 mmol (8.51 g) de 2,6-diisopropilanilina, 96 mmol (9.61 g) de acetilacetona y 50 g de ácido *p*-toluenosulfónico en 50 mL de tolueno. La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 1 día. Después de este tiempo, el crudo de reacción se concentró en un evaporador rotatorio hasta obtener un aceite de color naranja. El aceite se mantuvo a una temperatura de $-4\text{ }^\circ\text{C}$ hasta solidificar, y a continuación se lavó con 10 mL de hexano frío, obteniendo un sólido cristalino de color café, con un rendimiento del 80%.

Síntesis de 4-(2,4,6-trimetilfenil) amin-3-penten-2-ona (L_2H).

En un matraz balón bajo un sistema de reflujo se colocaron 57.5 mmol (7.77 g) de 2,4,6-trimetilanilina, 115 mmol (11.51 g) de acetilacetona y 50 g de ácido *p*-toluenosulfónico en 50 mL de tolueno. La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 1 día. El crudo de reacción se concentró en un evaporador rotatorio hasta obtener un aceite de color naranja. El crudo de reacción se mantuvo a una temperatura de -4 °C hasta solidificar; a continuación, se lavó con 10 mL de hexano frío, obteniendo un sólido cristalino de color amarillo con un rendimiento del 80%

Síntesis de 4-(2,6-diisopropilfenil) amin-3-penten-2-ona (L_1H).

En un matraz balón bajo atmósfera de nitrógeno, se colocaron 10 mmol (2.59 g) de 4-(2,6-diisopropilfenil)amin-3-penten-2-ona (L_1H) y 5 mmol (2.02 g) del reactivo de Lawesson en 20 mL de CH_2Cl_2 seco. La mezcla de reacción se calentó durante 1.5 h a 35 °C, y después se llevó a sequedad empleando alto vacío. El producto de color amarillo se obtuvo puro mediante cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando como eluyente una mezcla de éter etílico/hexano (5:1). Rendimiento del 85%

Síntesis de 4-(2,4,6-trimetilfenil) amin-3-penten-2-ona (L_4H)

En un matraz balón bajo atmósfera de nitrógeno, se colocaron 10 mmol (2.17 g) de 4-(2,4,6-trimetilfenil)amin-3-penten-2-ona (L_2H) y 5 mmol (2.02 g) del reactivo de Lawesson en 20 mL de CH_2Cl_2 seco. La mezcla de reacción se calentó durante 1.5 h a 35 °C, y después se llevó a sequedad empleando alto vacío. Un producto de color amarillo se obtuvo puro mediante cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando como eluyente una mezcla de éter etílico/hexano (5:1). Rendimiento del 79%

Síntesis del trímero [$\{Cu(SacNac)\}_3$].

La ruta de síntesis que se describe aquí es alterna a la descrita anteriormente por nosotros [ref]. En un matraz Schlenk, se adicionan 140 mg (1 mmol) de CuBr y (1.0 mmol) del respectivo ligante SacNac. Posteriormente se añaden 20 mL de CH_3CN y 97 μ L (1.1 mmol) de Et_3N . La mezcla de reacción se deja agitando durante 4 horas, tiempo durante el cual se observa un precipitado de color naranja. Posteriormente, se filtra el precipitado y se lava con etanol frío, obteniéndose rendimientos mayores del 80%.

Síntesis de $C_6H_5(CH_2)N_3$.

En un matraz balón, se colocan 1.26 g (10 mmol) de cloruro de bencilo, 0.65 g (10 mmol) de NaN_3 en 10 mL de DMSO. La reacción se deja en agitación por dos horas, posteriormente se añade 50 mL de H_2O , y el producto se extrae con Et_2O (25 mL 3 veces) y se seca con sulfato de sodio anhidro.

Catálisis.

a) Química clic.

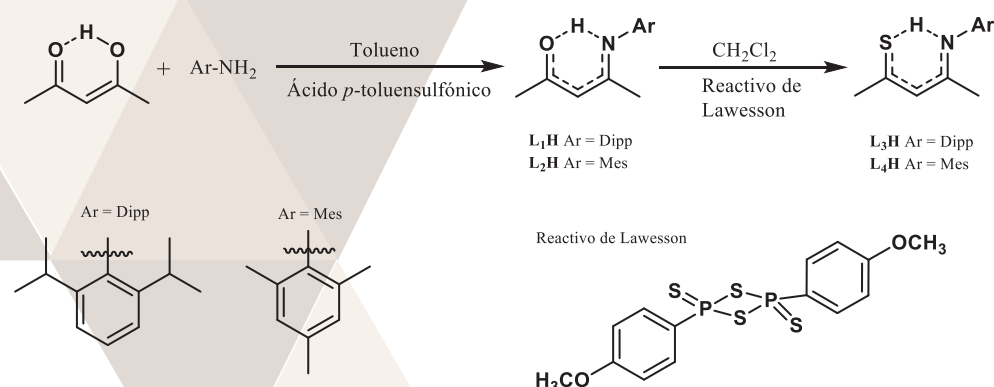
Un vial se carga con 1 mmol de $(C_6H_5)CH_2N_3$, 1 mmol de fenilacetileno ($PhCCH$) y 5 mg de [$\{Cu(SacNac)\}_3$]. La mezcla de reacción se deja en agitación constante durante 5 horas, tiempo durante el cual se observa la coagulación la formación de un gel. Rendimiento mayor del 95%.

b) Reacción de Heck

Una ampolla Schlenk se carga con 3 mmol de $C_6H_5CH=CH_2$, 3 mmol de C_6H_5Br y 3.5 mmol de $(Et)_3N$ en 15 mL de tolueno. La mezcla de reacción se deja en agitación a las temperaturas de: 25, 60 y 120 °C. Se toman alícuotas y se registra el espectro de RMN de 1H ($CDCl_3$, 500 MHz).

RESULTADOS

Los ligantes utilizados en el presente trabajo fueron sintetizados y purificados en el laboratorio mediante una técnica descrita anteriormente por nosotros [5]. Así, a partir de la reacción de condensación entre una anilina, la 2,6-diisopropilanilina o la 2,4,6-trimetilanilina según sea el caso, con la acetilacetona, utilizando tolueno como disolvente y ácido *p*-toluenosulfónico como catalizador, dando lugar a los respectivos ligantes AcNac. De esta reacción se obtienen los ligantes numerados como L_1H y L_2H , cuya diferencia con los ligantes L_3H y L_4H es la presencia de azufre reemplazando al oxígeno mediante la reacción con el reactivo de Lawesson, utilizando diclorometano como disolvente, Esquema II. Los ligantes L_3H y L_4H fueron purificados por cromatografía en columna usando solamente hexano como eluyente, y separándose la primera fracción del resto.



Esquema II. Ruta de síntesis de los ligantes.

Los productos se obtuvieron como sólidos amarillos y naranjas respectivamente, los cuales fueron parcialmente caracterizados por espectroscopia IR y RMN de ^1H , e identificados por comparación con los obtenidos en la bibliografía [5]. A continuación, y solo con propósitos de comparación con los datos descritos en la bibliografía, se presentan algunos datos. En el espectro de RMN de ^1H para L_3H (Figura I) se han marcado las señales apropiadas del ligante, como lo son el par de dobletes a 1.17 y 1.23 ppm, pertenecientes a los metilos de los isopropilos por su parte, los metilos más cercanos a los átomos de nitrógeno y azufre se hallan a 1.81 ppm y 2.64 ppm respectivamente; mientras que los protones metínicos de los isopropilos resuenan a 2.94 ppm. El protón del metino del fragmento **SacNac**, se encuentra ubicado a 6.30 ppm y la señal que se encuentra presente a 15.27 ppm, como una señal ancha, es propia del protón puente de hidrógeno entre los núcleos de azufre y nitrógeno.

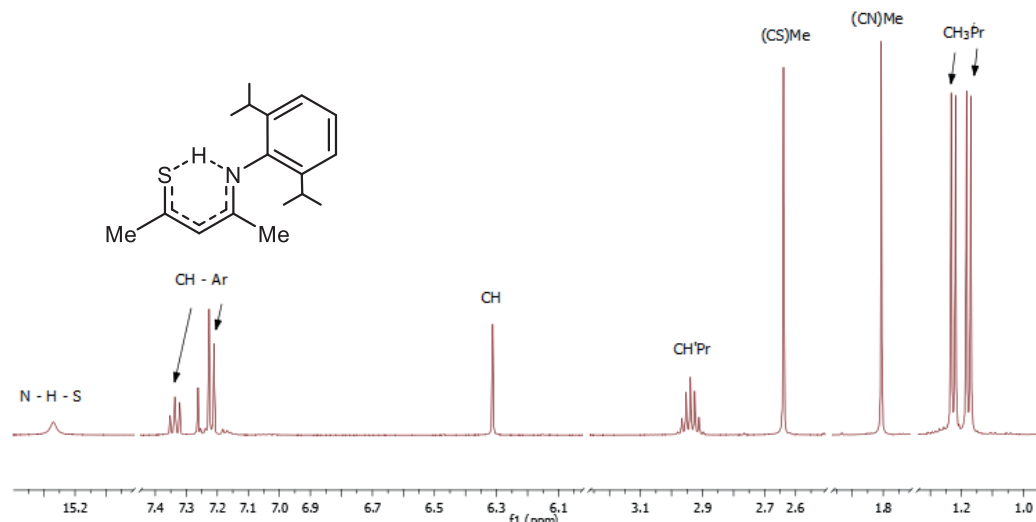


Figura I. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) para el ligante L_3H

El espectro de IR (pastilla de KBr) se muestra en la Figura II, donde se observan entre otras, las frecuencias de mayor importancia. Así, las señales propias de la vibración de alargamiento de los enlaces C-N y C-S , se encuentran en 1570 cm^{-1} y 1104 cm^{-1} , respectivamente. Estas señales sirven de referencia para los desplazamientos encontrados para el resto de complejos.

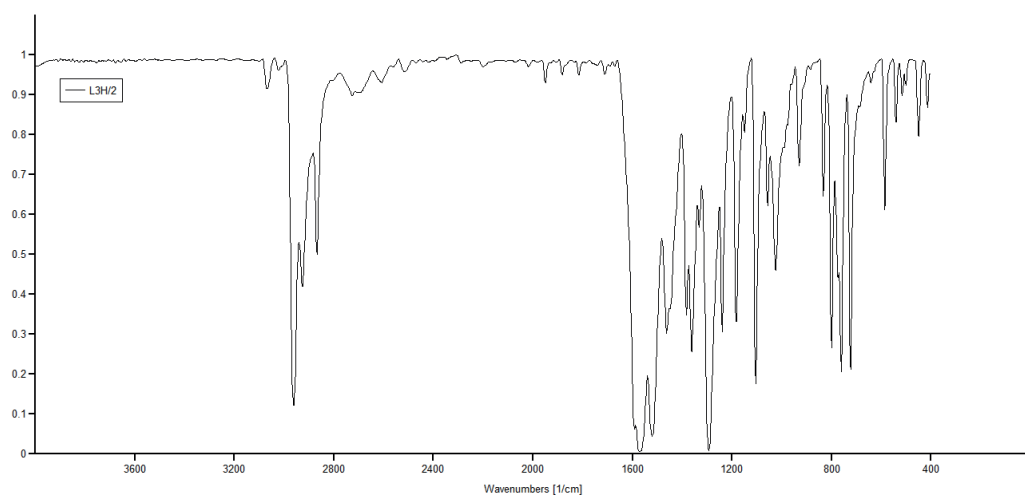


Figura II. Espectro IR (pastilla de KBr) del ligante L_3H .

Con objeto de obtener una ruta más sencilla para la formación de los trímeros de Cu(I) conteniendo los ligantes **SacNac** descritos por nosotros [6], se llevó a cabo la reacción directa de los ligantes **SacNac** con bromuro de cobre (I) en presencia de una base y utilizando como disolvente acetonitrilo, encontrándose la formación de los compuestos buscados en buenos rendimientos.

Ya con los trímeros sintetizados, se procedió a estudiar, de manera preliminar, su potencial catalítico. En este sentido, se tomaron como modelos la química clic y la reacción de Heck. Así, la reacción de la bromobencilazida con fenilacetileno catalizada por el trímero de Cu(I) , produce en 5 horas y con rendimientos cercanos al 100% (determinado por RMN) el triazol correspondiente. En la Figura III se muestra el espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) del producto.

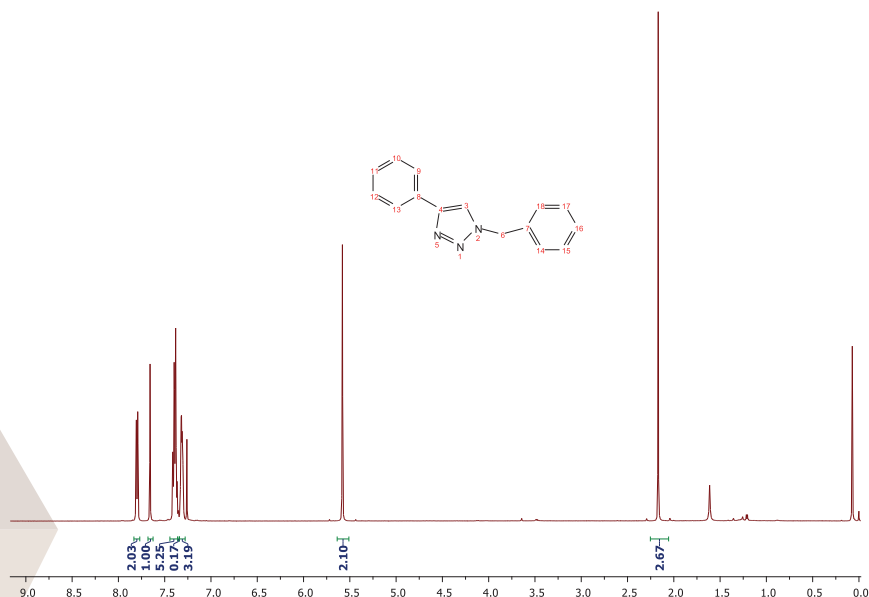


Figura III. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) del producto de catálisis de la reacción clic.

Finalmente, de los experimentos llevados a cabo, y bajo las condiciones de estudio, los trímeros de Cu(I) utilizados aquí, no catalizan la reacción de Heck. En todos los experimentos, no se observó el producto de acoplamiento C-C.

CONCLUSIONES

Se desarrolló una ruta de síntesis más eficiente y rápida para los compuestos triméricos de Cu(I), $[\{\text{Cu}(\text{SacNac})\}_3]$. Estos compuestos se probaron en catálisis: química clic y reacción de Heck. Se encontró que, bajo las condiciones de estudio, no catalizan la reacción de Heck, si son catalizadores eficientes en la química clic.

BIBLIOGRAFIA

- [1] González, S., Escudero, E., Benet, J., Stevens, E., Slawin, A. and Nolan, S. (2010) Dalton Trans. 39, 7595-7606.
- [2] Saeedi, M., Safavi, M. Razkeneri, E. Mahdavi, M. Edraki, N. Moghadam, F. Khanavi, M. and Akbarzadeh, T. (2017) Bioorganic Chemistry, 70, 86-93.
- [3] Broggi, J., González, S. Petersen, J. Raboin, S., Nolan, S. and Agofoglio, L. (2008) Synthesis 1, 0141-0148.
- [4] a) Gilchrist, T., Gymer, G. (1974) Adv. Heterocycl. Chem. 16, 33. b) Alvarez, R. Velázquez, S., Camarasa, M. (1994) J. Med. Chem. 37, 4185. c) Chen, M., Lu, S., Yuang, G. Yang, S. and Du, X. (2000) Heterocycl. Commun. 6, 421.
- [5] Ruiz, D., Alvarado, J. Andreu, G., González, G., Hopfl, H., De León, L. and López, J. (2016) Eur. J. Inorg. Chem. 874-879.
- [6] Hernández Velázquez Edson Daniel, “Estudio sobre la potencial aplicación de ligantes sacnac en la estabilización de metales en bajos estados de oxidación” Tesis Licenciatura, abril 2017.

MONITOREO DEL CRECIMIENTO DE UNA PLÁNTULA.

Rodríguez Estrada Luis Enrique¹ y Mata Donjuan Gloria Flor²

RESUMEN

En el presente proyecto se desarrolló un sistema de monitoreo del crecimiento de plántulas, las cuales requieren de muchos cuidados cuando son pequeñas. Este sistema apoya a todas aquellas personas que tengan bajo cuidado estas plantas proveyendo mediciones de la altura, humedad y temperatura en la que se encuentra la planta en tiempo real, todo esto basado en la plataforma Arduino. Como resultado se obtiene un monitoreo de un buen nivel a bajo costo, además, el sistema cuenta con una cámara JPEG con sensor infrarrojo, la cual es capaz de tomar fotos durante la noche y almacenarlos en una memoria, con la intención de que durante la noche también se logre tener el monitoreo adecuado.

ABSTRACT

In the present project a system of monitoring the growth of seedlings was developed, which requires a lot of care when they are small. This system supports all people who are in care of these plants that test measurements of the height, humidity and temperature in which the plant is located in real time, all based on the Arduino platform. As a result, you get a good low cost monitoring, in addition, the system has a JPEG camera with infrared sensor, which is able to take photos at night and store in a memory, with the intention that during the night Also have adequate monitoring.

Palabras Clave: Monitoreo, Plántula, Crecimiento.

INTRODUCCIÓN

Se le conoce como plántula a una planta que se encuentra en la primera etapa de su vida la cual es la inicial cuando la semilla rompe su dormancia y germina, y esta etapa termina cuando la planta desarrolla sus primeras hojas no cotiledonares, este tiempo en el que la planta está en la etapa de plántula, necesita varios cuidados y atenciones especiales para que esta llegue a ser una planta fuerte y productiva. Normalmente las semillas se siembran en charolas de germinación diseñados para estar dentro de invernaderos o cámaras de crecimiento donde se desarrolla la plántula. Dentro de los cuidados especiales es mantener un control de su crecimiento en base a los días de germinación, así como cuidar el color de las hojas de la plántula. Una vez que la plántula tenga una altura de aproximadamente 15cm según datos de agricultores del estado de Querétaro, y desarrolle sus primeras hojas a partir de sus 2 hojas cotiledones quiere decir que esta lista para ser trasplantada a el exterior ya que ahora puede mantenerse por sí misma. Algunas de las hortalizas que pasan por este proceso son de chile, jitomate melón, pepino, entre otros. A partir de esto, se realizó una investigación sobre los métodos que las personas de los invernaderos utilizan para saber la altura de las plantas, como resultado nos dimos cuenta de que las personas emplean el uso de instrumentos de medición como son regla métrica y el flexómetro, los cuales son instrumentos básicos que no denotan mucha precisión, también investigamos si este método de medir la altura de las plantas se realizaba con sensores y encontramos muy poca información al respecto. Nuestra propuesta en el presente proyecto es implementar sistemas electrónicos de medición en plántula producida en invernaderos que faciliten este proceso de medición y así tener un mejor monitoreo sobre el crecimiento de estas. Estos resultados de medición del dispositivo electrónico se comprarán con mediciones manuales de la plántula, para saber si la medición es correcta. Todo esto para que el agricultor pueda monitorear si la plántula está creciendo en condiciones normales o de lo contrario revisar si está presentando la falta de algún elemento vital para la planta. Este sistema de medición de altura se le implementara un sistema electrónico de medición de la temperatura y de la humedad, así como una cámara la cual capturara imágenes de la plántula a determinado tiempo para un mejor monitoreo del desarrollo de la misma.

MÉTODOS Y MATERIALES

Las pruebas fueron realizadas con plántulas que nosotros plantamos en vasos de unicel, las semillas fueron de tres distintos tipos, chile serrano, jitomate y cilantro. Se les daba riego de manera tal manera que siempre tuviera humedad la tierra en la que se encontraban, estas germinaron en un cuarto donde entra poca luz solar pero suficiente luz artificial. A continuación, se describen los actuadores utilizados:

Sensor Ultrasónico (HC-04)

Este sensor se empleó para la medición de la altura de la planta. El sensor emite un sonido el cual rebota en su objetivo para posteriormente percibir el eco causado, se mide el tiempo que la señal tarda en regresar y se manda al controlador en forma de señal eléctrica. Puede medir distancias que van desde los 2 centímetros hasta 4 metros y no necesita existir algún contacto físico con el objeto. (Para más especificaciones técnicas, revisar hoja de datos).

Cabe mencionar que este sensor no fue el único al que se le hicieron pruebas, pero debido al resultado se optó por este. Los resultados y la comparación se muestran en su respectiva sección.

La calibración de este sensor ultrasónico se hizo en base a la siguiente ecuación:

$$\text{Distancia} = 0.017 * \text{Longitud del pulso entrante} \quad (1)$$

Sensor de Humedad y Temperatura (DTH11)

Este sensor transforma los cambios de temperatura y humedad en una señal eléctrica por medio de un termistor y un sensor capacitivo respectivamente. Esta señal es digital la cual es enviada por el pin de datos hacia la tarjeta de control.

Fue utilizado para saber la temperatura del ambiente y la humedad relativa del aire en el que se encuentra la plántula, y así las personas que cuiden de la planta estén informadas del ambiente en el que se encuentra.

La programación se realizó con librerías facilitadas por el proveedor, las cuales ya vienen con la siguiente calibración:

Humedad $\pm 5\%$

Temperatura $\pm 2^\circ \text{C}$

(Para más especificaciones técnicas, revisar hoja de datos).

Cámara JPEG LinkSprite.

La cámara se eligió con la necesidad de poder observar la planta durante su crecimiento por la noche, y para tener evidencia de cómo fue su crecimiento durante el paso de los días. La cámara LinkSprite cuenta con sensor infrarrojo lo cual permite capturar fotos a blanco y negro en lugares con ausencia de luz. En cambio, en lugares con abundante luz captura las fotos a color lo cual es una ventaja con esta cámara poder capturar fotos de la planta en todo momento. Las fotos capturadas se guardan en archivo JPEG las cuales se decidió mandarlas a una micro sd para tener un almacenamiento controlado en ausencia del personal, durante la noche. Para esto se utilizó un módulo sd el cual fue conectado en el Arduino y se adaptó la programación para realizar capturas de imagen en intervalos definidos de tiempo. La resolución de la cámara es VGA/QVGA/160*120 y su comunicación es de manera serial a una velocidad especificada de 38400. (Para más especificaciones técnicas, revisar hoja de datos).

RESULTADOS

Las plantas germinaron con solo 4 días de ser plantadas, durante el periodo de este proyecto estas fueron creciendo de una manera anormal debido a que se encontraban en un lugar con poca luz solar, por lo que se volvieron más largas de lo común. De igual manera nos sirvieron mucho para realizar las pruebas ya que era el mismo principio y daban los resultados que se esperaban en presencia de los actuadores mencionados.

Como se mencionó en la sección anterior, se eligieron dos sensores de distancia para realizar pruebas, se midió con una regla métrica cierta distancia y se comparó con la proporcionada por los sensores, las siguientes tablas muestran este proceso en varios intentos.

Tabla. 1. Pruebas de medición con ultrasónico

VALORES REALES	VALORES MEDIDOS CON SENSOR (Primera medición)	VALORES MEDIDOS CON SENSOR (Segundo medición)	VALORES MEDIDOS CON SENSOR (Tercero medición)
5	6	5	5
10	11	10	11
15	15	15	15
20	20	19	20
25	25	25	24
30	30	29	29

Para el otro sensor de la marca “SHARP” modelo “GP2Y0A02YK0FG” el cual tiene un rango de medición entre 10 y 80 centímetros de distancia. Se le hizo el mismo estudio que al sensor anterior y los resultados fueron los siguientes:

Tabla. 1. Pruebas de medición con SHARP

VALORES REALES	VALORES MEDIDOS CON SENSOR (Primera medición)	VALORES MEDIDOS CON SENSOR (Segundo medición)	VALORES MEDIDOS CON SENSOR (Tercero medición)
10	12	11	12
15	17	17	17
20	24	24	24
25	29	28	28
30	31	31	32

Los resultados no fueron lo bastante satisfactorios, esto sucedió debido a la relación de distancia con la salida de tensión analógica la cual no presenta la suficiente linealidad para ser operado, por lo que se eligió trabajar con el sensor ultrasónico. (Para más especificaciones técnicas, revisar hoja de datos).

En cuanto al sensor de humedad y temperatura no se presentó problema alguno en cuanto a su programación (Figura 1). Se unieron los programas del sensor de distancia, el sensor de humedad y temperatura, y la cámara, quedando así un solo programa que muestra los resultados en intervalos de tiempo especificados en el monitor serie de Arduino.

```

cm
Humedad:
49.00
Temperatura :
28.00
Distancia
18
cm
Humedad:
47.00
Temperatura :
27.00
Distancia
21
cm
Humedad:
48.00
Temperatura :
26.00
Distancia
19
cm
Humedad:
47.00
Temperatura :
28.00
Distancia
19
cm
Humedad:
47.00
Temperatura :
28.00
Distancia
19
cm

dht11
/*Conexiones
 *ultrasonico, PIN TRIGGER 9 Y PIN DE ECO A 8
 *dht11 PIN 2
 */

#include "DHT.h"
#define DHTPIN 2
#define DHTTYPE DHT11
DHT dht(DHTPIN, DHTTYPE);
//librerias del DHT 11
void setup() {
  Serial.begin(9600);
  while (!Serial) {
    ;
  }
}

dht.begin(); //Se inicia el sensor
pinMode(9, OUTPUT); //Configuracion del pin 9 como salida: Trigger - Disparo
pinMode(8, INPUT); //Configuracion del pin 8 como entrada: Recibira el Echo
}

void loop(){
  long distancia;
  long tiempo;
}

```

Figura. 1. Programación y muestra de resultados de la lectura de los sensores en plataforma arduino.

De igual manera se obtuvieron buenos resultados con la cámara, la cual fue programada para que con un específico intervalo de tiempo sea activada y mande la fotografía a una memoria, en este caso fue una micro SD y para esto se usó un módulo externo el cual es un adaptador de micro SD para Arduino. La imagen se guarda en el formato de la cámara (JPEG) y se almacena con un nombre especificado por el usuario (Figura 2 y 3).



Figura 2. Fotografía capturada por cámara LinkSprite.



Figura 3. Actuadores del sistema de monitoreo

CONCLUSIONES

El proyecto facilita el monitoreo de las plantas con éxito, haciendo esta actividad más controlada para las personas encargadas de la misma y provee del dato de la altura de la planta ayudando con esto al agricultor en el monitoreo del desarrollo de la plántula, esto gracias a los sensores y la cámara, teniendo así una perspectiva más de la planta.

BIBLIOGRAFIA

Ramon Contreras. (2014). Los cotiledones de La Guía Sitio web: http://biologia.laguia2000.com/fisiologia-vegetal/los-cotiledones_ (fecha de consulta 10/05/2017).

Barraza, Fernando V.; Fischer, Gerhard; Cardona, Carlos E. (2004). Estudio del proceso de crecimiento del cultivo del tomate. *Agronomía Colombiana*, 22, 81-85.

GEOLOCALIZACIÓN Y DIVULGACIÓN DE ZONAS DE RIESGO POR MERCURIO EN ZONA MINERA DE PEÑAMILLER

José Raúl Vasconcelos Hernández¹ e Hilda Romero Zepeda²

RESUMEN

En el presente documento se muestra el trabajo de investigación realizado para proteger y prevenir a los habitantes del municipio de Peñamiller ubicado en el centro oeste del estado de Querétaro, los cuales se encuentran constantemente expuestos a un alto riesgo de salud debido a las múltiples irregularidades de seguridad dentro de la elevada actividad minera de extracción de mercurio con la que cuenta el municipio.

Esto mediante la localización y divulgación de la información de dichas minas hacia los habitantes del estado para acelerar un cambio y mantener protegidos a dichos sectores; así como de un trabajo de campo realizado dentro del municipio de Peñamiller en el cual, debido a una amplia actividad minera dentro del estado de Querétaro, se limitó únicamente al municipio previamente mencionado ya que cuenta con la mayor actividad de extracción de mercurio.

ABSTRACT

This paper shows the research done to protect and prevent the inhabitants of the municipality of Peñamiller located in the western center of the state of Querétaro, which are constantly exposed to a high health risk due to the multiple irregularities of Security within the municipality's high mining activity of extraction of mercury. This was done by locating and disseminating the information of these mines to the inhabitants of the state to accelerate change and keep those sectors protected; As well as a field work carried out within the municipality of Peñamiller where, due to extensive mining activity within the state of Querétaro, it was limited to the previously mentioned municipality as it has the highest activity of mercury extraction.

Palabras Clave: Geolocalización, Minamata, Minería, Mercurio, Peñamiller.

INTRODUCCIÓN

El país de México, más concretamente el estado de Querétaro en el municipio de Peñamiller, destaca en varios rubros el cual uno de ellos es la extracción minera y específicamente la del Mercurio. Este metal líquido se obtiene a partir del cinabrio, esta roca es calentada generando un gas altamente venenoso el cual se condensa poco después para obtener el mercurio, el problema de esta extracción es que se realiza sin ninguna protección especial ni procedimientos de seguridad llevados a cabo por parte de los mineros encargados de la mina además de que, por existir una gran cantidad de cinabrio en la zona, los habitantes de Peñamiller están constantemente expuestos a este mineral altamente venenoso el cual conlleva problemas de salud muy graves.

Se han documentado múltiples problemas de envenenamiento por mercurio (ya sea directa o indirectamente) en la zona y se han realizado múltiples esfuerzos para regular la operación de la actividad pero los propios mineros del lugar se rehúsan a este cambio de operaciones.

Es por esto que debido a la resistencia al cambio se pretende divulgar y generar información hacia los propios mineros y habitantes de la zona sobre los problemas que acarrea el mercurio para poder operar de acuerdo al Convenio de Minamata con el objetivo establecido en el Artículo uno del convenio el cual estipula "proteger la salud humana y el medio ambiente de las emisiones y liberaciones antropógenas de mercurio y compuestos de mercurio". Esto aunado a la implementación de geolocalización en la zona con existencia de minas para cumplir el objetivo ya antes mencionado.

MARCO TEORICO

En el año de 1956 en la ciudad de Minamata, Japón, los habitantes comenzaron a tener síntomas como falta de sensibilidad, pérdida de audición y visión hasta llegar a casos extremos como parálisis total o completa o incluso la muerte. Estos casos fueron desvalorizados y se catalogó como solo una epidemia llevando al aislamiento del lugar, extrañamente esto estaba afectando también a aves, peces y mamíferos en la zona. Pasaron los años y múltiples personas murieron y muchas otras quedaron con secuelas de la misteriosa enfermedad pero en 1968 autoridades del país descubrieron que este mal se debía a la contaminación por Mercurio el cual había entrado dentro de la cadena alimenticia, mas específicamente en el pescado, debido a que a empresa Chisso vertía sus desechos químicos en el río Minamata lo cual provoco que los pescados lo consumieran y poco a poco, siguiendo el procesamiento de la cadena alimenticia en un país altamente pesquero como Japón, llegó a los platos de las familias de la región llegando a tal punto que los peces de la región tenían una concentración de 50ppm de mercurio siendo en la actualidad los límites tolerables inferiores a 0,01 ppm (NORIEGA, 1996).

Debido al gran impacto y secuelas que este evento dejó este caso se le nombró Enfermedad de Minamata a aquel síndrome neurológico grave y permanente causado por un envenenamiento por mercurio. Los síntomas incluyen ataxia, alteración sensorial en manos y pies, deterioro de los sentidos de la vista y el oído, debilidad y, en casos extremos, parálisis y muerte (TOXIPEDIA.ORG, 2016).

En esfuerzos para evitar otra catástrofe de la misma magnitud, la ONU, junto con el apoyo de múltiples países crearon el Convenio de Minamata sobre el Mercurio. Se acordó en la quinta sesión del Comité Intergubernamental de Negociación sobre el mercurio en Ginebra el cual es un tratado mundial para proteger la salud humana y el medio ambiente de los efectos, celebrada en Suiza a las 7 a.m. la mañana del sábado 19 de enero de 2013 y se adoptó ese mismo año, el 10 de octubre de 2013 en el curso de una Conferencia Diplomática (Conferencia de Plenipotenciarios), en Kumamoto, Japón.

El Convenio busca llamar la atención sobre un metal usado a nivel mundial y omnipresente que, si bien es de origen natural, tiene un amplio uso en objetos cotidianos y se libera a la atmósfera, al suelo y al agua desde diversas fuentes. El control de las emisiones antrópicas de mercurio a lo largo de su ciclo de vida ha sido un factor clave a la hora de determinar las obligaciones del Convenio.

Los aspectos más destacados del Convenio de Minamata incluyen la prohibición de nuevas minas de mercurio, la eliminación gradual de las existentes la reducción del uso del mercurio en una serie de productos y procesos, la promoción de medidas de control de las emisiones a la atmósfera y de las emisiones a la tierra y al agua, así como la regulación inexistente del sector de la minería artesanal y a pequeña escala. El Convenio también se encarga del almacenamiento provisional de mercurio y su eliminación una vez que se convierte en residuo, los puntos contaminados de mercurio y temas sanitarios (MERCURYCONVENTION.ORG, 2017).

Afortunadamente, el convenio, jurídicamente vinculante para México fue ratificado por nuestro país el 29 de septiembre de 2015 pero entrará en vigor en agosto de 2017.

Uno de los puntos del Convenio de Minamata es que luego de cierto tiempo de operación, las minas de mercurio deben de ser cerradas para evitar posteriores daños. Esto ya se ha implementado en Japón, donde ocurrió el incidente y ha habido cambios significativos desde su aplicación, en gran medida debido a que Japón es un productor de Mercurio pero, otro gran productor de mercurio es México, específicamente Querétaro y parte de San Luis Potosí (aunque gran parte de las minas se ubican en Querétaro), país en el cual aún no está implementado el convenio.

El municipio de Peñamiller se localiza geográficamente al Norte del estado de Querétaro, en pleno semidesierto queretano y se le ha definido como la puerta de entrada a la Sierra Gorda. Abundan yacimientos de diversos minerales y el mercurio fue el más explotado. Se tienen registradas 128 bocaminas que se explotaron en las décadas de los 60s, 70s, y parte de los 80s, del siglo XX; y a consecuencia de la caída del precio del metal después de la guerra de EEUU contra Vietnam, se dejaron de trabajar. (PEÑAMILLER, 2017)

En este lugar está ocurriendo una réplica de Minamata pero a menor escala solo que en este preciso evento está afectando también a los mineros de la zona. El mercurio se extrae calentando la piedra en la que se encuentra pero esto genera vapores tóxicos y, debido a que la extracción se hace en minas cerradas, los mineros terminan inhalando la mayoría de estos vapores; Además de esto, cadenas de periódicos han señalado las malas prácticas al momento de extraer el mercurio, “La Secretaría de Desarrollo Sustentable (SEDESU) en la entidad, en coordinación con la Unidad de Protección Civil, trabajan en la capacitación de los mineros, a fin de evitar accidentes como los que han causado la muerte de 5 trabajadores en lo que va del año.

Pedraza Núñez expuso que los accidentes se generan por una falta de cultura de cuidado y protección de los mineros, ya que aunque se les han dotado de las herramientas necesarias, en muchas ocasiones no las utilizan de manera adecuada, o no se ponen el equipo para introducirse a las minas, además de que en otras ocasiones lo hacen en estado de ebriedad.” (EL FINANCIERO, 2017). Además de mencionar que, debido a que el mercurio se encuentra en alta concentración especialmente en los cuerpos acuíferos de la región) se realiza la extracción artesanal por parte de los habitantes de la región dado al alto costo de venta del mercurio el cual genera un peligro latente dentro de los hogares de los habitantes de la comunidad.

Este trabajo de minería dentro del municipio genera una gran fuente de ingresos a la comunidad, eso no se puede negar pero genera muchas más problemas dentro de esta lo cual genera un conflicto con el objetivo del progreso, tanto científico como social. “El objetivo prístino de la ciencia fue garantizar el máximo bienestar a la humanidad. La lógica que imperó en aquel proyecto fue el re-descubrimiento de la naturaleza para la supervivencia del hombre. No había más interés que la comprensión del mundo natural, apegado a las explicaciones pertenecientes al mundo natural [...] Se trataba de un individuo cuya actividades enfocaba a colocar a la ciencia al servicio de la humanidad” (SALVADOR, 2015).

MÉTODOS Y MATERIALES

Dentro del espacio correspondiente al municipio de Peñamiller, no se ha propagado ni diseminado de manera correcta o eficiente la información sobre los problemas originados por el mercurio y mucho menos sobre la localización de las minas por lo cual el suelo en el que una familia Queretana del municipio de Peñamiller puede estar encima de una mina de Mercurio, por poner un ejemplo.

Para realizar el trabajo, se comenzó realizando un trabajo de campo dentro de la localidad para conocer la geografía e hidrografía de la región así como las costumbres y hábitos de la gente endémica del lugar, lo cual dio un panorama amplio del porqué existe un foco de peligro en la región ya que la principal fuente de agua del lugar son los cuerpos acuíferos que rondan la región y, una vez recolectada la información necesaria sobre el espacio de investigación se procedió a observar las minas que estuvieran al alcance. Debido a que existe un temor latente por los mineros de la zona a cerrar su única fuente de ingresos no se nos fue posible siquiera acercarnos a la zona pero debido a el acercamiento de los mismos trabajadores del lugar se pudo notar que no se contaba con ninguna protección especial.

Para llevar a cabo la implementación se necesitó recurrir al procesamiento de información por medios electrónicos los cuales fueron una base de datos para las coordenadas de cada una de las minas (ubicación aproximada) y un servicio de comunicación y geolocalización¹ en línea para que, con ayuda de la información provista por múltiples sitios web del gobierno de México la cual contenía información sobre las minas dentro del estado.

Una vez recolectada toda la información tanto de los factores de riesgo debido a las costumbres de los habitantes de la zona, de los grupos de mayor riesgo y la ubicación de los asentamientos mineros así como el tratamiento de los datos obtenidos para obtener información útil se obtuvieron resultados significativos sobre el estado de la región pero debido al tiempo y problemas sistemáticos con los mineros de la región no se pudo diseminar del todo la información. La geolocalización de las minas fue satisfactoria logrando ubicar el mayor porcentaje de las minas del municipio de Peñamiller así como pequeños asentamientos no registrados como minas pero debido a su volumen y profundidad de catalogaron como tal.

El resultado del trabajo concordó con algunos datos recopilados de investigaciones anteriores en el lugar por lo que queda claramente identificado el problema y ciertas rutas de solución pero debido a problemas de acceso a la zona y tiempo no se logró la deseada capacitación a los mineros ni a la población aledaña al lugar.

CONCLUSIONES

Si bien el problema de falta de seguridad en las minas no pudo ser completamente ni adecuadamente abordado si bien queda resuelto el problema de la identificación de los problemas en dicha zona no se logró una solución del todo eficaz más se logró establecer las pautas para un trabajo posterior o incluso para aquellos trabajos que se realizaron de manera paralela con este.

Las pautas están puestas, la comunidad de Peñamiller sigue siendo un reto a asumir debido a las complicaciones legales de las minas pero en materia de divulgación de la información el asunto es más fácil de lo que el anterior caso resultó. Se consiguió la información necesaria de la región para abordarlo desde cualquier otra perspectiva deseable o para contribuir con algún otro problema endémico del lugar.

BIBLIOGRAFIA

CLIMÁTICO, I. (2017). *El Convenio de Minamata entrará en vigor en agosto de 2017*. gob.mx. Consultada en <https://www.gob.mx/inecc/prensa/el-convenio-de-minamata-entrara-en-vigor-en-agosto-de-2017-108220>. (Fecha de consulta (17-7-2017).

CONVENIO DE MINAMATA SOBRE EL MERCURIO. http://www.mercuryconvention.org/Portals/11/documents/conventionText/Minamata%20Convention%20on%20Mercury_s.pdf. (Fecha de consulta 10-8-2017).

EL FINANCIERO (2017), *25 minas de mercurio en Querétaro operan irregularmente*. Elfinanciero.com.mx. Consultada en <http://www.elfinanciero.com.mx/economia/25-minas-de-mercurio-en-queretaro-operan-irregularmente.html> (Fecha de consulta 24-7-2017).

LIMUSA NORIEGA, W. (1996), *Productos Químicos Orgánicos Industriales. Vol. I*. Editores.

MERCURYCONVENTION.ORG. (2017). *Convenio de Minamata - Convenio*. Consultada en <http://www.mercuryconvention.org/Convenio/tabid/5690/language/es-CO/Default.aspx> (4-7-2017).

PEÑAMILLER. (2017). *Siglo.inafed.gob.mx*. Consultada en <http://siglo.inafed.gob.mx/enciclopedia/EMM22queretaro/municipios/22013a.html> (fecha de consulta 19-7-2017).

SALVADOR ARELLANO, J. (2015). *Perspectivas y Problemas Contemporáneos de la Ética y la Bioética*, Querétaro: Universidad Autónoma de Querétaro Editorial

TOXIPEDIA.ORG. (2016). *Minamata, Japón - Toxipedia*. Consultada en <http://www.toxipedia.org/pages/viewpage.action?pageId=15171728> (fecha de consulta 9-8-2017).